



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Monterrey

Efectos de la radiación UV-Vis en proteínas globulares

Tesis que presenta

M. en C. Juan Horacio Espinoza Rodríguez

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias
en Ingeniería y Física Biomédicas

Director de Tesis:

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi periodo de estudios de doctorado.

A mi tutora de tesis, la Dra. Hilda J. Mercado Uribe por brindarme la oportunidad de aventurarnos en este proyecto que se partió de cero.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Monterrey, así como a los profesores que con mayor o menor medida contribuyeron en mi formación académica.

A la Dra. Elizabeth Reynaga por orientarme en la parte biológica del proyecto. Al Dr. José Sampedro por las facilidades para realizar las mediciones de dicroísmo circular. Así, como a mi sinodal externo el Dr. Jaime Ruiz, por las sugerencias a este trabajo que también tuvo lugar en su laboratorio. Todos ellos del Instituto de Física de la UASLP.

Al Dr. Carlos Ruiz por las facilidades para realizar las mediciones de calorimetría, así como las puntuales observaciones a este proyecto.

Agradezco a mis sinodales internos; el Dr. Daniel P. Sánchez Herrera, el Dr. Bruno A. Escalante Acosta y el Dr. Jesús M. Santana Solano, por sus comentarios y correcciones a este proyecto de tesis.

A mis familiares y amigos, quienes siempre han estado al pendiente de mí. Especialmente a mis padres, Juan y Elida, mi hermana Mayra y mi cuate Edgar por sus consejos y apoyo en todo momento.

Finalmente quisiera darle un especial agradecimiento a mi esposa Ana Karina y mi hijo Juan Alfonso por estar a mi lado en mis buenos y difíciles momentos de este proyecto.

A todos ellos gracias.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN

1.1.	La radiación ultravioleta y visible (UV-Vis).....	1
1.2.	Proteínas globulares.....	2
1.2.1.	Formación y estructura de una proteína.....	2
1.2.2.	Interacciones físicas en una proteína.....	3
1.2.3.	Puentes de hidrógeno.....	4
1.2.4.	β_L -cristalina y ovalbúmina.....	5
1.3.	Efectos de la luz visible y ultravioleta en sistemas biológicos: Un panorama general.....	6
1.3.1.	La luz visible.....	6
1.3.2.	La luz ultravioleta.....	9
1.4.	Planteamiento del problema.....	11
1.5.	Hipótesis.....	11

OBJETIVOS	12
------------------	-----------

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.	Preparación de proteínas en solución acuosa.....	13
2.2.	Irradiación de proteínas.....	14
2.3.	Métodos de estudio.....	15
2.3.1.	Microcalorimetría diferencial de barrido.....	15
2.3.2.	Dispersión dinámica de luz.....	16
2.3.3.	Espectroscopía de fluorescencia.....	17
2.3.4.	Dicroísmo circular.....	18

3. RESULTADOS	
3.1. Evaluación de proteínas irradiadas con luz visible.....	20
3.1.1. Cambio en la entalpía.....	20
3.1.2. Análisis de la distribución de tamaño de partícula.....	21
3.1.3. Espectro de emisión fluorescente	22
3.1.4. Análisis de la estructura secundaria.....	23
3.2. Evaluación de proteínas irradiadas con luz visible y UV.....	25
3.2.1. Cambio en la entalpía.....	25
3.2.2. Análisis de la distribución de tamaño de partícula.....	27
3.2.3. Espectro de emisión fluorescente	28
4. DISCUSIÓN	30
5. CONCLUSIONES	33
6. PERSPECTIVAS	34
BIBLIOGRAFÍA	35
APÉNDICE	39
Publicación.....	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Estructura secundaria obtenida con dicroísmo circular para (a) β_L - cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a diferentes intervalos de tiempo de luz verde y roja.....	25
---	----

