



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE GOTA COLGANTE PARA
LA OBTENCIÓN DE "SPHERULITES" DE LA ENZIMA
PIRAZINAMIDASA K48T.**

Omayra Patricia Marquez Ocaña

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Lima, Perú

2023

Asesor(a) de tesis

PhD. Patricia Sheen Cortavarria

JURADO DE TESIS

Dr. HOLGER MAITA MALPARTIDA

PRESIDENTE

Dra. MELISSA MÉNDEZ ARANDA

VOCAL

Dr. PABLO TSUKAYAMA CISNEROS

SECRETARIO

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi trabajo de tesis a mis papas, mi hermana, mi supi y mis gatitos. Gracias por su amor, apoyo y paciencia incondicional durante todo el proceso de mi formación académica. Su presencia y ánimo me han ayudado a mantenerme enfocado/a en mis metas y a superar los desafíos que he enfrentado a lo largo de mi carrera. Espero que este logro sea también un reflejo de su dedicación y sacrificio.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Renzo, la Dra. Patty, María de Grecia y los compañeros del laboratorio por su invaluable ayuda durante la realización de mi tesis. Sin su orientación, conocimientos y apoyo constante, no habría sido posible obtener este importante logro académico.

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE GOTA COLGANTE PARA LA OBTENCIÓN DE "SPHERULITES" DE LA ENZIMA PIRAZINAMIDASA K48T

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%	3%	1%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.jove.com Fuente de Internet	1%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
3	bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083 Fuente de Internet	<1%
4	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	<1%
5	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	vsip.info Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.ufsc.br Fuente de Internet	<1%
8	www.eca.usp.br Fuente de Internet	<1%

ÍNDICE

	Pág.
I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Abreviaturas	3
IV. Introducción	4
4.1 Marco teórico	7
V. Pregunta de investigación	10
VI. Objetivos	10
VII. Materiales y métodos	11
VIII. Resultados	15
IX. Discusión	22
X. Conclusiones	24
XI. Recomendaciones	25
XII. Referencias bibliográficas	25

I. RESUMEN

Dentro de la biología moderna, el modelamiento de la estructura tridimensional de las proteínas proporciona información relevante e irremplazable para determinar su función o características. Uno de los métodos más usados es la cristalografía de rayos X; para ello es necesario obtener cristales de proteína. Una de las técnicas más usadas es la difusión por vapor; en la cual una gota de muestra pura y homogénea con precipitante llega a la sobresaturación. Se pueden obtener diferentes resultados aparte de cristales, como la formación de *Spherulites*; que son gotas de proteína concentrada y uniforme. Las *Spherulites* presentan un buen punto de inicio en la optimización del proceso de formación de cristales proteicos.

En el 2011 se obtuvo un primer cristal y posterior estructura de la enzima pirazinamidasa de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv. Mediante el método de gota colgante, que usa el principio de la difusión de vapor, y MgSO₄ como precipitante; sin embargo, nunca se pudo reproducir el resultado con las condiciones determinadas en dicha investigación. En este estudio mediante el método de gota colgante se determinó cuáles son las mejores condiciones para obtener un estado de *Spherulite* de la pirazinamidasa mutante K48T. Las *Spherulites* de pirazinamidasa K48T fueron obtenidas a 1.5M de MgSO₄, 100 mM de BME, 5, 10 y 20mg/ml de PZAsa a pH 6.5 de buffer Bis TRIS a 25°C.

Palabras clave

M. tuberculosis, *spherulite*, gota colgante, pirazinamidasa.

II. ABSTRACT

Within modern biology, the modeling of the three-dimensional structure of proteins provides relevant and irreplaceable information to determine their function or characteristics. One of the most used methods is X-ray crystallography; for this it is necessary to obtain protein crystals; by methods such as vapor diffusion. In which a drop of pure and homogeneous sample with precipitant reaches supersaturation and changes are observed in the drop. Different results can be obtained apart from crystals, such as the formation of Spherulites, concentrated and uniform protein droplets, which present a good starting point in optimizing the process of protein crystal formation.

In 2011, a first crystal and subsequent structure of the Mycobacterium tuberculosis pyrazinamidase enzyme of the H37Rv strain was obtained, using the hanging drop method and MgSO₄ as precipitant; however, the result could never be reproduced with the conditions determined in that investigation. In this study using the hanging drop method will be extended are the best conditions to obtain a Spherulite state of the K48T mutant pyrazinamidase. Pyrazinamidase K48T Spherulites were obtained in 1.5M MgSO₄, 100 mM BME, 5, 10 and 20mg/ml PZA_{sa} in pH 6.5 Bis TRIS buffer at 25°C.

Keywords

M. tuberculosis, spherulite, hanging drop, pyrazinamidase.

III. ABREVIATURAS

3D: Tridimensional

MgSO₄: Sulfato de magnesio

MES: Ácido 2-etanosulfónico

Bis-Tris: 2-(Bis(2-hidroxietil) amino)-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol

PZAsa: Enzima Pirazinamidasa

BME: β-mercaptoetanol

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

OD600: Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm

LB: Cebado de Luria-Bertani

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

POA: Ácido pirazinoico

SER: Reducción de la entropía de la superficie, *surface-entropy reduction*

IV. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la estructura tridimensional de las macromoléculas biológicas es de vital importancia debido a que facilita el entendimiento de los procesos bioquímicos que suceden dentro de los seres vivos(1) (1). En este esfuerzo la biología estructural se enfoca en determinar nuevas técnicas que ayuden a establecer cómo están formadas las biomoléculas y evidenciar las características de su función(2) (2). La determinación de la estructura 3D de las biomoléculas genera muchas aplicaciones; ya sea en la generación de nuevos conocimientos, bioingeniería, biomedicina o biotecnología. Por ejemplo, los fármacos diseñados en base a la forma de la biomolécula blanco presentan mayor efectividad (3)(3). En los últimos años, la biología estructural evolucionó notablemente en el uso de nuevas técnicas y tecnologías de datos. Esto propicio el auge de nuevas estructuras tridimensionales que hoy en día superan las 45 000 estructuras tridimensionales (3D) depositadas en el *Protein Data Bank*; cada año aumenta el número de estructuras por el desarrollo del modelado computacional (4)(4). La obtención experimental de estructuras 3D se realiza con diversos métodos; siendo la cristalografía de rayos X el método más usado (5)(5). Esta técnica permite obtener estructuras de forma certera y rápida; debido al desarrollo de nuevas técnicas en la línea de trabajo de la cristalización; como la clonación, expresión, purificación y cristalización (6,7)(6,7). Para generar buenos cristales macromoleculares es muy importante contar con una muestra pura y homogénea; además a una concentración que le permita llegar a la sobresaturación sin precipitar (7,8)(7,8).

Uno de los cuellos de botella más importantes en la cristalografía por rayos X es la formación de cristales. En ese sentido se han elaborado diversos métodos para lograr cristales macromoleculares; los cuales se dividen en tres clases: cristalización Batch, difusión líquido-líquido y difusión de vapor(9) (9)(9)(9). La última clase es la más usada por la cristalografía. Se basa en la transferencia neta de agua; a través de la fase de vapor de la gota de proteína hacia el reservorio que se encuentra con alta concentración de solutos (en comparación a la gota de proteína); esto lleva a la proteína en la gota al punto de nucleación. El proceso depende de ciertos factores como la concentración, tipo de solutos, la distancia del reservorio a la gota, la posición de la gota, su volumen y temperatura (10–12)(10–12).

El método de gota colgante usa el principio de la difusión de vapor. Al sobresaturar la gota de proteína la lleva a cambios en su solubilidad; resultando en diferentes fases: saturación, metaestable, nucleación, precipitación, separación de fases, *spherulites* o cristales. Este método cuenta con dos partes; un reservorio de sustancia precipitante (500 μ l-1000 μ l) en los pocillos y una gota de proteína (1 μ l-2 μ l) colocada en un cubreobjetos especial. La gota en el cubreobjetos se invierte en dirección al reservorio sellando el sistema (13,14)(13,14). La observación de las gotas resultantes presenta una gran variación; debido a las condiciones a la que son expuestas. Es decir, no solo se obtendrá cristales, sino una variedad de resultados correspondientes al diagrama de fases de un proceso de cristalización (Figura 1); como precipitados, separación de fases, gotas claras o con impurezas, etc. (15,16)(15,16). Uno de los resultados esperados es la formación de *Spherulites*. La cual se caracteriza por verse como gotas proteicas diferenciadas; por ello se realiza la optimización del método gota colgante para obtener *Spherulites*. Este resultado es la base para conseguir los tan deseados cristales proteicos (14).

