

Cristalogénesis biológica y cristalografía en la elucidación de la estructura tridimensional de las proteínas. Revisión narrativa

*Protein tridimensional structure by biological crystallogenesis and crystallography.
Narrative review*

Omar Velásquez-González ^{1,2*}, Luis Amézquita-Morataya ¹

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,

²Unidad de Química Teórica y Computacional,

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Guatemala

*Autor al que se dirige la correspondencia: velasquez_omar@usac.edu.gt

Recibido: 12 de enero 2021 / Revisión: 04 de febrero 2022 / Aceptado: 15 de septiembre 2022

Resumen

La obtención de información estructural tridimensional de una proteína es de suma importancia en campos tan variados como la bioquímica funcional, las ciencias de materiales o biomédicas. Siendo actualmente la difracción de rayos X de monocristal el estándar de oro para la consecución de este objetivo, la obtención de dicho monocristal sigue siendo un cuello de botella desde el punto de vista práctico, y poco entendido desde el punto de vista teórico. En este artículo se revisa desde la perspectiva estructural de la proteína la forma en que los rayos X permiten obtener la información estructural y las condiciones fisicoquímicas que permiten la formación de un cristal adecuado para estos experimentos.

Palabras clave: Estructura tridimensional de las proteínas, cristalogénesis biológica, cristalografía, difracción de rayos X, diseño de fármacos

Abstract

Obtaining three-dimensional structural information of a protein is of utmost importance in various fields such as functional biochemistry, materials science, or biomedical sciences. Even though single crystal X-ray diffraction is currently the gold standard for this purpose, growing said single crystal is still a bottleneck from a practical viewpoint, and not fully understood from a theoretical point of view. In this article, we review, from a protein structure perspective, the way X-rays provide structural information, and the physicochemical conditions that promote the formation of an adequate crystal for these experiments.

Keywords: Protein tridimensional structure, biological crystallogenesis, crystallography, X – ray diffraction, drug design



Introducción

Nature (s.f.) indica que la Biología Estructural es el “estudio de la estructura molecular y dinámica de las biomacromoléculas, particularmente de las proteínas y los ácidos nucleicos, así como las alteraciones en la estructura que afectan su función” (párr. 1). Por tanto, incorpora los principios de la Biología Molecular, Bioquímica y Biofísica.

Aunque esto pudiera parecer un problema de química similar a los que se observan en la química de moléculas pequeñas, no lo es (McKee et al., 2014). Esto se debe a la existencia de una jerarquización en su estructura, que además de la disposición de sus átomos y sus enlaces, está ligada directamente a interacciones intermoleculares, con el solvente e interacciones supra-moleculares con otras moléculas (Berka et al., 2009; Rose et al., 2006; Williamson, 2011). Actualmente existen alrededor de 160,000 estructuras tridimensionales (Figura 1), publicadas en el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB). De estas técnicas, la más común para resolución, en gran medida es la de Difracción de Rayos X de Monocristal, siendo actualmente la técnica principal de uso rutinario en Biología Estructural.

La formación de un cristal de proteína con fines de obtener información estructural, presenta características muy específicas tanto en los fundamentos como en las técnicas y los procesos (Rhodes, 2010). A partir de 1980 la sistematización y la formulación de modelos ha permitido el desarrollo de la llamada cristalogénesis biológica (Saridakis et al., 2002). La cristalogénesis se ha convertido en una disciplina que busca entender los principios fisicoquímicos básicos de los procesos de nucleación, cristalización, crecimiento de cristales y medir de manera cuantitativa los parámetros biofísicos y químicos que están involucrados en el crecimiento de un cristal (Giegé & Mikol, 1989).

Contenido

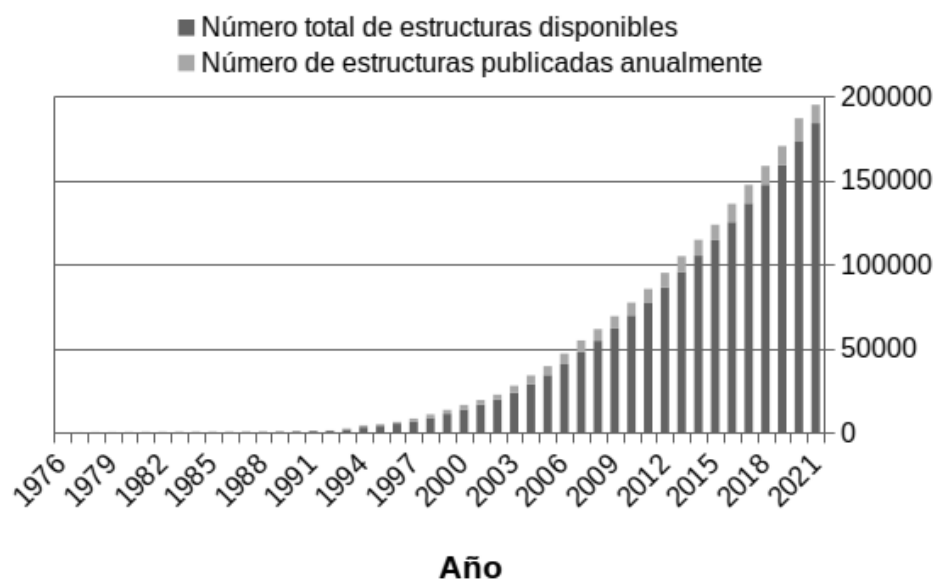
Niveles de Estructuración de una Proteína

Estructura primaria

La estructura primaria es la descripción de la secuencia de aminoácidos que conforman la proteína (Williamson, 2011), junto con modificaciones covalentes, como puentes disulfuro o fosforilaciones. Los ami-

Figura 1

Estructuras depositadas en PDB por año



Nota. Crecimiento de los depósitos de estructuras tridimensionales de Biomacromoléculas en el Protein Data Bank. Adaptado de PDB Data Distribution by Experimental Method and Molecular Type (<https://www.rcsb.org/stats/summary>). Dominio Público.

noácidos son compuestos orgánicos que contienen un grupo ácido carboxílico y una amina, unidos al mismo carbono, denominado carbono alfa (α). Este carbono se encuentra sustituido por un hidrógeno y una cadena orgánica (R). A excepción de la glicina, todos los aminoácidos naturales presentan el carbono α sustituido por cuatro diferentes radicales, haciéndolos quirales. Todos los aminoácidos naturales son L-aminoácidos como se muestra en la Figura 2 (Williamson, 2011).

Las características específicas debidas a la cadena lateral permiten que distintos residuos de la proteína tengan características químicas polares, apolares e hidrofóbicas. Además, debido a los efectos en el entorno electrónico y la presencia de grupos ácido - base en las cadenas laterales, cada residuo se encuentra en equilibrio a un pH definido (Williamson, 2011).

El heterodímero básico entre dos aminoácidos, llamado péptido, es la formación de una amida, a partir del ácido carboxílico de un aminoácido, con el grupo amino de otro. A esta condensación se le conoce como enlace peptídico. Al extenderse el número de monómeros, casi siempre quedará un grupo carboxilo y un grupo amino libres conocidos como extremos carbono y amino terminal (Williamson, 2011).

Debido a la formación del enlace peptídico en una geometría plana y rígida, se genera en la cadena principal (sin tomar en cuenta las cadenas laterales, los grupos R) dos ángulos entre los distintos planos que tienen rotación relativa entre sí, denotados como ϕ y ψ en la Figura 3. Estos enlaces diedros deben minimizar el impedimento estérico entre las cadenas laterales, por lo que se permiten solamente ciertos valores de combinaciones entre ambos (a excepción de la glicina). Esto puede ser visto, en la sección *b* de esta misma gráfica, en donde se observan zonas preferidas (sección con mayor presencia de puntos) y permitidas (sección

con menor presencia de puntos). Este gráfico, conocido como gráfico de Ramachandran, es muy útil para evaluar la estabilidad conformacional del modelo de proteína propuesto. Cualquier aminoácido que se encuentre fuera del gráfico, debe ser explicado detallada y cuidadosamente (Williamson, 2011).