Índice de Figuras

1.1. Parte del espectro electromagnético.....	1
1.2. Niveles de organización de las proteínas.....	3
1.3. Interacciones que mantienen la estructura de una proteína (terciaria).....	4
1.4. Representación de un puente de hidrógeno.....	5
1.5. Estructura cristalográfica de las proteínas: (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina.....	6
1.6. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) por la exposición de luz azul, blanca y verde, proveniente de diodos emisores de luz (LEDs).....	7
1.7. Comparación de los efectos letales de la luz en <i>Drosophila melanogaster</i> utilizando diferentes longitudes de onda procedentes de LEDs.....	8
1.8. Daño celular inducido por radiación ultravioleta.....	10
2.1. Arreglo experimental para la irradiación de las proteínas.....	15
2.2. Principio de medición de microcalorimetría diferencial de barrido.....	16
2.3. Dispersión dinámica de luz por partículas según sus tamaños relativos.....	17
2.4. Esquema general de un espectrofluorómetro.....	18
2.5. Principio físico de la técnica dicroísmo circular.....	19
3.1. Perfiles calorimétricos de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.....	21
3.2. Distribución de tamaño de partícula de la (a,b) β_L -cristalina y (c,d) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.....	22
3.3. Espectro de emisión fluorescente de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.....	23

3.4. Espectros de dicroísmo circular obtenidos de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, en función de la exposición a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.....	24
3.5. Perfiles calorimétricos de la (a,b) β_L -cristalina y (c,d) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja, a diferentes intervalos de tiempo, más una dosis de radiación UV-C.....	26
3.6. Distribución de tamaño de partícula de la (a,b) β_L -cristalina y (c,d) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja, a diferentes intervalos de tiempo, más una dosis de radiación UV-C	28
3.7. Espectro de emisión fluorescente de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja, a diferentes intervalos de tiempo, más una dosis de radiación UV-C.....	29
4.1. Embudo energético de plegamiento de proteínas irradiadas.....	32

Resumen

En este trabajo estudiamos los efectos producidos por la luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo en dos proteínas globulares: β_L -cristalina y ovalbúmina. Evaluamos estos cambios mediante la respuesta calorimétrica, la distribución del tamaño de partícula, la estructura secundaria, y la emisión de fluorescencia. Nuestros resultados muestran que ambas longitudes de onda inducen cambios conformacionales como la agregación de la β_L -cristalina y el aumento de la cohesión en ambas proteínas. Cuando la luz verde o roja se aplica antes de la radiación UV-C, reduce el desplegamiento de las proteínas. El origen de este efecto consiste en un aumento en general en el número de puentes de hidrógeno, y probablemente en su intensidad. Nuestro trabajo contribuye en la comprensión de los procesos conformacionales y de agregación en proteínas sometidas a radiación visible y la posible relación con la formación de cataratas.

Abstract

In this work we studied the effects produced by green and red light on two globular proteins: β_L -crystallin and ovalbumin. Both of them were exposed to different time intervals. We evaluated these changes by the calorimetric response, particle size distribution, secondary structure, and fluorescence emission. We found that both wavelengths induce structural changes in these proteins. In the case of β_L -crystallin we observed aggregation. When green or red light is applied before the UV-C radiation, the unfolding of proteins is reduced. The cause is an increase in the number of hydrogen bonds and probably in their strength. Our work may advance our understanding about conformational and aggregation processes in proteins subjected to visible radiation and the possible relationship with cataracts.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. La radiación ultravioleta y visible (UV-Vis)

La radiación ultravioleta (UV) es un tipo de energía electromagnética no ionizante, cuyo rango de longitud de onda se encuentra entre la luz visible (Vis) y los rayos-X. La radiación UV se subdivide en tres regiones: UV-C (200-280 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-A (320-400 nm). Un ejemplo de esta radiación es la emitida por el sol, que es nuestra fuente natural principal de UV [1]. También existen fuentes artificiales de radiación UV que se usan con diferentes propósitos, por ejemplo, las cabinas de bronceado, lámparas germicidas, lámparas de vapor de mercurio, lámparas halógenas, fuentes fluorescentes e incandescentes, y algunos tipos de láser, entre otros.

Por otra parte, la luz visible al igual que la UV es un tipo de radiación electromagnética no ionizante con longitudes de onda comprendidas entre 400 nm y 700 nm (entre el ultravioleta y el infrarrojo), ver Figura 1.1.