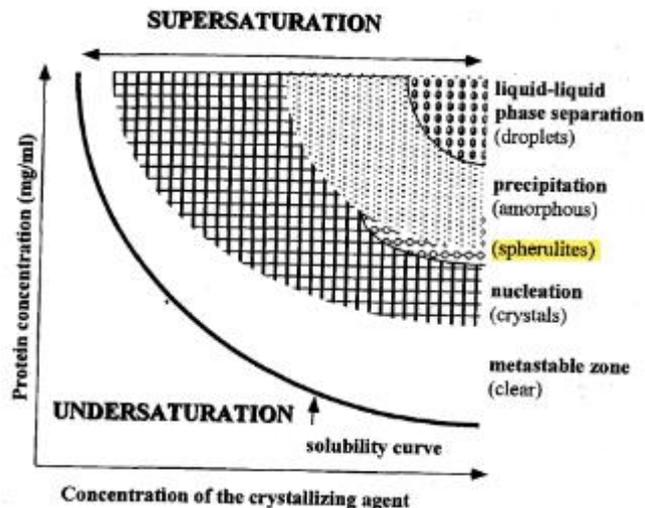


Figura 1. Diagrama de fases en relación a la concentración de proteína y agente cristalizante. Fuente: Berfors, T (1999) (14)

En el 2011 Petrella et al. publicaron la primera estructura 3D de la PZAsa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Figura 2); donde se muestra diferencias estructurales en el sitio activo al compararla con la estructura 3D de la pirazinamidasa de *M. bovis*. En este estudio se empleó el método de gota colgante con una solución (reservorio) de 1.6M $MgSO_4$ y 0.1M de tampón MES a pH 6.6 con una gota de 20mg/ml

de proteína en Bis-Tris pH 6.0(17) (17). Sin embargo, no se ha logrado replicar los resultados obtenidos por Petrella et al. y peor aún, no se ha logrado cristalizar las mutantes de la proteína pirazinamidasasa. Por otro lado, las mutantes de pirazinamidasasa presentan actividad cinética diferenciada en comparación a la proteína nativa. Por lo cual, genera un importante vacío de información respecto a la estructura y función del sitio activo de las mutantes de pirazinamidasasa; las cuales representan más del 30% de cepas de importancia clínica en el Perú (18,19).

En investigaciones recientes se ha considerado el uso de herramientas bioinformáticas. Como el modelado de estructuras proteicas a base de la dinámica molecular; el cual recopila parámetros enzimáticos de las proteínas y mediante algoritmos computacionales se generan estructuras *in silico* (19). En la tesis presentada por Olivos, G (2021) genera estructuras con el método de dinámica molecular de la enzima PZAsa nativa y de sus mutantes. Las cuales en base a sus características enzimáticas presentan diferencias estructurales y características singulares dependiendo de la mutación (20). A pesar de esta poderosa herramienta bioinformática, la determinación experimental de la estructura de las proteínas brindará información más exacta y determinante sobre sus características.

Una de las PZAsas mutantes tipificadas en el Perú es la que presenta una mutación puntual en el residuo 48, cercana al sitio de unión a metal (ácido aspártico 49) y ubicada en la superficie de la proteína; este residuo 48 intercambia lisina (K) por una treonina (T) (Figura 2). Esta mutación le confiere actividad ligeramente menor a la enzima PZAsa nativa; sin embargo, las cepas son resistentes debido a otros mecanismos que no solo involucran la mutación en el gen *pncA* (21). La mutante PZAsa K48T presenta una ventaja en el proceso de cristalización; ya que un método para hacer proteínas más cristalizables es la mutación única de ciertas zonas (superficie) de una proteína. De acuerdo a ello, los residuos aminoacídicos como la treonina (cortos y rígidos) de la mutante K48T contribuyen positivamente en las interfaces proteína-proteína y por ende en una ayuda para el proceso de cristalización (22).

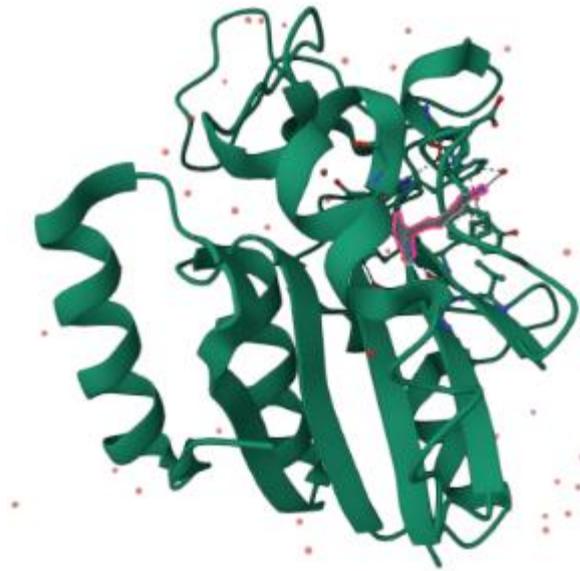


Figura 2. Estructura 3D de la pirazinamidasa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Sombreado en rosado se encuentra el residuo lisina 48. Fuente: RCSB: *Protein Data Bank* (2011)

El objetivo del presente trabajo fue optimizar el proceso de gota colgante para la obtención de Spherulites de la enzima PZAsa K48T. En la optimización se evaluaron las siguientes condiciones: Concentración de PZAsa, concentración de MgSO₄, pH, temperatura y aditivos, como el β -mercaptoetanol adicionado a la solución del reservorio. Los resultados proveen parámetros experimentales, que son la base en el proceso de cristalización de la pirazinamida mutante K48T y posteriormente generar la estructura 3D.

4.1 Marco teórico

4.1.1 Gota colgante

Es el método para cristalización de proteínas más usado, el cual usa el principio de difusión de vapor para lograr sus resultados de cristalización. Las partes principales de este método consisten en una solución acuosa conteniendo la proteína, buffer y exceso de un soluto; todos estos componentes pueden ser modificados y adaptados de acuerdo a lo que se requiera. La solución proteica se posiciona en una luna de cobertura, la cual se coloca sobre un pocillo con sellador que contenga la solución cristalizante con el soluto (Figura 3) (23).

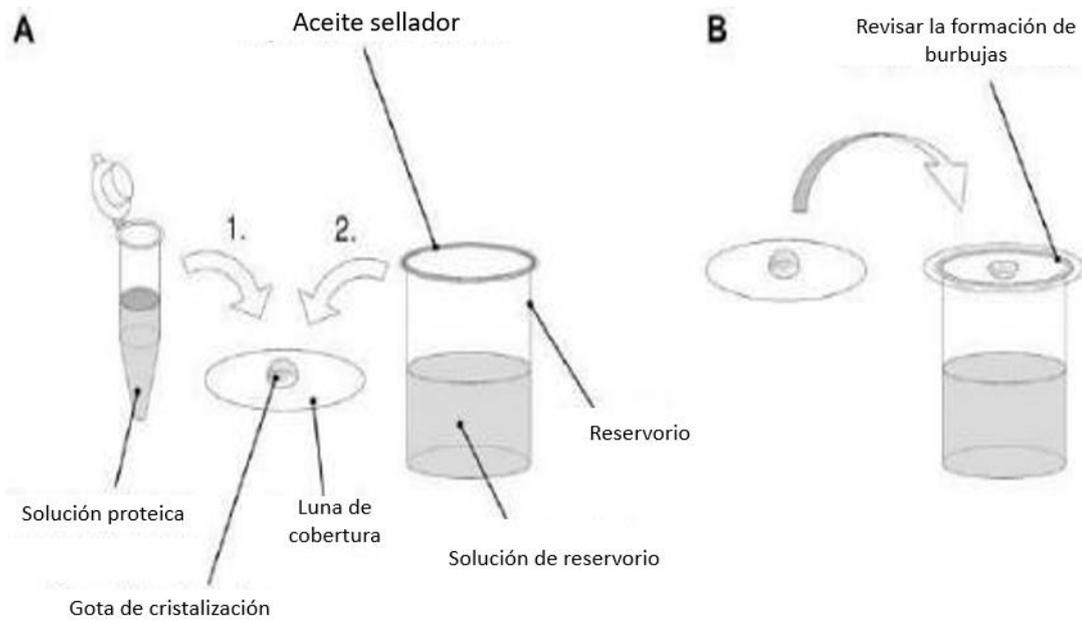


Figura 3. Experimento de difusión de vapor mediante el método de gota colgante (Hanging drop). **A.** La flecha 1 indica el pipeteo de la solución proteica en la luna de cobertura y la flecha 2 indica el pipeteo de la solución de reservorio en la misma luna de cobertura mezclando ambas gotas. **B.** El sellado de la luna de cobertura en el pozo correspondiente. Fuente: Cordata, G (2013).

4.1.2 *Spherulites*

En el proceso de cristalización se pueden tener muchos resultados, uno de ellos es la formación de *Spherulites*. Estas formaciones esféricas representan un estado de desequilibrio en un sistema de difusión de gases. Estas *Spherulites* son consideradas patrones de crecimiento policristalino; es decir tienen solución acuosa; de proteína, que llega a un estado antes de ser un cristal (24). Experimentalmente se toman como referencia básica para generar cristales proteicos y se pueden observar resultados obtenidos de referencia.

4.1.3 Separación de fases

La separación de fases es un resultado que también se puede obtener en un experimento de cristalización. En esta fase los resultados de las gotas experimentales a menudo se verán como balones de golf; que se pueden comparar con otros resultados. Esta fase será la antesala para obtener *Spherulites*.

4.1.4 Pirazinamidasas K48T

La pirazinamidasa es una enzima esencial en el mecanismo de respuesta a la pirazinamida (fármaco) en *M. tuberculosis*. esta enzima tiene diferentes mutantes desde las más resistentes a la pirazinamida hasta las más susceptibles, las cuales representan un problema de salud pública. Para ello se ha determinado a las diferentes mutantes, como la mutante K48T. esta mutación es considerada dentro de las mutantes cerca al sitio activo, donde la eficiencia cinética es similar a la enzima nativa (21).