Estructura Secundaria

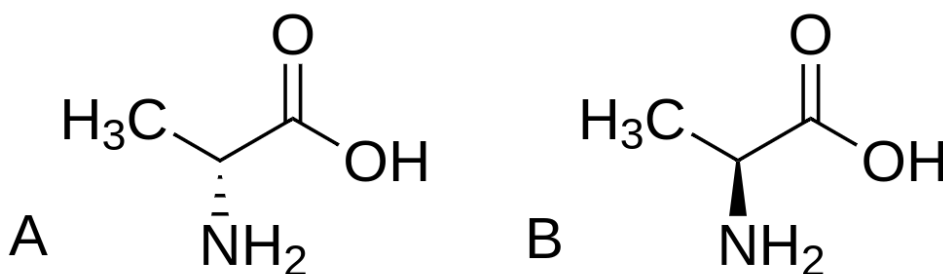
El conjunto de elementos de geometría regular de la cadena principal es conocido como estructura secundaria. Esta estructura generalmente se sostiene por interacciones intermoleculares, como puentes de hidrógeno, entre aminoácidos que se encuentran en las cercanías, con ángulos y orientaciones bien establecidas que permiten establecer topologías características. Los más comunes son las hélices alfa y láminas u hojas plegadas beta. Existe una relación directa entre la secuencia de la estructura primaria y la estructura secundaria, puesto que diferentes aminoácidos tienen tendencia a formar uno de esos elementos estructurales, por lo que puede ser predicho fácilmente (McKee et al., 2014; Williamson, 2011). Para fines ilustrativos de la jerarquía de la estructura se presentan en la Figura 4 un esquema general de la hélice alfa y la hoja plegada beta. Como se puede observar, existen enlaces de hidrógeno que permiten fijar la estructura en formas bien definidas.

Estructura Terciaria

Finalmente, la estructura terciaria es el plegamiento tridimensional completo. La estructura terciaria está íntimamente ligada a su función, siendo la más conservada. Esto se debe a que los dominios que las

Figura 2

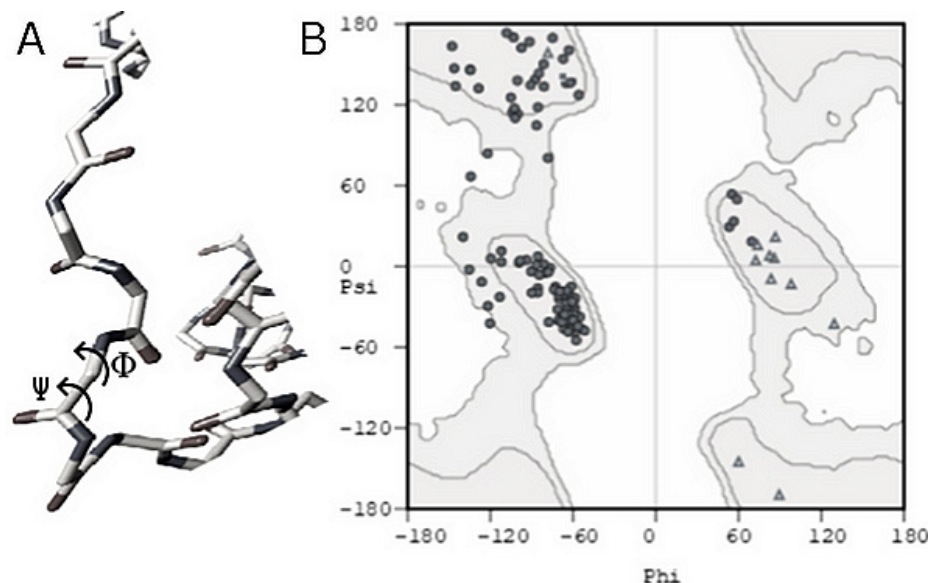
Quiralidad de los aminoácidos



Nota. 2A: L – aminoácido, 2B: D – aminoácido.

Figura 3

Combinaciones aceptadas de ángulos diedros de cadena principal



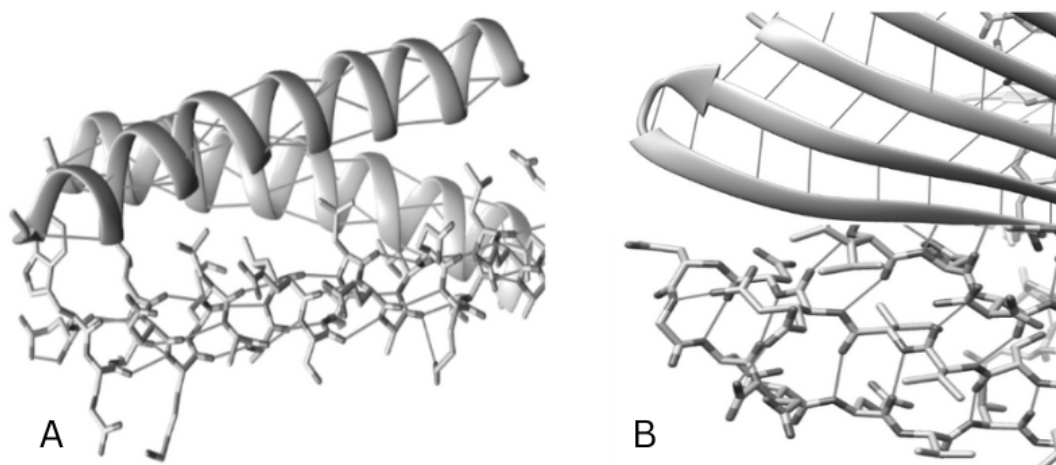
Nota. Panel A: Ángulos de la cadena principal de una proteína. Panel B: Diagrama de Ramachandran, con las relaciones de ángulos en secciones preferidas (secciones ovaladas) y aceptadas, imagen de ICRL de “Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase” por P. Grochulski y M. Cygler, 1993, *Journal of Biological Chemistry*, 268, pp. 12843-12847 creado con Coot de “Coot: model-building tools for molecular graphics” por P. Emsley, y K. Cowtan, 2004, *Acta Crystallographica. D* 60 pp. 2126-2132.

conforman se han desarrollado de manera independiente y posteriormente se conjuntan en proteínas con funciones específicas (Gihaz et al., 2018). Existe evidencia contundente de la conservación de dominios entre especies filogenéticamente muy separadas, pero con funciones similares. Por lo tanto, se puede suponer de manera análoga a la evolución de los organismos, una evolución de la estructura de las proteínas a través de la conservación de secciones más útiles y posteriores modificaciones genéticas por los mecanismos mutagénicos evolutivos conocidos, teniendo como resultado plegamientos característicos similares en prácticamente todas las estructuras de proteínas conocidas (Yeats & Orengo, 2007). Este comportamiento similar permite definir de manera termodinámica el concepto de proteína (y diferenciarse, por ejemplo, de los péptidos) a través de su plegamiento.

Se ha observado que cualquier proteína, no importando su tamaño, presenta una ruta de plegamiento parecida, en la cual la superficie de energía libre es

rápidamente muestreada y decae a su mínimo en pocos pasos (Honda et al., 2008). A nivel molecular, la fuerza motriz de este comportamiento se debe a la formación de un núcleo hidrofóbico. Cuando la estructura terciaria se está ensamblando en un medio acuoso, similar al de los organismos, la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos que forman parte de la secuencia establecen interacciones intermoleculares, conocidas como interacciones hidrofóbicas, que buscan ocultar estas secciones del agua, exponiendo los aminoácidos hidrofílicos o cargados al solvente acuoso (Burhman et al., 2003; Dror et al., 2015; Mohtashami et al., 2019; Pace et al., 2004). Esto se conoce como colapso hidrofóbico y juega un papel preponderante durante el plegamiento de las proteínas (Konieczny et al., 2006).