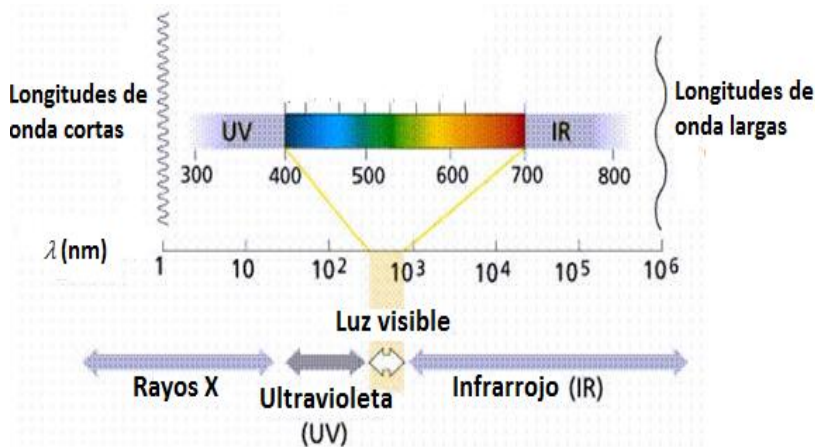


Figura 1.1 Parte del espectro electromagnético [2].

De acuerdo con la ecuación de Planck, una longitud de onda específica tiene asociada una determinada energía:

$$E = h \frac{c}{\lambda}, \quad (1.1)$$

donde E es la energía de los fotones con longitud de onda λ , c es la velocidad de la luz (3×10^8 m/s) y h es la constante de Planck (6.63×10^{-34} J·s). Por lo que, los fotones con una longitud de onda pequeña tienen asociada una alta energía. Así, la luz azul es la longitud de onda con más alta energía en el espectro visible. Mientras que fotones con valores de λ en el rango UV son capaces de producir efectos adversos en determinadas estructuras biológicas, tales como el ADN y las proteínas [3,4].

1.2. Proteínas globulares

1.2.1. Formación y estructura de una proteína

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes que se encuentran en todas las células y de gran importancia en todos los organismos vivos [5]. Básicamente, las proteínas son polímeros formados por aminoácidos, los cuales están unidos covalentemente por enlaces amida, conocidos como enlaces peptídicos [5,6,7]. Los aminoácidos con sus grupos carboxilo, amino y varios grupos R (cadenas laterales) pueden experimentar abundantes reacciones químicas. Esto es, cuando un grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de otro, surge como consecuencia la formación de un dipéptido [6], así como la liberación de una molécula de agua. Si la unión de aminoácidos se sigue de manera lateral, entonces surge la organización estructural primaria de las proteínas, que consiste básicamente en la secuencia de aminoácidos, denominada cadena polipeptídica, que al plegarse da lugar a las hélices α y hojas β , que precisamente constituyen la estructura secundaria, cuyo único enlace presente que estabiliza este nivel, es el puente de hidrógeno. La forma tridimensional global que asume un polipéptido (conformación nativa) se denomina estructura terciaria, aquí se desarrollan interacciones entre hélices α y hojas β .

Finalmente, se dice que las proteínas que constan de dos o más cadenas polipeptídicas presentan estructura cuaternaria [7] (ver Figura 1.2).