4.1.5 Alphafold Colab

Obtener estructuras 3D de proteínas o complejos proteicos mediante análisis computacionales siempre fue un reto; pero gracias a los nuevos avances tecnológicos de almacenamiento y predicción se volvió más rápido y accesible. Alphafold es una herramienta computacional que en base a la secuencia de aminoácidos de las proteínas puede predecir la forma o estructura que esta puede tener. Para ello utiliza colecciones de secuencias de proteínas y bases de datos ambientales; mediante métodos de detección de homologías sensibles (HMMer7 y HHblits8) con modelos de Markov ocultos. Esta nueva versión de Alphafold en colaboración con Google colabory permite a los investigadores compartir códigos de predicción y usar GPUs potentes para desarrollar la predicción de sus estructuras; que de otro modo requeriría poderosas fuentes computacionales y por ende más tiempo de predicción (25).

4.1.6 pH de cristalización

Es un parámetro importante en los experimentos de cristalización; ya que influye en la estabilidad, solubilidad y conformación de la proteína. Para determinar el mejor pH en un experimento es necesario conocer el rango de pH en el que la proteína es estable, generalmente está en un rango de 4.5 a 8.5. Algunos ejemplos de tampones que se puedan usar son Bis-Tris, MES o HEPES (14).

4.1.7 Precipitante para cristalización

Los precipitantes en la cristalización inducen en la formación de cristales. Las sustancias que actúan como precipitantes inducen a las moléculas proteicas a llegar a un estado de nucleación. Un precipitante puede ser desde un polímero

hasta una sal, depende de cada experimento el tipo de precipitante a usar y se realizan ensayos de prueba y error para encontrar el adecuado (14).

4.1.8 Temperatura de cristalización

Juega un rol esencial en la cristalización de proteínas, ya que la solubilidad del sistema está en función de la temperatura. Se ha reportado que la cristalización puede ocurrir en temperaturas menores a 0°C hasta los 60°C, sin embargo, la mayoría de experimentos son realizados a 4°C y temperatura ambiente (25°C o 20°C). La temperatura de cristalización puede variar de una a otra proteína, por ello es importante el conocimiento de las características de la proteína y realizar experimentos de gradientes de temperatura. La calidad de un buen cristal proteico dependerá de la elección de una temperatura optima (14).

4.1.9 Aditivos de cristalización

Los aditivos sirven para diferentes propósitos en la cristalización. Las oportunidades de obtener cristales de calidad aumentan al tener un aditivo optimo en el sistema de cristalización. Estos aditivos pueden ser diversos como: tampones, sales, solventes orgánicos, etc. Todo ello dependerá de los requerimientos experimentales que se tengan (14).

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las condiciones de optimización adecuadas para obtener "Spherulites" de la enzima pirazinamidasa mutada (K48T)?

VI. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Optimizar el proceso de gota colgante para la obtención de *Spherulites* de la enzima pirazinamidasa mutada (K48T).

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el pH del tampón Bis-Tris para la formación de *Spherulites*.
- Determinar las concentraciones de MgSO₄ para la formación de *Spherulites*.
- Determinar la temperatura optima de 4°C o 25°C para la formación de *Spherulites*.
- Determinar las concentraciones de pirazinamidasa K48T para la formación de *Spherulites*.

- Determinar las concentraciones de β -mercaptetanol para la formación de *Spherulites*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Expresión de la proteína recombinante de PZAsa K48T

El plásmido recombinante pET28a: *pncA* K48T fue obtenido de la librería de plásmidos del laboratorio de Bioinformática de la Universidad Cayetano Heredia. La cepa de *E. coli* Lemo21(DE3) fue transformada con el plásmido recombinante, para luego ser sembrada en agar con antibiótico kanamicina (40 mg/ml) y cloranfenicol (25 mg/ml). La expresión se realizó inoculando una colonia transformada de *E. coli* Lemo21(DE3) pET28a: *pncA* K48T en 50 ml de caldo LB en un matraz de 250 ml (1:5); en agitación a 37 °C 250 rpm por 16 horas. Luego se transfirió 20 ml del cultivo crecido a un matraz con 400 ml de LB de capacidad de 2 L con kanamicina (40 mg/ml) y cloranfenicol (25 μ g/ml) y otros 20 ml del cultivo inicial a otro matraz de 400 ml de LB con las mismas condiciones que el anterior; se dejó en agitación a 250 rpm y 37 °C hasta llegar a un OD₆₀₀ entre 0.6-0.8. Se recolectó 1ml del cultivo no inducido para tomar como control de expresión. Se indujo la expresión con IPTG a 0.7 mM dejando en agitación a 250 rpm, 37 °C por 4 horas. Transcurrido el tiempo de expresión se recolectó 1 ml del cultivo inducido. Se verificó la expresión mediante la corrida electroforética en SDS-PAGE 12%. Los cultivos inducidos se trasladaron a un recipiente para centrifugar a 4000 rpm durante 25 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y guardó el pellet a -70 °C.

5.2 Purificación de la PZAsa K48T mediante cromatografía en columna.

El pellet obtenido de ambos matraces de 400 ml se trabajó cada uno con la siguiente metodología. Se suspendió en tampón de unión (Tampón fosfato 20mM, NaCl 0.5M, Imidazol 20 mM a pH 7.4). Se lisó las células, por congelación y descongelación; para luego mediante sonicación tres veces con un programa de 1 minuto (1 segundo ON y 1 segundo OFF) con intervalos de reposos de 5 minutos en hielo, se lisó el ADN. Luego se centrifugó a 12500 rpm, 4 °C por 20 minutos para separar la fracción soluble de la insoluble. Seguidamente se recuperó la fracción soluble y se pasó por la columna de purificación de *His-Trap*. Esta columna contiene resina de níquel óptimo para proteínas recombinantes con cola de histidina, como la PZAsa K48T usada.

Antes de añadir la fracción soluble, la columna se calibró con tampón de calibración (Tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.5M, Imidazol 20 mM a pH 7.4) dos veces. Luego se agregó la primera fracción soluble a la columna y dejó pasar, recolectando 1 ml. Posteriormente se añadió a la columna el tampón de lavado (Tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.5M, Imidazol 40 mM a pH 7.4) dos veces. Luego con el tampón de elución (Tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.5M, Imidazol 60 mM a pH 7.4) se recolectó 10 ml de eluido, por cada fracción soluble. Por último, a la columna se le añadió el tampón final (Tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.5M, Imidazol 500 mM a pH 7.4), de esa manera se elimina cualquier residuo proteico de la resina. Las alícuotas de 10 ml se analizaron en gel SDS- PAGE 12% y método cualitativo de la actividad de pirazinamidasasa de Wayne. Se obtuvieron dos alícuotas de 10 ml y por separado se concentraron las alícuotas 10 veces por ultrafiltración con Amicon® Ultra-15 *Centrifugal Filter Unit* 10 kDa MWCO. La primera alícuota de 10 ml se lavó tres veces con 40 mM de buffer Bis-Tris a pH 6 y la otra alícuota con buffer 40 mM de Bis-Tris a pH 6.5. La concentración final se midió por el método de Nanodrop 2000C y Bradford. Finalmente, mediante gel de SDS-PAGE 12% se analizó la pureza de las proteínas concentradas.

5.3 Optimizar la cristalización de la PZAsa K48T mediante el método de gota colgante (*Hanging Drop*)

La cristalización se realizó en placas de cristalización de 24 pozos (Hampton Research) selladas con vidrios de 22mm (Hampton Research). Los pozos fueron llenados con 500 µl de solución de reservorio, el cual contiene MgSO₄, 0.1M de tampón MES pH 6.6 y concentraciones variables de beta-mercaptoetanol. En las lunas de cobertura se pipeteó 1 µl de PZAsa K48T en buffer Bis-Tris 40 mM. Cada condición evaluada fue preparada considerando como base las condiciones usadas por Petrella et al (2011), mencionadas en la introducción. Todas las soluciones y buffers se filtraron con membranas de 0.22 µm. Cada condición evaluada se realizó a 4°C y 25°C.

Condiciones evaluadas:

Condición 1. Efecto del pH de 40 mM Bis-Tris (pH 6 y 6.5), la concentración de PZAsa (5 y 10 mg/ml) y 1.5 M de MgSO₄, 0.1 M de MES pH 6.6 y 100 mM de BME o 0mM BME (Tabla 1).

Condición 2. Concentración de PZAsa (5 y 10 mg/ml) en Bis-Tris (pH 6.5) a 1.3 y 1.5 M de MgSO₄, 0.1 M de MES pH 6.6 y 100 mM BME o 0mM BME (Tabla 2).

Condición 3. Concentración de PZAsa (5, 10 y 20 mg/ml) en Bis-Tris (pH 6.5), 1.3 y 1.5 M de MgSO₄, 0.1 M de MES pH 6.6 y 0, 50, 100, 150 mM de BME (Tabla 3).

Tabla 1: Esquema para la evaluación del pH de Bis-Tris (pH 6-6.5) y la concentración de PZAsa (5-10 mg/ml) en la formación de *Spherulites*.