Del colapso hidrofóbico durante el plegamiento de una proteína surge como corolario la importancia para la estructura tridimensional de la solvatación de la proteína. Se ha observado que la capa de agua directamente en contacto con la superficie de la proteína

Figura 4*Estructuras básicas de Hélice Alfa y Hoja Plegada Beta*

Nota. Panel A: Relaciones intramoleculares de una hélice alfa, imagen de ICOS de “Crystal structure of a synthetic triple-stranded α -helical bundle” por L. Brett, C. Seunghyon, C. Duilio, K., M. D., F., D. W., y E. David, 1993, *Science*, 259, pp. 1288-1293 creado con Chimera de “UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis” por E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, y T. E. Ferrin, 2004, *Journal of Computational Chemistry*, 25, pp. 1605-1612. Panel B: Relaciones intramoleculares de una lámina (hoja) beta, imagen 1R0U de “Crystal structure of ywiB protein from *Bacillus subtilis*” de J. Osipiuk, X., Xu, A., Savchenko, A., Edwards, A., Joachimiak, Midwest Center for Structural Genomics, 2003, doi: 10.2210/pdb1R0U/pdb creado con Chimera de “UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis” por E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, y T. E. Ferrin, 2004, *Journal of Computational Chemistry*, 25, pp. 1605-1612

está tan fuertemente unida a la misma (por fuerzas intermoleculares) que puede decirse que son estructurales, sobre todo en la cercanía de un residuo cargado (Saha & Mukherjee, 2018). La dinámica de las moléculas conforme se van alejando de esta capa parece aumentar de manera discreta, modificándose dos o tres veces antes de llegar al solvente que no interacciona (Bagchi, 2005).

Este comportamiento es importante también en la presencia de solventes orgánicos, puesto que su presencia en la primera capa de solvatación, si interactúa con la capa hidrofóbica, puede bloquear el plegamiento o desnaturalizar la misma proteína. Sin embargo, en capas más alejadas, o en proteínas con secciones hidrofóbicas expuestas puede actuar como estabilizante micelar (Gomez-Puyou et al., 1992).

Difracción de Rayos X de Monocristal

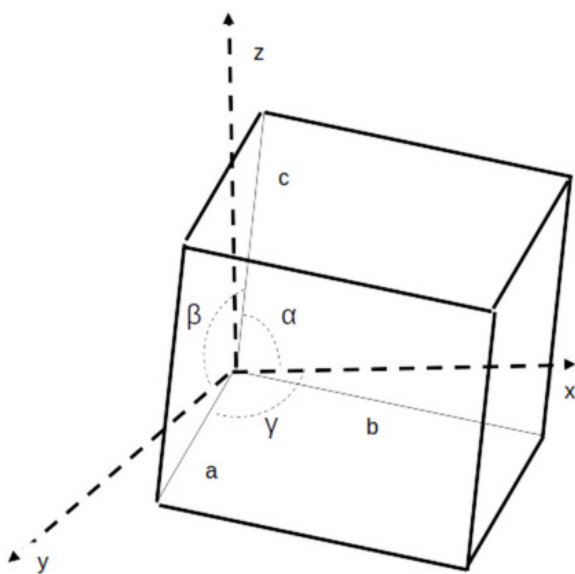
Principios de Difracción de Rayos X

La estructura de una proteína se obtiene a partir un monocristal de ésta. Un cristal de este tipo es una repetición tridimensional del mismo patrón básico, hasta llegar a dimensiones de décimas de milímetro e inclusive milímetros para uso en difracción de neutrones. En el experimento de difracción de Rayos X, el patrón repetitivo del cristal permite que la señal producida por los dispersores atómicos se magnifique. La celda unitaria (ver Figura 5) es un paralelepípedo (definido por tres vectores unidad y tres ángulos) que al trasladarse de manera periódica en tres dimensiones

reproduce el cristal por completo. En su interior contiene una o más moléculas de proteína (en este caso) que forman el cristal (Parker, 2003).

Figura 5

Celda Unitaria Modelo



Nota. Celda Unitaria Modelo. La geometría de la repetición de la sección asimétrica se puede definir por tres vectores (a , b , c) y tres ángulos (α , β , γ).

Para que la interacción de un cristal de proteína con la radiación electromagnética produzca un efecto de difracción (es realmente un fenómeno de interferencia) es necesario que la longitud de onda de la radiación sea del mismo orden de magnitud que la separación de los planos cristalográficos dentro del cristal. Esto se cumple para los rayos X cuya longitud de onda se encuentra entre 1 a 10 Å. En la Figura 6 se explica este comportamiento. Un haz de rayos X incide en un dispersor que se encuentra en una posición específica de la red cristalina. La radiación dispersada puede describirse como una onda viajera, que sale con un ángulo igual al plano de incidencia, con respecto a la normal. Este mismo fenómeno sucede con otros dispersores en diferentes posiciones. Dependiendo de la capacidad dispersiva y la distancia entre los planos en que se encuentran los dispersores, las ondas viajeras pueden interferir constructiva o destructivamente para

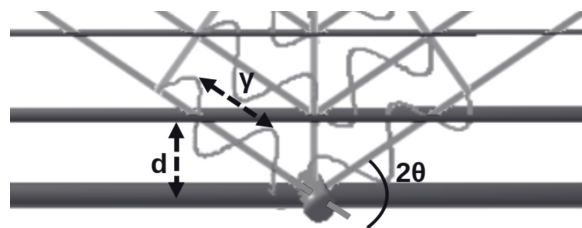
producir un patrón de interferencia específico (Parker, 2003), que depende de la diferencia de fase en la onda (representada como ϕ) y el módulo de la amplitud (F).

Si el haz incide con un ángulo θ con respecto al plano (ver Figura 7), se forman los triángulos rectángulos adyacentes entre los puntos $O - A - B - C$. Dado que los haces deben ser paralelos (estos son representados por un grupo de tres números, llamados índices de Miller, que indican en un origen cartesiano relativo, en qué lugar ocurre la intersección de los ejes por distintos planos que coinciden con algunos de los dispersores), $O - C$ y $O - B$ son perpendiculares a $A - C$ y $A - B$ respectivamente, y se obtiene que $AB = AC = d \sin \theta$. Debido a la restricción que requiere que la interferencia de las ondas sea constructiva, se tiene que $AB + AC = n\lambda = 2d \sin \theta$.

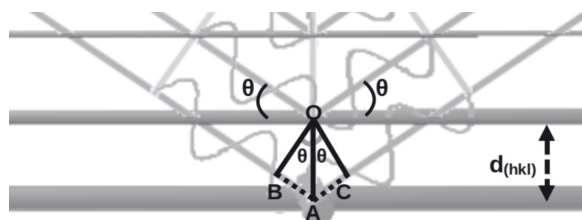
Patrón de Difracción: Espacio Recíproco y Espacio Real

En la Figura 8 se observa el resultado de colocar un detector de radiación bidimensional a una distancia determinada del cristal que se somete a un experimento de difracción. Cada reflexión en el patrón de difracción representa una posición específica, que depende de la familia de planos cristalinos con los mismos índices de Miller que sufren interferencia constructiva y dan origen a dicha reflexión (otorgando información de la posición de los dispersores). Por otro lado, la intensidad de las reflexiones es el resultado de la suma de las ondas reflejadas en fase, por lo que depende de las características de los dispersores (y por lo tanto da información de la naturaleza de los átomos ubicados sobre los planos, dado que dependen de la densidad electrónica de los mismos) (Howard & Brown, 2001).