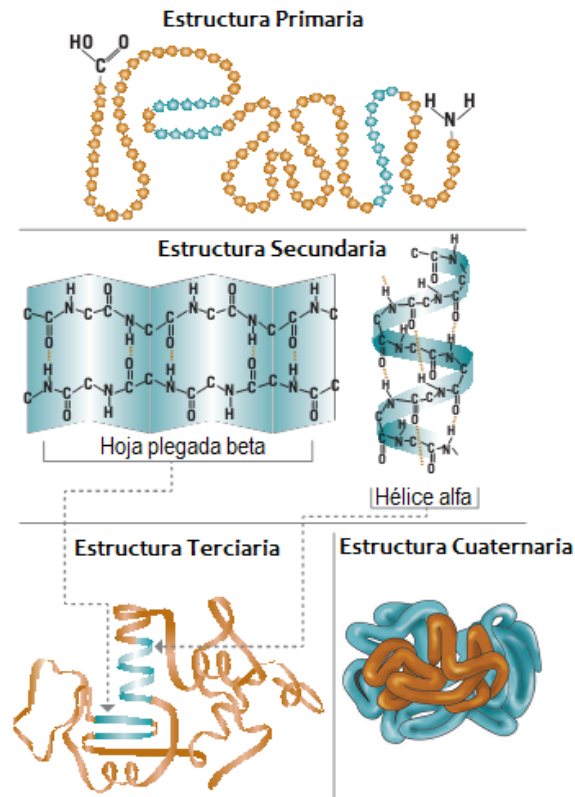


Figura 1.2. Niveles de organización de las proteínas [8].

1.2.2. Interacciones físicas en una proteína

Las proteínas se pliegan espontáneamente en un medio acuoso, formando estructuras tridimensionales complejas que son esenciales para la actividad biológica [9]. Las fuerzas que estabilizan dichas estructuras tridimensionales (terciarias), básicamente son interacciones “débiles” no covalentes (atracción electrostática, puentes de hidrógeno e interacción hidrofóbica), a excepción de los puentes de disulfuro, que se forman por la oxidación de dos residuos de cisteína [6,7] (ver Figura 1.3). La atracción electrostática en las proteínas se presenta entre las regiones iónicas de carga opuesta llamados puentes salinos, mientras que, las interacciones hidrofóbicas resultan entre cadenas laterales de aminoácidos apolares (aromáticos y alifáticos).

Por otro lado, los enlaces o puentes de hidrógeno se forman en el interior o superficie de una proteína gracias a las cadenas laterales polares de los aminoácidos.

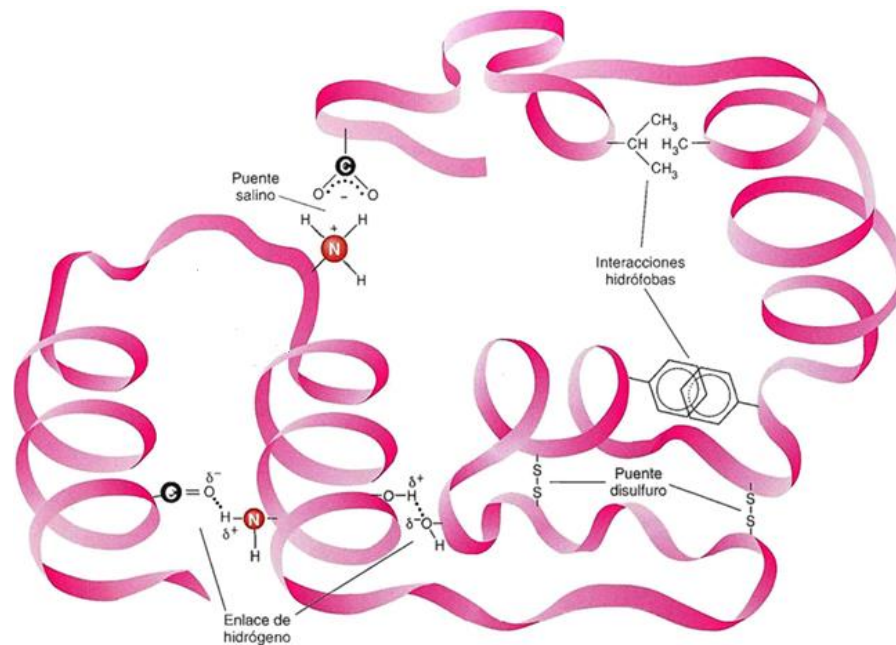


Figura 1.3. Interacciones que mantienen la estructura de una proteína (terciaria) [7].

1.2.3. Puentes de hidrógeno

Los puentes de hidrógeno son las interacciones entre un átomo de hidrógeno que está unido covalentemente a un átomo electronegativo (donador) con otro átomo electronegativo (aceptor).