4°C/25°C	0 mM BME	100mM BME		0 mM BME	100mM BME	
A	R: pH 6.6 Gota: 5mg/ml pH 6.5	R: pH 6.6 Gota: 5mg/ml pH 6.5	R: pH 6.6 Gota: 5mg/ml pH 6.5	R: pH 6.6 Gota: 5mg/ml pH 6	R: pH 6.6 Gota: 5mg/ml pH 6	R: pH 6.6 Gota: 5mg/ml pH 6
C	R: pH 6.6 Gota: 10mg/ml pH 6.5	R: pH 6.6 Gota: 10mg/ml pH 6.5	R: pH 6.6 Gota: 10mg/ml pH 6.5	R: pH 6.6 Gota: 10mg/ml pH 6	R: pH 6.6 Gota: 10mg/ml pH 6	R: pH 6.6 Gota: 10mg/ml pH 6

BME=β-mercaptoetanol; R= Reservorio (1.5 M MgSO₄+ 0.1M MES+BME); Gota (40mM Bis-Tris + PZAsa)

Tabla 2: Esquema para la evaluación de MgSO₄ (1.3-1.5 M) y la concentración de PZAsa (5-10 mg/ml) a pH 6.5 en la formación de *Spherulites*.

4°C/ 25°C	0 mM BME	100 mM BME		0 mM BME	100 mM BME	
A	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml
C	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 10mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 10mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 10mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 10mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 10mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 10mg/ml

BME=β-mercaptoetanol; R= Reservorio (MgSO₄+ 0.1M MES pH 6.6+BME); Gota (40mM Bis-Tris pH 6.5 + PZAsa)

Tabla 3: Esquema para la evaluación de la concentración de PZAsa (5, 10 y 20 mg/ml), MgSO₄ y BME en la formación de *Spherulites*.

4 °C/ 25 °C	1.3M de MgSO ₄	1.5 M de MgSO ₄	1.3 M de MgSO ₄	1.5 M de MgSO ₄	1.3 M de MgSO ₄	1.5 M de MgSO ₄
0 mM BME	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:20mg/ml	R:1.5M MgSO ₄ Gota:20mg/ml
50 mM BME	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:20mg/ml	R:1.5M MgSO ₄ Gota:20mg/ml
100 mM BME	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:20mg/ml	R:1.5M MgSO ₄ Gota:20mg/ml
150 mM BME	R: 1.3M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota: 5mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.5M MgSO ₄ Gota:10mg/ml	R: 1.3M MgSO ₄ Gota:20mg/ml	R:1.5M MgSO ₄ Gota:20mg/ml

BME=β-mercaptoetanol; R= Reservorio (MgSO₄+ 0.1M MES pH 6.6+BME); Gota (40mM Bis-Tris pH 6.5 + PZAsa)

El procedimiento de gota colgante en una placa de 24 pozos cubierto con lunas de cobertura de 22 mm de Hampton Research se realizó en una cabina (Figura 3). El reservorio fue llenado con 500 μ l de la solución a la condición evaluada y en la luna de cobertura se colocó 1 μ l de PZAsa y 1 μ l de la solución del reservorio a la condición necesitada mezclando suavemente, para evitar la formación de burbujas. La luna de cobertura fue colocada en la parte superior del precipitante, sellando el pozo (Figura 3). El procedimiento fue repetido con los pozos siguientes con las condiciones evaluadas. Luego, unas placas fueron ubicadas con cuidado en un lugar estable dentro del laboratorio a 25°C y otras placas a 4°C en un refrigerador con temperatura controlada. Las placas fueron revisadas periódicamente, al inicio cada día por 4 días y luego cada semana empleando un estereoscopio a 20X de aumento, en la cual se reportaron los cambios observados.

5.4 Simulación de la estructura 3D de la PZAsa K48T

La secuencia de aminoácidos de la enzima PZAsa nativa código 3PL1, fue obtenida en UniProt. En la secuencia de aminoácidos se localizó el residuo 48 de lisina (K) y se hizo el cambio por treonina (T). Luego se utilizó *AlphaFold2 colab*, una vez en la página se verificó el *Runtime* en GPU y se pegó la secuencia en el espacio de *query_sequence*. Al final se dejó todo por *default* y se puso *run all*.

VIII. RESULTADOS

6.1 Expresión de la pirazinamidasasa K48T

Se logro inducir la expresión de la PZAsa K48T como se muestra en el gel. (Figura 4)

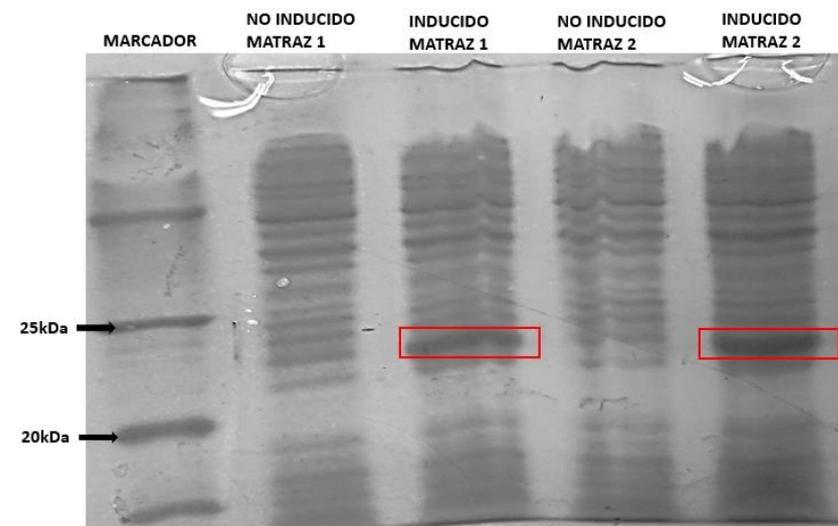


Figura 4. Expresión de la PZAsa K48T en el gel SDS-PAGE 12%. Ambos rectángulos rojos corresponden a cada banda proteica expresada.

6.2 Obtención de PZAsa purificada

Se logró inducir la expresión de la proteína K48T empleando 0.7 mM de IPTG en un periodo de 4 horas (Figura 4). La proteína se obtuvo en un volumen de 20 ml. El gel SDS-PAGE 12% mostro la presencia de una banda única correspondiente a la proteína de interés (Figura 5) en el carril con Imidazol 60 mM. La actividad enzimática de las fracciones fue verificada a través del ensayo de Wayne cualitativo (Figura 6), el cual detecta la liberación de POA por la actividad de la enzima PZAsa (26).

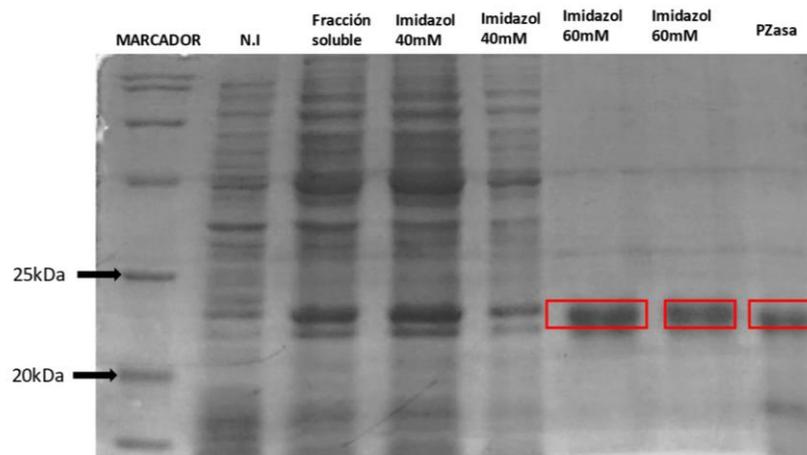


Figura 5. Eluidos de la purificación de la PZAsa K48T. N.I = no inducido

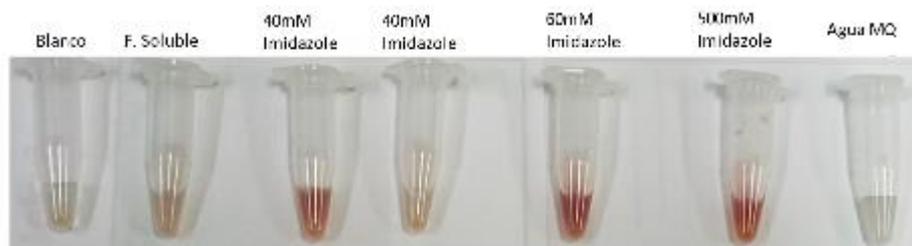


Figura 6. Ensayo de Wayne de los eluidos recolectados.