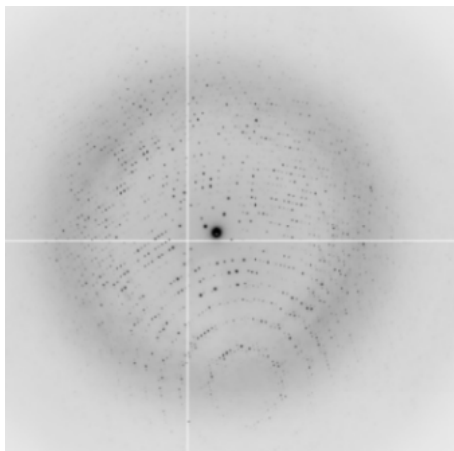
Aunque la geometría básica del cristal, a lo que se le puede llamar espacio real, se transfiere a las reflexiones del patrón de difracción en el espacio recíproco, existe una transformación del sistema que provoca que no sean idénticos. Los cambios básicos que se observan son que las dimensiones de los vectores de posición relativa en el cristal son los recíprocos de los vectores en el espacio real y que los ángulos en el espacio real son suplementarios a los ángulos en el espacio recíproco. Con base en lo expuesto, también se puede intuir que el patrón de difracción de la Figura 8 puede ser el de una proteína, puesto que el espacio entre reflexiones es pequeño (y por lo tanto este mismo espacio en el cristal es grande) (Howard & Brown, 2001).

Figura 6*Dispersión de Rayos X en un Cristal*

Nota. La estructura ordenada de los planos cristalográficos de un sólido permite que bajo ciertas condiciones geométricas los haces de rayos equis se encuentren completamente en fase.

Figura 7*Ley de Bragg. Relación entre el ángulo de incidencia y la condición de interferencia constructiva*

Nota. La geometría definida por la ley de Bragg describe detalladamente la relación entre los planos cristalográficos y los haces de rayos x estableciendo el ángulo que permite que estos últimos estén en fase.

Figura 8*Patrón de Difracción Característico para una Proteína*

Nota. Imagen de difracción típico. La gran cantidad y la distancia entre las reflexiones son características de una proteína.

Mapa de Densidad Electrónica y Elaboración del Modelo Molecular

Con base en lo discutido hasta esta sección, es evidente que es posible deducir la posición tridimensional de los dispersores a partir de la información de las reflexiones. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, dado que las reflexiones se deben a contribuciones de los planos cristalinos, teóricamente en cada reflexión existe una parte aportada por cada dispersor, y cada dispersor está diseminado en todas las reflexiones. Ya que la intensidad de una onda está dada por el cuadrado del módulo de su amplitud $F(hkl)$, conocido como factor de estructura, siendo su valor al cuadrado igual a la intensidad. Para poder separar cada contribución es necesario conocer la fase (ϕ) de la Figura 6, como puede describirse en la Ecuación 1. Sin embargo, esta información de la sumatoria se pierde durante la medición, y por tanto debe ser aproximada numéricamente, utilizando métodos heurísticos. La imposibilidad de determinar experimentalmente las fases se conoce como problema de las fases (Drenth, 2007).

$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz \quad (1)$$

En los inicios de la cristalografía de proteínas se utilizaron macromoléculas que tuvieran átomos con un número atómico alto (i.e. átomos metálicos), puesto que la intensidad de las reflexiones sería dominada por este dispersor. Si existieran varios átomos metálicos o “átomos pesados”, es entonces posible encontrar sus posiciones relativas y luego aproximar la fase del resto de los átomos mediante iteraciones sucesivas. Este método es conocido como del átomo pesado y actualmente se suele usar en la técnica de dispersión anómala (Rhodes, 2010). Es mucho más común utilizar un modelo ya publicado con secuencia similar a la proteína que se está tratando resolver y realizar las transformaciones pertinentes, como primera aproximación a las fases (Rhodes, 2010), método conocido como Reemplazo Molecular.

De la Ecuación 1 se puede deducir que, una vez establecidos los factores de estructura, es posible conocer la densidad electrónica. Dado que en realidad solamente es posible conocer de manera discreta los factores, se obtienen descripciones discretas de la densidad electrónica. La resolución de la densidad electrónica está dada entonces por la menor distancia entre dos puntos de densidad que pueden ser resueltos. Como se puede ver en la Figura 9, la resolución experimental tiene un efecto importante en la calidad del modelo

que se pueda determinar. A alta resolución se puede observar inclusive cada átomo claramente y definir la conectividad a partir de la distancia de enlace, permitiendo describir completamente tanto la cadena principal como la cadena lateral de la proteína, describiendo su estructura terciaria e inclusive sus interacciones.

Cristalogénesis Biológica

Diagrama de Solubilidad: Parámetros Termodinámicos

La cristalización es un fenómeno de transición de fase en el cual una solución de proteína es llevada a sobresaturación, ya sea cambiando la concentración de precipitante, de proteína o de aditivos, pH o temperatura (McPherson, 2004). El fenómeno se puede entender a partir de las diversas secciones de un diagrama de solubilidad (Figura 10).

1. **Insaturación:** En esta zona la concentración de proteína en las condiciones especificadas es menor a la necesaria para que la proteína cambie a una fase sólida.
2. **Sobresaturación:** En esta fase la concentración de la proteína es mayor a su solubilidad. Esto significa que una porción de la proteína saldrá de la solución y formará una especie sólida.
 - **Zona de Precipitación:** En esta zona la concentración de la proteína es tan alta que la formación del sólido es muy rápida y se forman una gran cantidad de cristales demasiado pequeños como para ser analizados por las técnicas de monocristal.
 - **Zona de Nucleación:** En esta zona se forman núcleos de cristalización, consistentes en pequeños clústeres de proteína separados de la fase continua de solución, pero que no son observables por medios ópticos.
 - **Zona Metaestable:** Una zona de baja sobresaturación, en la cual los cristales son estables y pueden crecer, pero no se forman nuevos núcleos de cristalización.

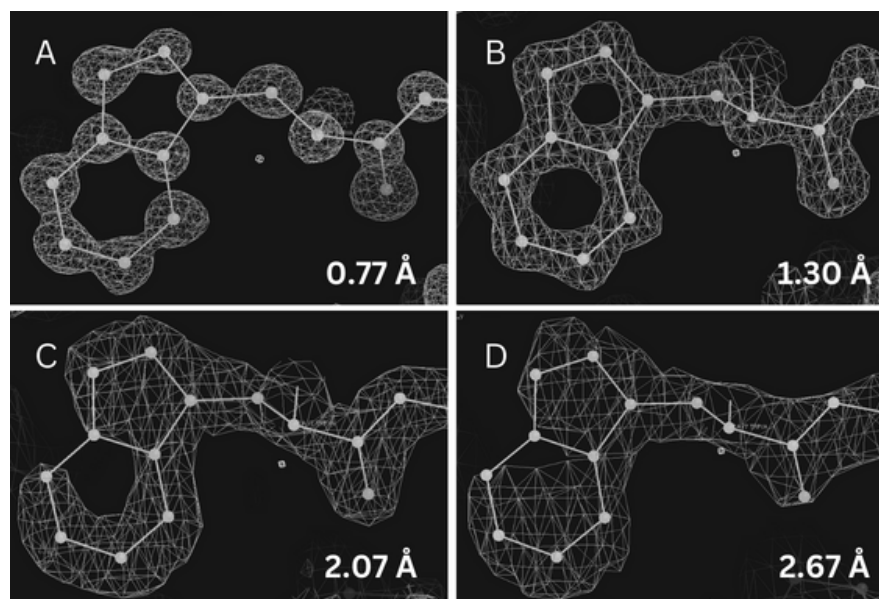
Para obtener un cristal con características adecuadas y poder adquirir datos de alta resolución, y un modelo con mucho detalle y alta calidad, es deseable que se alcance la zona de nucleación obteniéndose una baja cantidad de núcleos de cristalización y que la solu-