En las proteínas existen varios grupos (cadenas laterales de los aminoácidos) capaces de formar puentes de hidrógeno entre regiones contiguas del polipéptido plegado, por esta razón, estos enlaces “confieren rigidez a la estructura de las proteínas, así como especificidad en las interacciones intermoleculares” [10]. Los puentes de hidrógeno en proteínas son un tipo de interacción fuerte dipolo-dipolo entre los momentos μ_1 (donador-hidrógeno) y μ_2 (aceptor), que surgen de la presencia de dos partículas cargadas, $+Q_i$ y $-Q_i$, separadas una distancia l_i , donde $i=1,2$ [9] (ver Figura 1.4).

La energía potencial de un puente de hidrógeno, se puede expresar como:

$$V = \frac{\mu_1 \mu_2 (1 - 3 \cos^2 \theta)}{4\pi \epsilon_0 r^3}, \quad (1.2)$$

donde ϵ_0 es la constante de permitividad del vacío, r es la distancia entre los dipolos μ_1 y μ_2 , y θ es el ángulo del puente de hidrógeno.

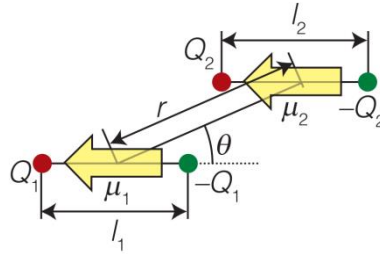


Figura 1.4. Representación de un puente de hidrógeno [11].

1.2.4. β_L -Cristalina y ovalbúmina

La β_L -cristalina y la ovalbúmina son dos ejemplos de proteínas globulares (moléculas esféricas compactas y en general, solubles en agua) estructuralmente diferentes, que a continuación describiremos brevemente para fines de este proyecto.

La β_L -cristalina es una de las tres principales proteínas que se localizan en la lente cristalina de los vertebrados y participa en enfocar la luz en la retina, manteniendo las características transparentes y la refracción de la lente. Estructuralmente, las β_L -cristalinas son proteínas solubles en agua y constan de dos dominios, cada dominio presenta dos ‘Greek key motifs’ (cadenas polipeptídicas plegadas similarmente), unidas por un péptido conector (ver Figura 1.5a), manifestando interacciones entre extensiones N-terminales, las cuales parecen ser las que estabilizan la estructura de las β_L -cristalinas [12,13,14]. El centro de cada dominio es altamente hidrofóbico, con una fuerte cantidad de residuos aromáticos [15,16]. Particularmente, para las β_L -cristalinas extraídas de ojo de bovino, su peso molecular está alrededor de 23 kDa, con 215 aminoácidos [13].

La ovalbúmina (albúmina de huevo) es una proteína soluble y transparente que se encuentra en la clara de huevo, cuya secuencia de aminoácidos consta de 385 residuos y tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa. Esta proteína globular fosforilada y glicosilada es soluble en agua y dentro de sus características estructurales podemos mencionar que presenta cuatro dominios, contiene solamente extensiones peptídicas C-terminales, tiene tres residuos de triptófano (Trp₁₄₈, Trp₂₆₇ y Trp₁₈₄), así como cuatro residuos de cisteína, que dan la formación de un puente de disulfuro [17,18]. Esta proteína muestra un plegado intermedio metaestable, que no es la conformación más favorecida termodinámicamente [19] (ver Figura 1.5b).

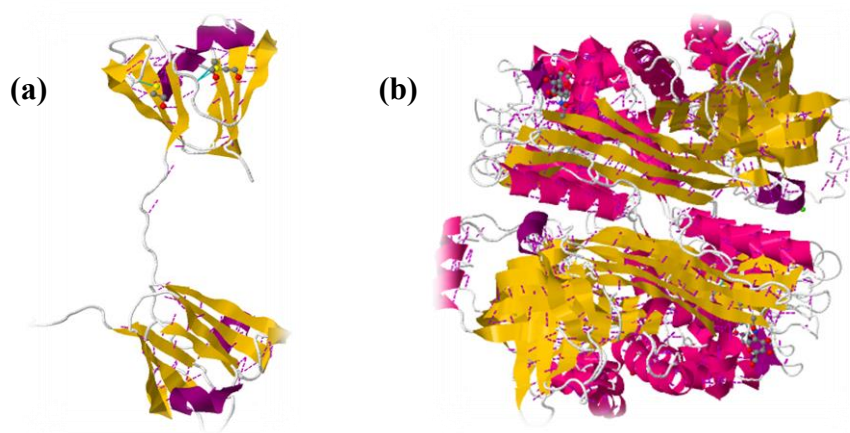


Figura 1.5. Estructura cristalográfica de las proteínas (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina [13].