Las fracciones que se concentraron fueron las obtenidas con imidazol 60 mM. La concentración de la PZAsa luego de ser concentradas en 50 μ l de buffer Bis-Tris a pH 6.5 fue de 29.5 mg/ml y a pH 6 fue de 27.3 mg/ml. Los ensayos de actividad de Wayne cualitativo mostraron coloración rojiza para ambas proteínas concentradas. (Figura 7)

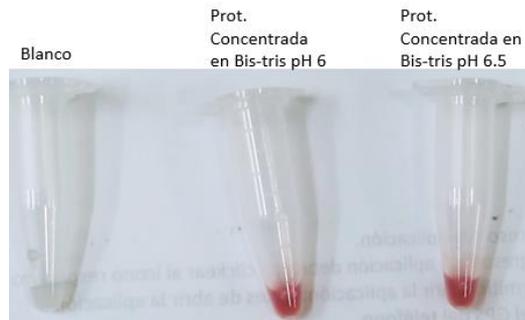


Figura 7. Ensayo de Wayne de la PZAsa concentrada en Bis-Tris, pH 6 y 6.5

La presencia de las diferentes muestras de PZAsa usadas en la cristalización son mostradas en la Figura 8. Los carriles de la A a la E muestran tres bandas pertenecientes a las diferentes conformaciones de la PZAsa: monómero, dímero y trímero. La banda con aproximadamente 60 kDa son los trímeros, la banda a 37 kDa los dímeros y por último la banda de aproximadamente 20 kDa son los monómeros (18).

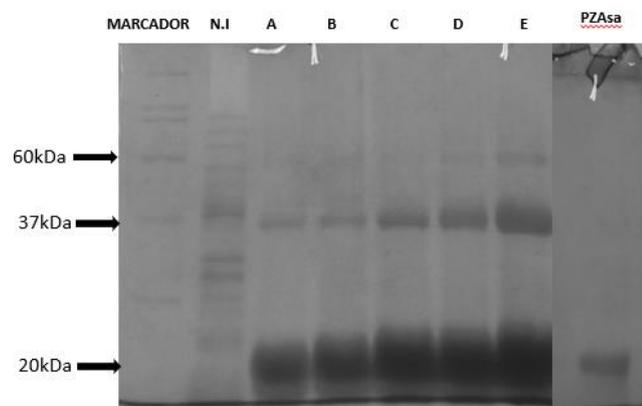


Figura 8. Pirazinamidasa K48T concentrada en el gel SDS-PAGE 12%. N.I no inducido; (A) 5 mg/ml de PZAsa a pH 6 y (B) pH 6.5; (C) 10 mg/ml de PZAsa a pH 6 y (D) a pH 6.5; (E) 20 mg/ml de PZAsa a pH 6.5

6.3 Condición 1: Efecto del pH (pH 6-6.5), concentración de PZAsa (10-5 mg/ml) y BME (anexo 1)

Los ensayos sin BME muestran precipitación blanquecina a diferencia de las muestras con BME. En las muestras con BME y a pH 6.5 se observó separación de fases conocida como pelota de golf (Figura 9) con 5 y 10 mg/ml de PZAsa; mientras que a pH 6 se observó precipitación blanquecina a 4°C y 25°C (Figura 9 y 10).

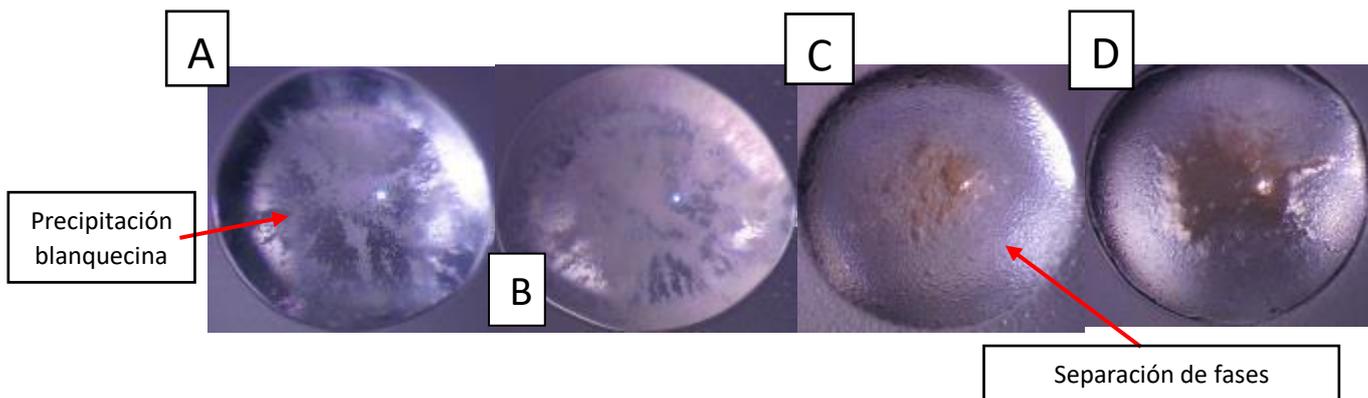


Figura 9. Gotas de la condición 1: Efecto del pH y concentración de PZAsa a 25°C.
A. Sin BME pH 6.5 PZAsa 10 mg/ml, **B.** Con BME pH 6 PZAsa 5 mg/ml, **C.** Con BME pH 6.5 PZAsa 5 mg/ml, **D.** Con BME pH 6.5 PZAsa 10 mg/ml. Vistas con estereoscopio a 20X.

Cabe notar que en la separación de fase a 25°C se observó una coloración naranja, que se debe a la degradación de la proteína; a diferencia del proceso a 4°C con las mismas condiciones (10 mg/ml de PZAsa), ambos con BME (Figura 10).

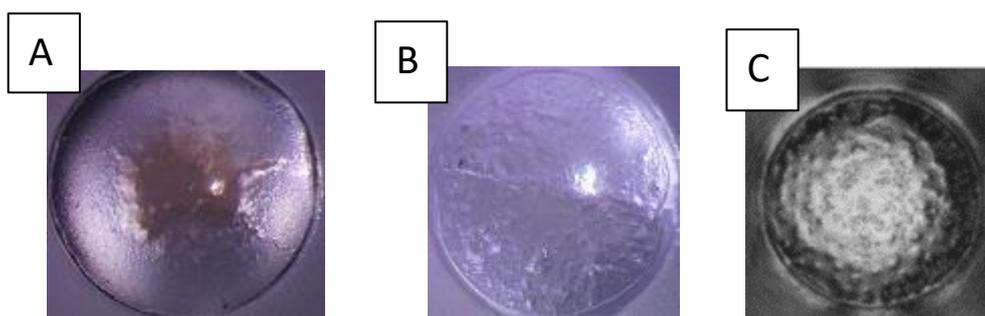


Figura 10. Separación de fases de la condición 1: PZAsa 10 mg/ml pH 6.5. **A.** 25°C; **B.** 4°C y **C.** Imagen de Separación de fases conocida como pelota de golf. Fuente: Calero, G (2014) Vistas con estereoscopio a 20X.

6.4 Condición 2: Efecto de la concentración de MgSO₄ (1.3-1.5 M) en relación a la concentración de PZAsa (5-10 mg/ml) (anexo 2)

Efecto del precipitante MgSO₄. Después de 2 meses de incubación se obtuvieron precipitados blancos en las gotas sin BME a 4 y 25°C con MgSO₄ 1.3 M (Figura 11A y

11B); por el contrario, las gotas con MgSO_4 1.5 M presentaron separación de fases en ambas temperaturas (Figura 11C); más resaltante aun, con MgSO_4 1.5 M, 25°C y 5 mg/ml se obtuvieron formaciones circulares similares a *Spherulites* reportadas (Figura 11D).

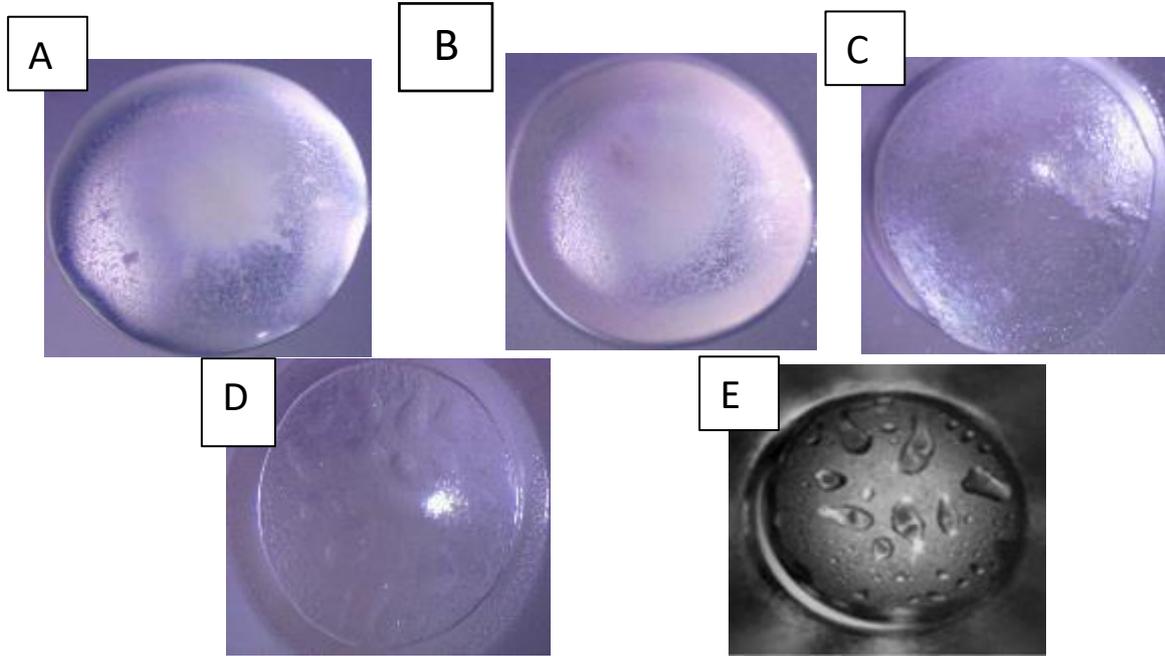


Figura 11: Gotas en la condición 2: A. sin β -ME MgSO_4 1.3 M PZAsa 10 mg/ml 25°C , B. MgSO_4 1.3 M PZAsa 10 mg/ml 25°C , C. MgSO_4 1.5 M PZAsa 10 mg/ml 4°C , D. MgSO_4 1.5 M PZAsa 5 mg/ml 25°C , E. Imagen de *Spherulites*. Fuente: Calero, G (2014) Vistas con estereoscopio a 20X.