ción pase rápidamente a la zona metaestable (Moreno & Mendoza, 2014; Velásquez-González et al., 2019). En la zona metaestable, es preferible que el límite termodinámico de solubilidad se alcance lentamente, y que la agregación de nuevas proteínas al cristal se dé por medios exclusivamente difusivos, eliminando la convección de cualquier tipo (Chayen, 2004). Normalmente se usa un agente precipitante el cual es una especie química que compite con la proteína por el solvente. Cuando las concentraciones de proteína y de dicho agente son suficientemente altas, la proteína se separa de la solución y se asocia para formar un cristal (proceso conocido como *salting-out*, en inglés, y precipitación ordenada o precipitación, en español) (McPherson, 2004). Los agentes precipitantes se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. **Sales inorgánicas:** Forman una red con las moléculas de agua que genera que las proteínas se asocien entre sí. El efecto suele ser dominado por entalpía (McPherson, 2004).
2. **Solventes Orgánicos Volátiles:** reducen la constante dieléctrica del medio apantallando los campos eléctricos entre proteínas. Sin embargo pueden ocasionar la desnaturalización de las proteínas (McPherson, 2004).
3. **Polímeros:** produce efectos de exclusión de volumen; el espacio para que el solvente acuoso hidrate efectivamente a la proteína se reduce, generando dispersión y formación de agregados (McPherson, 2004).
4. **Solventes Orgánicos no Volátiles:** similar al de los solventes orgánicos volátiles en diseños de experimentos distintos (McPherson, 2004).

Nucleación, Crecimiento Cristalino, Efectos Cinéticos y Difusivos

Para obtener un monocristal de proteína es necesario que sucedan dos eventos consecutivos de características diferentes: la nucleación y el posterior crecimiento ordenado del núcleo cristalino (Chayen, 2004). La nucleación es la obtención, a partir de la solución sobresaturada de la proteína, de una fase separada microscópica con características de orden traslacional y rotacional distintos a la solución (García-Ruiz, 2003). Para las proteínas se han establecido dos teorías diferentes de formación de núcleos. La primera, conocida como teoría clásica de nucleación, está descrita por la separación heterogénea de fases, descrita por

Figura 9*Relación de densidad electrónica y resolución*

Nota. Descripción de la densidad electrónica en función de la longitud de onda más pequeña que el cristal produce una señal de difracción. Nótese como el mayor detalle a menor longitud de onda permite establecer más claramente la identidad molecular. Residuo de Triptófano en mioglobinas de *Physeter catodon*. Panel A: Imagen 5YCE de “Tracing whale myoglobin evolution by resurrecting ancient proteins”, de Y. Isogai, H., Imamura, S., Nakae, T., Sumi, K., Takahashi, T., Nakagawa, A., Tsuneshige, T., Shirai, 2017, *Science Report*, 8, pp. 16883-16883 creado con Coot de “Coot: model-building tools for molecular graphics” por P. Emsley, y K. Cowtan, 2004, *Acta Crystallographic. D* 60 pp. 2126-2132. Panel B: Imagen 1JW8 de “Sampling of the native conformational ensemble of myoglobin via structures in different crystalline environments”, de D. A., Kondrashov, W., Zhang, R., Aranda, B., Stec, G. N. Jr, Phillips, 2008, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70, 353-362 creado con Coot de “Coot: model-building tools for molecular graphics” por P. Emsley, y K. Cowtan, 2004, *Acta Crystallographic. D* 60 pp. 2126-2132. Panel C: Imagen 1O1M “Correlations between Bound N-Alkyl Isocyanide Orientations and Pathways for Ligand Binding in Recombinant Myoglobins. Thesis”. Panel D: Imagen 1O8M de “Correlations between Bound N-Alkyl Isocyanide Orientations and Pathways for Ligand Binding in Recombinant Myoglobins. Thesis” por R. D., Smith, 1999, creado con Coot de “Coot: model-building tools for molecular graphics” por P. Emsley, y K. Cowtan, 2004, *Acta Crystallographic. D* 60 pp. 2126-2132.

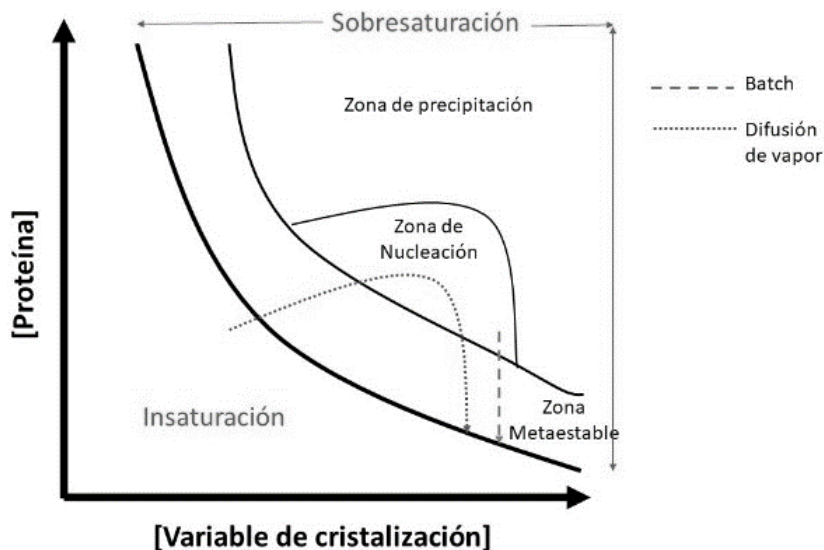
Gibbs (1878) en su forma general y aplicada por Frenkel (1939). La energética básica se puede observar en la Figura 11. La formación de un núcleo estable sucede cuando se alcanza un volumen crítico, en el cual la interacción entre los miembros del núcleo, supera a la interacción de los miembros del núcleo que forman parte de la superficie de éste e interactúan con el solvente (García-Ruiz, 2003). Fuera de la teoría clásica de nucleación se ha propuesto la existencia de una nucleación multietapa. Esta teoría propone un mecanismo de autoensamblaje debido a interacción y oligomerización

de las proteínas, para formar un líquido denso metaestable (Markov, 2016; Nanev, 2014, 2018). Como consecuencia, el proceso de nucleación no es totalmente estocástico (Bonn & Shahidzadeh, 2016).

En la Figura 12 se muestra un esquema del crecimiento de una capa cristalina, luego de que se ha formado un núcleo. La primera forma de crecer es de manera tangencial, en donde se agrega la proteína a una capa existente. La segunda es la creación de nuevos vértices, o crecimiento normal. El crecimiento tangencial es un proceso sencillo, ya que es un proceso

Figura 10

Secciones de un diagrama de solubilidad y la trayectoria de distintas técnicas de cristalización



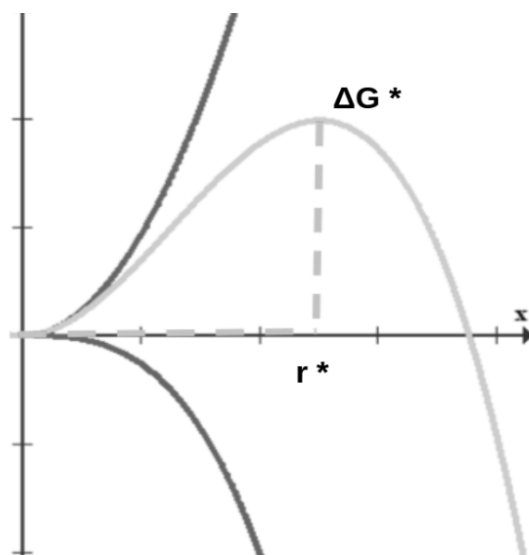
Nota. Trayectoria en el diagrama de solubilidad de las técnicas clásicas de cristalización de proteínas. Se busca llegar a una sobresaturación en la zona de nucleación y pasar rápidamente a la zona metaestable.

cooperativo favorecido por la entalpía que supone una adhesión directa al vértice existente, mientras que el crecimiento normal depende de que una capa se encuentre completamente ocupada; básicamente es un evento local de nucleación que conlleva a una mayor cantidad de imperfecciones e impurezas en el cristal. La mayoría de las proteínas (e incluso virus) generan nuevas capas a través de un proceso de crecimiento bidimensional en una superficie existente. Guiadas por un sistema ordenado basal, las moléculas del cristal en crecimiento se ordenan en arreglos cristalinos consistentes con la cara en crecimiento, denominado homoeptaxia. Un posterior crecimiento del mismo plano se da por un crecimiento tangencial en los espacios vacíos (McPherson & Kuznetsov, 2014).