1.3. Efectos de la luz visible y ultravioleta en sistemas biológicos: Un panorama general

1.3.1 La luz visible

Los efectos producidos por luz visible en sistemas biológicos han sido investigados desde hace algunos años [20-28]. Muy recientemente, Kuse *et al* [29] reportaron un severo daño causado por la luz azul (producida por diodos emisores de luz, LEDs) en células fotorreceptoras derivadas de cono de murino, después de contabilizar los radicales libres que oxidan a la célula (especies ROS) generadas por tres longitudes

de onda visible; azul, verde y blanca. Tal como se observa en la Figura 1.6, en donde un notable incremento es apreciado con la luz azul, en comparación con las longitudes de onda restantes. Este estudio podría ser considerado como una advertencia potencial para los seres humanos, debido que pasamos cada vez más tiempo frente a las pantallas que emiten una gran cantidad de luz azul.

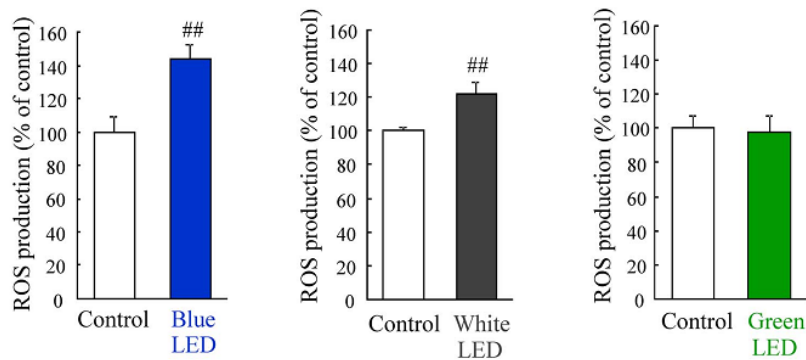


Figura 1.6. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) por la exposición de luz azul, blanca y verde, proveniente de LEDs [29].

En otro estudio, Hori *et al* [30] informaron también recientemente que la misma radiación mata a los huevesillos, larvas, pupas, e insectos adultos de *Drosophila melanogaster*, una vez que observaron el comportamiento de la curva de mortalidad en función de la exposición de fotones incidentes en esta especie de mosquitos con el tiempo, tal como se observa en la Figura 1.7. Con estos resultados, los autores afirman que la luz azul es mucho más dañina para los insectos que la radiación UV.

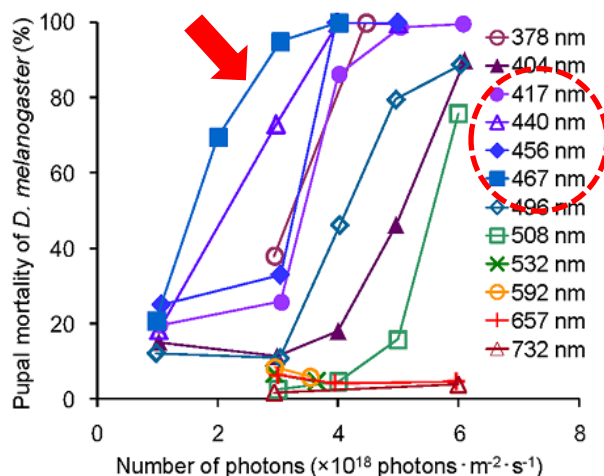


Figura 1.7. Comparación de los efectos letales de la luz en *Drosophila melanogaster* utilizando diferentes longitudes de onda procedentes de LEDs [30].