En el seguimiento de las *spherulites*, se puede observar que con el tiempo aumentan de tamaño y se hacen menos circulares, adquiriendo otras formas (Figura 12).

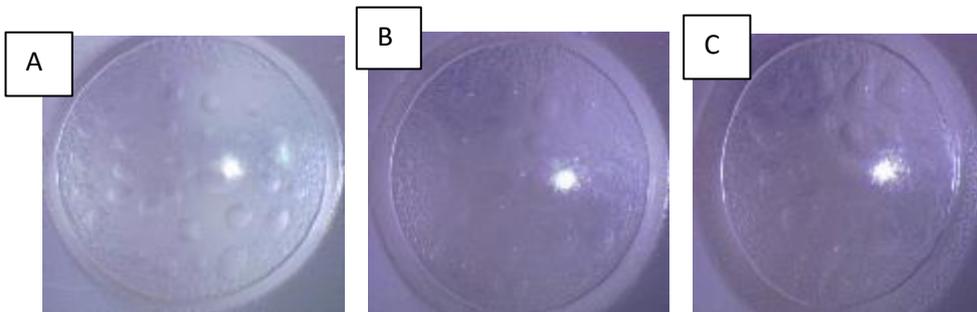


Figura 12: *Spherulites* formadas con MgSO_4 1.5M y PZAsa 5mg/ml 25°C . A. 1 mes, B. 1 mes y dos semanas, C. 2 meses. Vistas con estereoscopio a 20X.

6.5 Condición 3: Evaluación de diferentes concentraciones de proteína (5, 10 y 20 mg/ml) a diferentes concentraciones de MgSO₄ y β-ME (Anexo 3)

Uno de los resultados recurrentes es del precipitado blanquecino en las muestras sin BME para todas las experiencias y a ambas temperaturas luego de 2 meses de incubación. De acuerdo a los resultados previos en los que también sin BME se obtiene lo mismo (Figura 13).

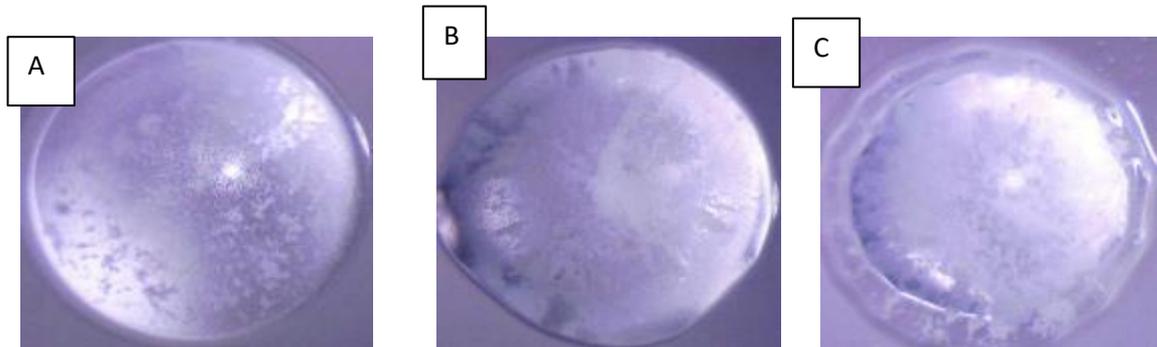


Figura 13. Ensayos sin BME. A. MgSO₄ 1.5 M 5 mg/ml de PZAsa, B. MgSO₄ 1.5 M 10 mg/ml de PZAsa, C. BME MgSO₄ 1.5 M 20 mg/ml de PZAsa. Vistas con estereoscopio a 20X.

Concentración de PZAsa de 5 mg/ml. Con 5mg/ml de PZAsa se obtuvo separación de fases tanto a 4°C y 25°C, pero con 100 mM de BME y 1.5 M MgSO₄; además a 4°C se tuvieron separación de fases para gotas con 150 mM de BME en ambas concentraciones de MgSO₄, pero con presencia de precipitado blanquecino para 1.3 M MgSO₄; estos resultados de separación de fases son alentadores para tomar en cuenta las condiciones usadas y obtener *Spherulites* posteriormente (Figura 14).

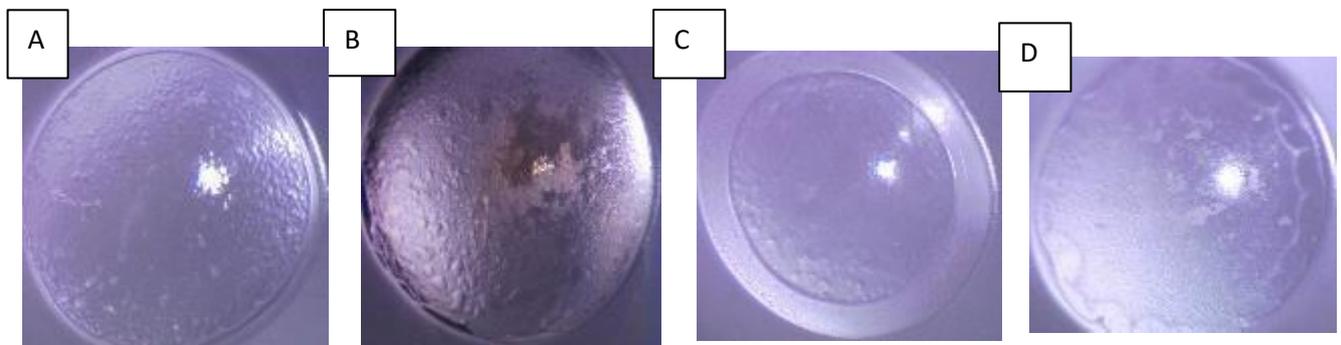


Figura 14. Separación de fases con 5 mg/ml de PZAsa. A. 100 mM BME MgSO₄ 1.5 M 4°C, B. 100 mM BME MgSO₄ 1.5 M 25°C, C. 150 mM BME MgSO₄ 1.3 M 4°C, D. 150 mM BME MgSO₄ 1.5 M 4°C. Vistas con estereoscopio a 20X.

Concentración de PZAsa de 10 mg/ml. En 100 y 150 mM de BME, 1.5 M $MgSO_4$ a $4^\circ C$ se observó separación de fases. Un resultado resaltante es la obtención de pequeñas *spherulites* a $25^\circ C$ con 150 mM de BME y 1.5 M $MgSO_4$ (Figura 15).

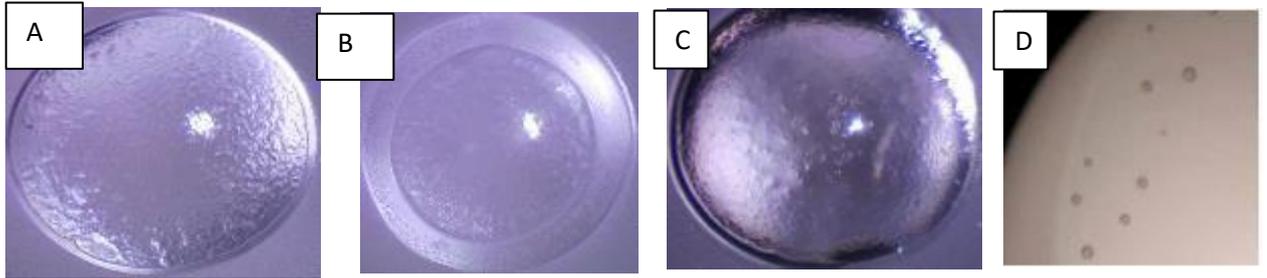


Figura 15: resultados de separación de fase y formación de *spherulites* a 10 mg/ml de PZAsa. **A.** 100 mM BME $MgSO_4$ 1.5 M $4^\circ C$, **B.** 150 mM BME $MgSO_4$ 1.5 M $4^\circ C$, **C.** 150 mM BME $MgSO_4$ 1.5 M $25^\circ C$. Vistas con estereoscopio a 20X, **D.** imagen de *Spherulites* a mayor acercamiento y de dimensiones menores. Fuente: Benvenuti, M (2007).

Concentración de PZAsa de 20 mg/ml. Con 20 mg/ml de PZAsa también se obtuvo separación de fases a $4^\circ C$, 100 y 150 mM de BME con 1.5 M $MgSO_4$; más resaltante aún la formación de *spherulites* en dos resultados de diferente condición, pero a misma temperatura $25^\circ C$; 100 mM de BME 1.3 M $MgSO_4$ y 150 mM de BME 1.5 M $MgSO_4$ (Figura 16).