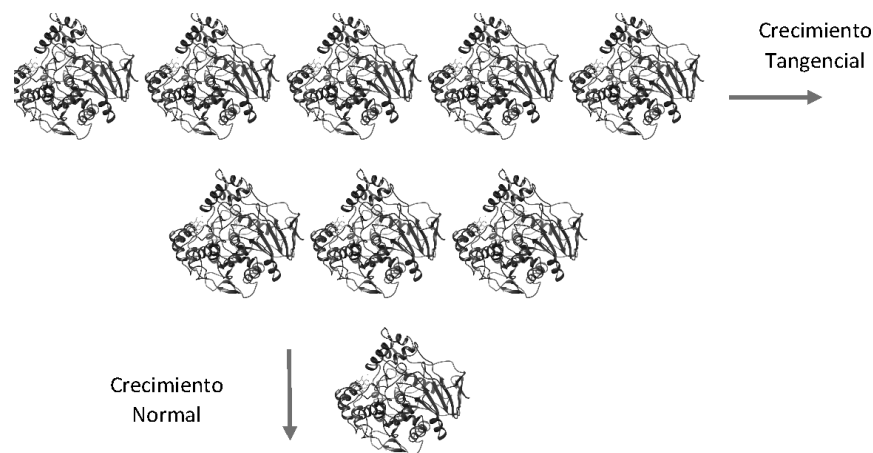
Únicamente cuando se trata de un cristal de una biomarcomolécula, existe la posibilidad de un crecimiento tridimensional, que es similar al hábito cristalino macroscópico. Cada bloque proporciona vértices para el crecimiento tangencial de la capa. El origen de este mecanismo es intrigante. Sin embargo, se ha encontrado evidencia de que se debe al mecanismo no clásico de nucleación, donde se forma una gota auto-

ensamblada, con características distintas a la solución, pero sin ser sólido. En este caso dicha gota, que aún posee características desestructuradas, pero se encuentran hiper-saturadas, al sedimentar en la superficie de un cristal en crecimiento, funciona como sustrato epitaxial (Bonn & Shahidzadeh, 2016; McPherson & Kuznetsov, 2014).

En un cristal en equilibrio con una solución de proteína, se forma una capa interfacial, en la cual esta cambia de la concentración en la solución, a la concentración del sólido (o volumen molar). La fuerza motriz de la formación del cristal es la posibilidad de las moléculas en la solución de formar asociaciones con las moléculas que se encuentran en la superficie del cristal, compensando las secciones libres. A la diferencia de energía se le denomina energía interfacial, y es el parámetro termodinámico más importante para caracterizar la cinética del cristal en crecimiento (Haas & Drenth, 2000). Los valores medidos de las soluciones de cristales de proteína son varios órdenes de magnitud menores que las presentes en soluciones de moléculas pequeñas, evidenciando que la diferencia de energía entre la solución y el cristal es pequeña.

Figura 11*Energética de Nucleación*

Nota. Compensación de la energía interfacial (trayectoria hacia arriba) por la energía internuclear (trayectoria hacia abajo).

Figura 12*Vías de crecimiento cristalino*

Nota. Crecimientos clásicos de un cristal de proteína, en el mismo plano (crecimiento tangencial) y perpendicular al plano (crecimiento normal), imagen de ICRL de “Insights into interfacial activation from an open structure of Candida rugosa lipase” por P. Grochulski y M. Cygler, 1993, *Journal of Biological Chemistry*, 268, pp. 12843-12847 creado con Coot de “Coot: model-building tools for molecular graphics” por P. Emsley, y K. Cowtan, 2004, *Acta Crystallographic*. D 60 pp. 2126-2132 creado con Chimera de “UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis” por E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, y T. E. Ferrin, 2004, *Journal of Computational Chemistry*, 25, pp. 1605-1612.

Esto puede deberse a que la hidratación de la macromolécula no varía apreciablemente en el cristal (McPherson & Kuznetsov, 2014). La formación de una zona de depleción continua en un sistema totalmente difusivo minimiza y estabiliza la sobresaturación de la interfaz entre el cristal y la solución, haciendo constante el flujo de masa e impulsando el crecimiento cristalino, lo cual favorece el arreglo cinético de las moléculas en la superficie del cristal. Por lo tanto, las condiciones de transporte difusivo de masa son claves en la obtención de cristales de muy alta calidad (Gavira et al., 2020).

Métodos de Crecimiento de Cristales

En vista de todas las variables para obtener un cristal adecuado para realizar experimentos de Biología Estructural, existen diferentes técnicas para satisfacer los criterios termodinámicos, cinéticos y difusivos. A continuación, se presentarán algunos.

Difusión en fase vapor

Las técnicas de difusión en fase vapor, en las modalidades de gota colgante y gota sedente, son las técnicas más utilizadas y exitosas para obtener cristales de proteína. En la Figura 13 se presenta un esquema de las estrategias básicas de las técnicas de difusión en fase vapor. Esta técnica consiste en el cambio de fase del solvente acuoso, debido a la diferencia de actividad entre las dos soluciones del experimento. La solución que contiene la proteína se encuentra en la gota que está separada del reservorio, con la solución amortiguadora y el agente precipitante a concentraciones menores

que el reservorio (así como cualquier otro aditivo necesario) (Curcio et al., 2008; Gavira et al., 2020). La solución del reservorio es similar en las especies a la de la gota, pero se encuentra en concentraciones más altas, y no está presente la proteína. Ello genera un gradiente de potencial químico, que ocasiona que el vapor de agua de la solución diluida migre a la solución concentrada (Rhodes, 2010).

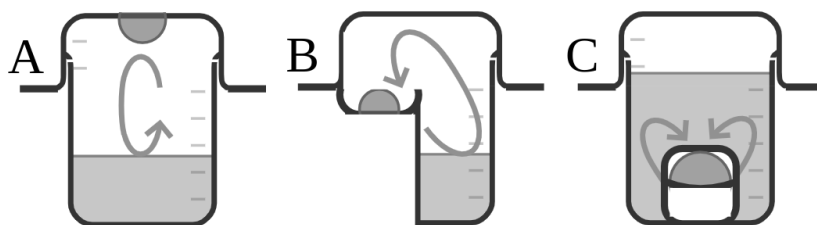
Al inicio, la solución en la gota debe encontrarse en una concentración menor a la de saturación (Ver Figura 10, trayectoria punteada). Dado que la solución del reservorio tiene una concentración mayor, tanto de la proteína como del agente precipitante, el estado termodinámico en donde alcanza el equilibrio se encuentra en la sección de nucleación. Al disminuir la concentración de proteína, por la formación de los núcleos, se alcanza la región metaestable, y el cristal puede crecer. Esta técnica es muy utilizada cuando no se conocen las condiciones exactas de cristalización, por lo que es necesario hacer un barrido de las concentraciones de proteína y agente precipitante.

Batch

En el caso de la técnica de Batch, se conoce directamente las concentraciones óptimas de nucleación y crecimiento cristalino de las soluciones de cristalización. Esto es equivalente a colocar el experimento en la sección de nucleación. El diseño del experimento es simplemente colocar una mezcla de la proteína en el amortiguador adecuado, a las concentraciones de precipitantes y aditivos. Por lo tanto, debe conocerse exactamente la condición adecuada (Ver Figura 10, trayectoria con guiones).

Figura 13

Técnicas de difusión de vapor



Nota. La difusión de vapor (trayectoria indicada por la flecha) en las técnicas de cristalización permite que la concentración de proteína y agente precipitante disminuya lentamente.

Aplicación de estructuras biológicas en el diseño de fármacos

A partir de 1980 se inició un nuevo enfoque en el diseño de fármacos las cuales debían de crearse específicamente para atacar sitios objetivo en las biomoléculas (como proteínas). Dicho proceso consiste en cuatro pasos: identificación del sitio objetivo y validación, evaluación del sitio objetivo, identificación de aciertos, y optimización de aciertos para candidatos y su respectiva optimización consecuente (Renaud, 2020). La identificación del sitio objetivo y validación parten de la estructura cristalina para llevar a cabo procesos como tamizajes fenotípicos o tamizajes por métodos basados en técnicas computacionales basados en la estructura (Renaud, 2020). En la evaluación del sitio activo se pueden utilizar métodos computacionales para identificar los mejores ligandos para un sitio objetivo (Frye et al., 2021). La identificación del acierto se torna más sencilla cuando se conoce la estructura biológica ya que con facilidad se puede identificar si existirá una mayor interacción con las nubes electrónicas del ligando (Subramaniam & Kleywegt, 2022). Los avances en este campo han alcanzado nuevos tratamientos como la degradación de proteínas objetivo (TPD por sus siglas en inglés) cuyo potencial reside en atacar proteínas que no se pueden atacar con moléculas pequeñas convencionales (e.g. cáncer) (Békés et al., 2022).

Durante el 2020 se desató la pandemia del coronavirus SARS-CoV2 (o comúnmente conocida como la enfermedad por coronavirus 19, COVID-19) y la búsqueda organizada sin precedentes de una cura que fuese capaz de contener la pandemia (Scudellari, 2020). Se inició la búsqueda de drogas por medio del enfoque SBDD (diseño de drogas basados en su estructura, por sus siglas en inglés), por lo que la cristalografía de rayos X fue indispensable para determinar la estructura de alguna proteína que, al ser inhibida, detendría el ciclo de replicación del virus. En efecto, se determinó que la estructura biológica de la proteasa M^{pro} (o 3CL) es similar a una hallada en el SARS-CoV, la cual presenta una actividad proteolítica esencial para la replicación del virus (Gao et al., 2021). Esta proteína presenta un sitio objetivo de interés para el diseño de drogas. Debido a que gran parte de la información que se ha obtenido del SARS-CoV2 es de acceso libre (Scudellari, 2020) algunos autores han usado a su favor esta ventaja para diseñar drogas que sean capaces de inhibir al virus. Un muy buen ejemplo se presenta en Zhang y colaboradores

(2020) quienes diseñaron y sintetizaron la droga UCI-1 propuesta por Kreutzer y colaboradores (2020) a partir de conocimientos empíricos de bioquímica y el PDB (5B6O) de la proteasa M^{pro}. Llevaron a cabo un análisis computacional de acoplamiento (*docking* en inglés) para calificar el poder inhibitorio de su estructura. El ejemplo es excepcional ya que tiene por objetivo incentivar a otros investigadores a buscar nuevas drogas utilizando la metodología propuesta. Actualmente, siguiendo el mismo proceso, se han hallado drogas capaces de inhibir la misma proteasa M^{pro} en cepas distintas del SARS-CoV2 como la ómicron (Quan et al., 2022).

Conclusión

La cristalografía de proteínas es el estándar de oro para obtener información acerca de la estructura tridimensional de una proteína.

Aunque la obtención de un monocristal adecuado es un cuello de botella, el uso de las herramientas de la Biología Estructural permite un acercamiento sistemático.

La aplicación de la obtención de la estructura tridimensional de una proteína es un primer paso imprescindible en el diseño de fármacos.

Contribución de los autores

Coordinación, elaboración y revisión del Documento: Todos los autores

Limpieza, sistematización, análisis o visualización de datos: Todos los autores

Participación en análisis de datos, estructura y en la escritura del documento: Todos los autores

Materiales suplementarios

Este artículo no tiene archivos complementarios.

Referencias

- Bagchi, B. (2005). Water dynamics in the hydration layer of biomolecules and self-assembly. *Chemical Reviews*, 105(9), 3197-3219. <https://doi.org/10.1021/cr020661>

- Békés, M., Langley, D. R., & Crews, C. M. (2022). PROTAC targeted protein degraders: The past is prologue. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(3), 181-200. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>
- Berka, K., Hobza, P., & Vondrášek, J. (2009). Analysis of energy stabilization inside the hydrophobic core of rubredoxin. *ChemPhysChem*, 10(3), 543-548. <https://doi.org/10.1002/cphc.200800401>
- Bonn, D., & Shahidzadeh, N. (2016). Multistep crystallization processes: How notto make perfect single crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), 13551-13553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616536113>
- Brett, L., Seunghyon, C., Duilio, C., K., M. D., F., D. W., & David, E. (1993). Crystal structure of a synthetic triple-stranded α -helical bundle. *Science*, 259(5099), 1288-1293. <https://doi.org/10.1126/science.8446897>
- Burhman, G., de Serrano, V., & Mattos, C. (2003). Organic solvents order the dynamic switch II in Ras crystals. *Structure*, 11(7), 747-751. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00128-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00128-X)
- Chayen, N. E. (1998). Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 54(1), 8-15. <https://doi.org/10.1107/S0907444997005374>
- Chayen, N. E. (2004). Turning protein crystallisation from an art into a science. In *Current Opinion in Structural Biology*, 14(5), 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.08.002>
- Curcio, E., Di Profio, G., & Drioli, E. (2008). Probabilistic aspects of polymorph selection by heterogeneous nucleation on microporous hydrophobic membrane surfaces. *Journal of Crystal Growth*, 310(24), 5364-5369. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2008.09.030>
- Drenth, J. (2007). The Solution of the Phase Problem by the Isomorphous Replacement Method. In *Principles of Protein X-Ray Crystallography* (pp. 123-171). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-33746-6_7
- Dror, A., Kanteev, M., Kagan, I., Gihaz, S., Shahar, A., & Fishman, A. (2015). Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9449-9461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-015-6700-4>
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica section D: biological crystallography*, 60(12), 2126-2132.
- Frenkel, J. (1939). A general theory of heterophase fluctuations and pretransition phenomena. *The Journal of Chemical Physics*, 7(7), 538-547. <https://doi.org/10.1063/1.1750484>
- Frye, L., Bhat, S., Akinsanya, K., & Abel, R. (2021). From computer-aided drug discovery to computer-driven drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 39, 111-117. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2021.08.001>
- García-Ruiz, J. M. (2003). Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*, 142(1), pp. 22-31). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00035-2)
- Gao, K., Wang, R., Chen, J., Tepe, J. J., Huang, F., & Wei, G. W. (2021). Perspectives on SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(23), 16922-16955. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C00409>
- Gavira, J. A., Otálora, F., González-Ramírez, L. A., Melero, E., van Driessche, A. E. S., & García-Ruiz, J. M. (2020). On the quality of protein crystals grown under diffusion mass-transport controlled regime (I). *Crystals*, 10(2), 1-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cryst10020068>
- Gibbs, J. W. (1878). On the Equilibrium of Heterogeneous Substances. *American Journal of Science and Arts*, 16(96), 441.
- Giegé, R., & Mikol, V. (1989). Crystallogenesis of proteins. *Trends in Biotechnology*, 7(10), 277-282. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(89\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0167-7799(89)90047-4)
- Gihaz, S., Kanteev, M., Pazy, Y., & Fishman, A. (2018). Filling the void: Introducing aromatic interactions into solvent tunnels towards lipase stability in methanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(23), Artículo e02143-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02143-18>
- Gomez-Puyou, A., Darzon, A., & Tuena de Gomez-Puyou, M. (1992). *Biomolecules in organic solvents*. CRC Press.

- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., & Cygler, M. (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12843-12847. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31464-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31464-9)
- Haas, C., & Drenth, J. (2000). The Interface between a Protein Crystal and an Aqueous Solution and Its Effects on Nucleation and Crystal Growth. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(2), 368-377. <https://doi.org/10.1021/jp993210a>
- Honda, S., Akiba, T., Kato, Y. S., Sawada, Y., Sekijima, M., Ishimura, M., Ooishi, A., Watanabe, H., Odahara, T., & Harata, K. (2008). Crystal structure of a ten-amino acid protein. *Journal of the American Chemical Society*, 130(46), 15327-15331. <https://doi.org/10.1021/ja8030533>
- Howard, G. C., & Brown, W. E. (2001). *Modern protein chemistry: Practical aspects*. CRC Press.
- Isogai, Y., Imamura, H., Nakae, S., Sumi, T., Takahashi, K. I., Nakagawa, T., ... & Shirai, T. (2018). Tracing whale myoglobin evolution by resurrecting ancient proteins. *Scientific reports*, 8(1), 1-14. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34984-6>
- Kondrashov, D. A., Zhang, W., Aranda IV, R., Stec, B., & Phillips Jr, G. N. (2008). Sampling of the native conformational ensemble of myoglobin via structures in different crystalline environments. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70(2), 353-362. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.21499>
- Konieczny, L., Brylinski, M., & Roterman, I. (2006). Gauss-function-based model of hydrophobicity density in proteins. *In Silico Biology*, 6(1-2), 15-22.
- Kreutzer, A. G., Krumberger, M., Marie, C., Parrocha, T., Morris, M. A., Guaglianone, G., & Nowick, J. S. (2020). *Structure-Based Design of a Cyclic Peptide Inhibitor of the SARS-CoV-2 Main Protease*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.03.234872>
- Markov, I. (2016). *Crystal growth for beginners: Fundamentals of nucleation, crystal growth and epitaxy* (3rd ed.). World Scientific Publishing.
- McKee, T., McKee, J., Araiza Martínez, M., & Hurtado Chong, A. (2014). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida* (5th ed.). McGrawHill.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34(3), 254-265. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.019>
- McPherson, A., & Kuznetsov, Y. G. (2014). Mechanisms, kinetics, impurities and defects: Consequences in macromolecular crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(4), 384-403. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14004816>
- Mohtashami, M., Fooladi, J., Haddad-Mashadrizheh, A., Housaindokht, M., & Monhemi, H. (2019). Molecular mechanism of enzyme tolerance against organic solvents: Insights from molecular dynamics simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122(1), 914-923. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.172>
- Moreno, A., & Mendoza, M. E. (2014). Crystallization in gels. En P. Rudolph (Ed.), *Handbook of crystal growth: Bulk crystal growth* (2nd ed., pp. 1277-1315). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63303-3.00031-6>
- Nanev, C. C. (2014). On the elementary processes of protein crystallization: Bond selection mechanism. *Journal of Crystal Growth*, 402, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2014.05.030>
- Nanev, C. C. (2018). Peculiarities of protein crystal nucleation and growth. *Crystals*, 8(11), Artículo 422. <https://doi.org/10.3390/cryst8110422>
- Nature. (s.f.). Structural Biology. *Nature portfolio*. <https://www.nature.com/subjects/structural-biology>
- Osipiuk, J., Xu, X., Savchenko, A., Edwards, A., Joachimiak, A., & Midwest Center for Structural Genomics. (2011). *Crystal structure of ywiB protein from Bacillus subtilis* (1R0U; Version 1.2) [Conjunto de datos]. RCSB PDB. <https://www.rcsb.org/structure/1R0U>
- Pace, C. N., Treviño, S., Prabhakaran, E., & Scholtz, J. M. (2004). Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1448), 1225-1235. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1500>
- Parker, M. W. (2003). Protein Structure from X-Ray Diffraction. *Journal of Biological Physics*, 29(4), 341-362. <https://doi.org/10.1023/A:1027310719146>

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Quan, B.-X., Shuai, H., Xia, A.-J., Hou, Y., Zeng, R., Liu, X.-L., Lin, G. F., Qiao, J.-X., Li, W.-P., Wang, F.-L., Wang, K., Zhou, R.-J., Yuen, T. T.-T., Chen, M.-X., Yoon, C., Wu, M., Zhang, S.-Y., Huang, C., Wang, Y.-F., ... Yang, S. (2022). An orally available Mpro inhibitor is effective against wild-type SARS-CoV-2 and variants including Omicron. *Nature Microbiology*, 7, 716-725. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01119-7>
- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank. (2021). *PDB statistics: Overall growth of released structures per year* [Conjunto de datos]. <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures>
- Renaud, J.-P. (2020). *Structural biology in drug discovery: Methods, techniques, and practices*. En J.-P. Renaud (Ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118681121>
- Rhodes, G. (2010). *Crystallography made crystal clear* (3rd ed.). Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/crystallography-made-crystal-clear/rhodes/978-0-12-587073-3>
- Rose, G. D., Fleming, P. J., Banavar, J. R., & Maritan, A. (2006). A backbone-based theory of protein folding. En J. Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine & Baltimore (Eds.), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 103, Issue 45, pp. 16623-16633). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606843103>
- Saha, D., & Mukherjee, A. (2018). Effect of water and ionic liquids on biomolecules. *Biophysical Reviews*, 10(3), 795-808. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0399-2>
- Saridakis, E., Dierks, K., Moreno, A., Diekmann, M., & Chayen, N. (2002). Separating nucleation and growth in protein crystallization using dynamic light scattering. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(10), 1597-1600. <https://doi.org/10.1107/S0907444902014348>
- Scudellari, M. (2020, 15 May). *The sprint to solve coronavirus protein structures - and disarm them with drugs*. *News Feature*. <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01444-z>
- Smith, R. D. (1999). Correlations between bound N-alkyl isocyanide orientations and pathways for ligand binding in recombinant myoglobins [Tesis doctoral, Rice University].
- Subramaniam, S., & Kleywegt, G. J. (2022). A paradigm shift in structural biology. *Nature Methods*, 19(1), 20-23.
- Velásquez-González, O., Campos-Escamilla, C., Flores-Ibarra, A., Esturau-Escofet, N., Arreguin-Espinosa, R., Stojanoff, V., Cuéllar-Cruz, M., & Moreno, A. (2019). Crystal growth in gels from the mechanisms of crystal growth to control of polymorphism: New trends on theoretical and experimental Aspects. *Crystals*, 9(9), Artículo 443. <https://doi.org/10.3390/cryst9090443>
- Williamson, M. (2011). *How proteins work*. Garland Science.
- Yeats, C. A., & Orengo, C. A. (2007). Evolution of protein domains. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020202>
- Zhang, S., Krumberger, M., Morris, M. A., Parrocha, C. M. T., Griffin, J. H., Kreutzer, A., & Nowick, J. S. (2020). *Structure-Based drug design of an inhibitor of the SARS-CoV-2 (COVID-19) main protease using free software: A tutorial for students and scientists*. ChemRxiv. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12791954>