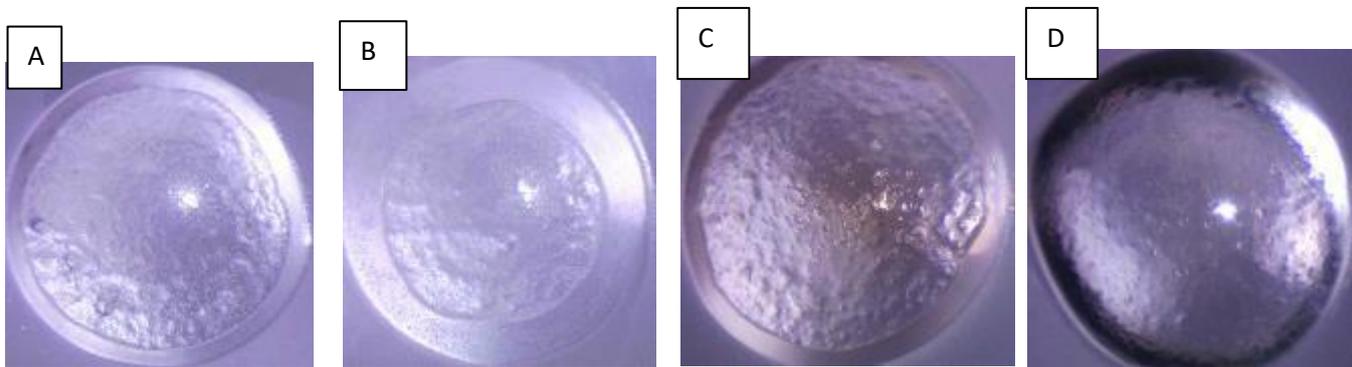
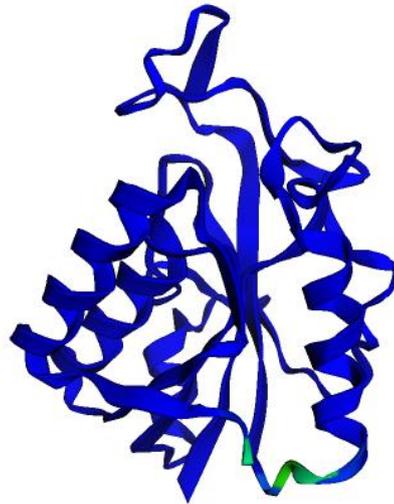


Figura 16. Separación de fase y formación de *spherulites* a 20 mg/ml de PZAsa. **A.** 100 mM BME, 1.5 M $MgSO_4$ a $4^\circ C$, **B.** 150 mM BME 1.5 M $MgSO_4$ a $4^\circ C$, **C.** 100 mM BME 1.3 M $MgSO_4$ a $25^\circ C$, **D.** 150 mM BME 1.5 M $MgSO_4$ a $25^\circ C$. Vistas con estereoscopio a 20X.

8.1 Estructura generada mediante *Alphafold2 colab*

De acuerdo a lo observado en la figura generada presenta alfa y beta hélices en la estructura. La predicción evaluada presenta >90 de confiabilidad.



plDDT: ■ Very low (<50) ■ Low (60) ■ OK (70) ■ Confident (80) ■ Very high (>90)

Figura 17: Estructura 3D generada mediante AlphaFold2 colab. La guía de colores muestra la confiabilidad en toda la estructura según los parámetros usados por la IA.

IX. DISCUSIÓN

La metodología usada para obtener las condiciones necesarias de optimización en la formación de *spherulites* presenta puntos clave a lo largo del proceso como la obtención de proteína concentrada homogénea y lo más pura posible para evitar interferencia en el proceso de cristalización (27). Teniendo en base los buffers, precipitantes y concentraciones usadas en el estudio de Petrella et. al. (2011).

En primer lugar la mutación que posee esta PZAsa en el residuo 48 que intercambia la lisina por una treonina, proporciona resultados más alentadores (formación de *Spherulites*) que cuando se realiza los experimentos con la proteína nativa; esto debido a el método SER que es la reducción de la entropía de la superficie, en la cual se aplica a mutaciones singulares a residuos expuestos en la superficie, estas mutaciones son generalmente el cambio de aminoácidos flexibles como la lisina por otros rígidos como

la treonina o tirosina. El disminuir la entropía facilita el ordenamiento de las proteínas para lograr ser cristalizadas (22).

Un resultado resaltante obtenido en todos los ensayos y a todas las condiciones, es como el uso de BME proporcionaba separación de fases o en el mejor de los casos *Spherulites*, pero en las condiciones donde no se añadió BME al reservorio no había mayor resultado que precipitados o gotas claras. Este resultado es debido a que BME, un agente reductor y antioxidante, tiene como objetivo reducir los puentes disulfuro que se encuentran formando los dímeros y trímeros de la enzima pirazinamidasas y así obtener monómeros para tener una muestra más uniforme (18). Para los experimentos que realicé la concentración de 100mM de BME se tuvieron resultados satisfactorios por ello a partir de esa concentración sería lo mínimo necesario para obtener una muestra de proteína más uniforme y es un aditivo importante que se consideró en los experimentos que realicé modificando las condiciones base que usó de Petrella et. al. (2011).

En los tres experimentos realizados se tenían a dos temperaturas (4°C y 25°C) ya que son las temperaturas usuales en procesos de cristalización. En la Figura 9 podemos observar que a pesar que en ambas temperaturas se tiene separación de fases, al estar la muestra sometida mayor tiempo a temperatura ambiente de 25°C tiene color naranja, esto puede deberse a que la proteína se encuentra más degradado que cuando está conservada a 4°C que es la temperatura de almacenamiento de la pirazinamidasas. Sin embargo, los resultados más adecuados se obtuvieron a 25°C ya que la aparición de *spherulites* se dieron a esa temperatura. Es posible que la temperatura esté ayudando en la solubilidad de todos los componentes; pero siempre es importante controlar este parámetro porque a mayores temperaturas es muy probable que la proteína se degrada o genere cambios bioquímicos (28).

Otro aspecto importante es el pH del buffer Bis-Tris de 6.5 al cual se obtuvieron los mejores resultados y por ello se mantuvo este pH a lo largo de las otras condiciones. Se probaron en pHs cercanos a 6 que se usaron en el experimento base de Petrella et. al (2011). La pirazinamidasas es una enzima que tiene actividad óptima en un rango de pH de 6 a 7.5. Sin embargo, para hacer diversos experimentos con esta proteína no necesariamente tienen que estar entre esos pH, pero sí evitar un pH donde la proteína se

desnaturalice (18,21,29). De acuerdo a ello era de esperarse que a pH 6.5 en los experimentos de cristalización se obtuvieron buenos resultados, además el uso del buffer MES que es considerado un buffer bastante estable para el desarrollo de los experimentos de cristalización que duran semanas hasta meses, como en este caso (30).

Un aspecto bastante interesante es el precipitante usado; así como en el experimento de Petrella et. al (2011) donde se tuvo al $MgSO_4$ a 1.6 M como precipitante; también en los ensayos que realicé se usó la misma sal, pero a otras concentraciones 1.3M y 1.5M. Lo que busca el precipitante es super saturar la proteína y de acuerdo al diagrama de fases llegar a un estado de nucleación en el mejor de los casos o *Spherulite* para optimizar (31). A la concentración de 1.5 M de $MgSO_4$ se obtuvieron los resultados esperados de *Spherulites* tanto a concentraciones de 5mg/ml de proteína como a 10 y 20 mg/ml; en estos casos la sal no solo cumple la función de sobresaturación sino que también al estar compuesta de un catión como el magnesio (Mg) y un anión como el sulfato (SO_4) ejerce fuerza electrostática sobre la proteína haciendo que se junten la unidades proteicas incrementando sus interacciones para formarse estructuras estables como cristales o en mi experimento *Spherulites* (32).

Por último, si bien se tomó en base las condiciones usadas por Petrella et. al (2011), no se llegó a tener cristales como en esa investigación, ya que se usó la mutante de PZAsa; sin embargo, gracias al experimento base que se tenía se pudo optimizar ciertas condiciones del precipitante o pH para lograr resultados de *Spherulites* que son alentadores para una próxima cristalización. Del mismo modo la ayuda tecnológica de Alphafold es importante; ya que así, podemos compararla con la futura estructura experimental que se pueda obtener.

X. CONCLUSIONES

- El pH del tampón Bis-Tris en la que se encontró mayor formación de *Spherulites* fue pH 6.5.
- La concentración de $MgSO_4$ en la que se encontró mayor formación de *Spherulites* fue de 1.5M.
- La temperatura en la que se encontró mayor formación de *Spherulites* fue a 25°C.

- Las concentraciones de pirazinamidas K48T con mayor formación de *Spherulites* fueron 10 mg/ml y 20 mg/ml, con mejores resultados a 10 mg/ml.
- Las concentraciones BME en la que se encontró mayor formación de *Spherulites* fueron de 100 mM y 150 mM, tomando a 100 mM como concentración óptima para los experimentos.
- En conjunto todos los factores asociados al proceso de cristalización interactuaron juntos y mediante ensayos de prueba y error se llegaron a obtener *Spherulites* de PZAsa K48T a 1.5M de MgSO₄, 100 mM de BME, 5, 10 y 20mg/ml de PZAsa a pH 6.5 de buffer Bis TRIS a 25°C.

XI. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados y de la prueba de los diferentes factores teniendo en cuenta los ensayos sería posible seguir con la optimización, pero para cristalizar la PZAsa K48T e incluso las otras mutantes existentes. Además, el uso de otras técnicas de purificación, exclusión por tamaño por ejemplo podrían ayudar a obtener la enzima más pura, uniforme y estable sin la cola de histidinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boodhun. Seeing is believing: structures and functions of biological modules. TechNews. 2018;64:143–6.
2. Holmes KC. Structural biology. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. el 29 de diciembre de 1999;354(1392):1977–84.
3. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. Nucleic Acids Research. el 8 de enero de 2021;49(D1):D437–51.
4. Bittrich S, Bhikadiya C, Bi C, Chao H, Duarte JM, Dutta S, et al. RCSB Protein Data Bank: Efficient Searching and Simultaneous Access to One Million Computed Structure Models Alongside the PDB Structures Enabled by Architectural Advances. Journal of Molecular Biology. el 2 de febrero de 2023;167994.

5. Larson SB, Day JS, Cudney R, McPherson A. A novel strategy for the crystallization of proteins: X-ray diffraction validation. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. el 21 de febrero de 2007;63(3):310–8.
6. Pusey ML, Liu ZJ, Tempel W, Praissman J, Lin D, Wang BC, et al. Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. julio de 2005;88(3):359–86.
7. Drenth J. *Principles of Protein X-Ray Crystallography* [Internet]. 3a ed. Vol. 1. Paises Bajos; 2007 [citado el 1 de octubre de 2022]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=Jobr7svN0IIC&oi=fnd&pg=PR5&dq=x-ray+crystallization+of+proteins&ots=Fqir6YmWL1&sig=gn6YZzqq_8Gk6juFzinWJ8HIYIY#v=onepage&q=x-ray%20crystallization%20of%20proteins&f=false
8. Abola E, Kuhn P, Earnest T, Stevens RC. Automation of X-ray crystallography. *Nature Structural Biology*. 2000;7(SUPPL.):973–7.
9. Holcomb J, Spellmon N, Zhang Y, Doughan M, Li C, Yang Z. Protein crystallization: Eluding the bottleneck of X-ray crystallography.
10. Forsythe EL, Maxwell DL, Pusey M. Vapor diffusion, nucleation rates and the reservoir to crystallization volume ratio. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. el 1 de octubre de 2002;58(10 II):1601–5.
11. Lusty CJ. A gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography. *Journal of Applied Crystallography*. 1999;32(1):106–12.
12. Jacquamet L, Ohana J, Joly J, Borel F, Pirocchi M, Charrault P, et al. Automated analysis of vapor diffusion crystallization drops with an X-ray beam. *Structure*. julio de 2004;12(7):1219–25.
13. Ranatunga WK; DS and R Michael F. *Molecular Life Sciences*. Molecular Life Sciences. Springer New York; 2018.
14. Bergfors TM. *Protein crystallization : techniques, strategies, and tips : a laboratory manual*. International University Line; 1999. 306 p.
15. Calero G, Cohen AE, Luft JR, Newman J, Snell EH. Identifying, studying and making good use of macromolecular crystals. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. 2014;70(8):993–1008.
16. Philip Zeelen J. *Interpretation of the Crystallization Drop Results*. Germany: Max Planck Institute of Biophysics; 2007.
17. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. [citado el 30 de septiembre de 2022]; Disponible en: www.plosone.org

XII.

1. Boodhun. Seeing is believing: structures and functions of biological modules. *TechNews*. 2018;64:143–6.
2. Structural Biology - Biochemistry & Molecular Biotechnology - UMCMS [Internet]. [cited 2022 Sep 26]. Available from: <https://www.umassmed.edu/bmb/our-research/structural-biology/>
3. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*. 2021 Jan 8;49(D1):D437–51.
4. Bittrich S, Bhikadiya C, Bi C, Chao H, Duarte JM, Dutta S, et al. RCSB Protein Data Bank: Efficient Searching and Simultaneous Access to One Million Computed Structure Models Alongside the PDB Structures Enabled by Architectural Advances. *Journal of Molecular Biology*. 2023 Feb 2;167994.
5. Larson SB, Day JS, Cudney R, McPherson A. A novel strategy for the crystallization of proteins: X-ray diffraction validation. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2007 Feb 21;63(3):310–8.
6. Pusey ML, Liu ZJ, Tempel W, Praissman J, Lin D, Wang BC, et al. Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2005 Jul;88(3):359–86.
7. Jan Drenth. Principles of Protein X-Ray Crystallography. Google Libros [Internet]. [cited 2022 Oct 1]. Available from: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=Jobr7svN0IIC&oi=fnd&pg=PR5&dq=x-ray+crystallization+of+proteins&ots=Fqir6YmWL1&sig=gn6YZZzqq_8Gk6juFzinWJ8HIYIY#v=onepage&q=x-ray%20crystallization%20of%20proteins&f=false
8. Abola E, Kuhn P, Earnest T, Stevens RC. Automation of X-ray crystallography. *Nature Structural Biology*. 2000;7(SUPPL.):973–7.
9. Holcomb J, Spellmon N, Zhang Y, Doughan M, Li C, Yang Z. Protein crystallization: Eluding the bottleneck of X-ray crystallography.
10. Forsythe EL, Maxwell DL, Pusey M. Vapor diffusion, nucleation rates and the reservoir to crystallization volume ratio. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2002 Oct 1;58(10 II):1601–5.
11. Lusty CJ. A gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography. *Journal of Applied Crystallography*. 1999;32(1):106–12.

12. Jacquamet L, Ohana J, Joly J, Borel F, Pirocchi M, Charrault P, et al. Automated analysis of vapor diffusion crystallization drops with an X-ray beam. *Structure*. 2004 Jul;12(7):1219–25.
13. Ranatunga WK; DS and R Michael F. *Molecular Life Sciences*. Molecular Life Sciences. Springer New York; 2018.
14. Bergfors TM. *Protein crystallization : techniques, strategies, and tips : a laboratory manual*. International University Line; 1999. 306 p.
15. Calero G, Cohen AE, Luft JR, Newman J, Snell EH. Identifying, studying and making good use of macromolecular crystals. *Acta Crystallographica Section F:Structural Biology Communications*. 2014;70(8):993–1008.
16. Philip Zeelen J. *Interpretation of the Crystallization Drop Results*. Germany: Max Planck Institute of Biophysics; 2007.
17. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. [cited 2022 Sep 30]; Available from: www.plosone.org
18. Rueda D, Sheen P, Gilman RH, Bueno C, Santos M, Pando-Robles V, et al. Nicotinamidase/pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis* forms homo-dimers stabilized by disulfide bonds. *Tuberculosis*. 2014 Dec 1;94(6):644–8.
19. Supo-Escalante RR, Médico A, Gushiken E, Olivos-Ramírez GE, Quispe Y, Torres F, et al. Prediction of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase function based on structural stability, physicochemical and geometrical descriptors. *PLoS ONE*. 2020 Jul 1;15(7 July).
20. Olivos Ramirez GE. Predicción de la actividad enzimática de pirazinamidasa wild type y mutada de *Mycobacterium tuberculosis* guiada por modelamiento biomolecular [Internet]. [Lima, Perú]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021. Available from: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/10021/Prediccion_OlivosRamirez_Gustavo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
21. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2009 Mar;89(2):109–13.
22. Derewenda ZS. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods*. 2004 Nov 1;34(3):354–63.
23. Baird JK, Frieden RW, Meehan EJ, Twigg PJ, Howard SB, Fowles WA. Evaporation Kinetics in the Hanging Drop Method of Protein Crystal Growth. *MRS Proc*. 1986;87:231.
24. Gránásy L, Pusztai T, Tegze G, Warren JA, Douglas JF. Growth and form of spherulites. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2005 Jul;72(1 Pt 1):011605.

25. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods*. 2022 Jun;19(6):679–82.
26. Wayne LG. Simple Pyrazinamidase and Urease Tests for Routine Identification of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1974 Jan;109(1):147–51.
27. Cordara G, Krenzel U. Structure determination of lectins by X-ray crystallography - A hands-on approach. *Carbohydrate Chemistry*. 2013;39:222–46.
28. Bijelic A, Rompel A. Polyoxometalates: more than a phasing tool in protein crystallography. *ChemTexts*. 2018 Aug 28;4(3):10.
29. Zhang H, Deng JY, Bi LJ, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis nicotinamidase/ pyrazinamidase. *FEBS Journal*. 2008 Feb;275(4):753–62.
30. McPherson A, Cudney B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Oct 31;70(Pt 11):1445–67.
31. PubChem. 2-Morpholinoethanesulfonic acid hydrate [Internet]. [cited 2023 Apr 20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16218417>
32. Dumetz AC, Chockla AM, Kaler EW, Lenhoff AM. Comparative Effects of Salt, Organic, and Polymer Precipitants on Protein Phase Behavior and Implications for Vapor Diffusion. *Crystal Growth & Design*. 2009 Feb 4;9(2):682–91.