Otros autores han encontrado que la exposición excesiva a la luz azul puede tener efectos perjudiciales en el epitelio corneal humano y en las células fotorreceptores de la retina, en comparación con otras longitudes de onda del espectro visible [31,32]. Incluso, las energías más bajas de la luz visible (rojo y verde) tienen consecuencias en la fisiología, el crecimiento y la reproducción de algunos organismos [22,23,25]. Por ejemplo, la exposición a la luz verde causa una reducción en la expansión radial de hongos, el crecimiento de las células HeLa, roturas en el ADN de la retina en ratas, hipersensibilización de un gen en el tabaco transgénico, cambios modulados en la actividad de la enzima colagenasa y un incremento en la actividad antioxidante de la cebada [24,26,33-35]. Por otra parte, la luz roja de fuentes monocromáticas de baja intensidad puede estimular el desarrollo de la planta, afectar el nivel de expresión de estrés oxidativo de las enzimas de *E. coli* en agua de mar, la síntesis de ADN en células HeLa, así como el crecimiento de otros tipos de bacterias y levaduras [36-38].

1.3.2 La luz ultravioleta

La radiación UV inactiva organismos provocando una reacción fotoquímica, misma que altera componentes moleculares esenciales para la función celular, específicamente el ADN y las proteínas [3,4,39,40].

Un gran número de daños se producen en el ADN y en otras estructuras biológicas por exposición a radiación UV. Estos incluyen la modificación de bases de purina individual y de pirimidina, por ejemplo, la desaminación y la escisión del anillo, otros comprenden la producción de dímeros de pirimidina (esto es, la formación de un enlace covalente de pirimidinas adyacentes en el ADN) [42,43]. Todas estas mutaciones por radiación ultravioleta ocasionan **lesiones específicas**. En el caso de microorganismos es muy conocido que la luz UV inhibe el crecimiento de bacterias, un ejemplo de ello es la supresión de la actividad del fotosistema II en cianobacterias [41,44]. Mientras que en la piel humana y animal, induce reacciones agudas y crónicas, que son la causa principal de los tumores benignos y malignos, incluyendo el envejecimiento y el melanoma [45,46,47].

En las proteínas la luz ultravioleta causa un efecto nocivo, debido a que dichas macromoléculas presentan residuos aromáticos, como el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la fenilalanina (Phe), que son responsables de su absorción en el UV [4,40]. Uno de estos daños es el aumento en el estrés oxidativo, vía la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) el cual comprende modificaciones de aminoácidos, la formación de grupos carbonilo, la fragmentación, el entrecruzamiento de proteína-proteína, y la formación de puentes de disulfuro [41] (ver Figura 1.8).

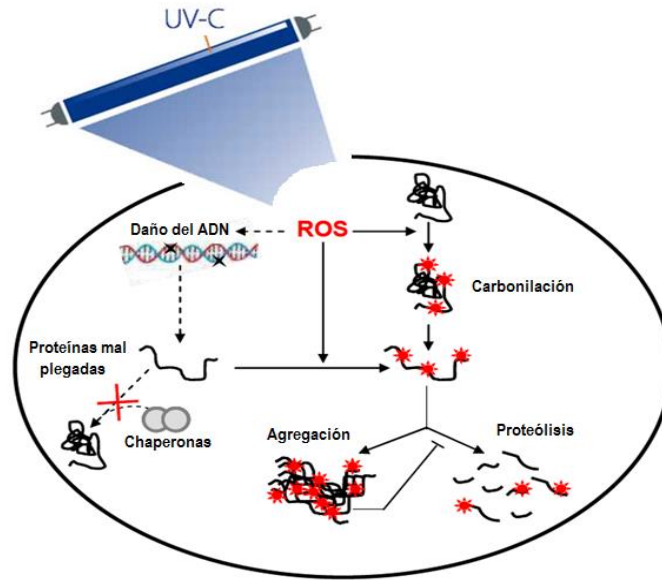


Figura 1.8. Daño celular inducido por radiación ultravioleta. Imagen adaptada de Matallana-Surget *et al* [41].

A continuación citaremos algunos trabajos relevantes con diferentes proteínas que fueron sujetas a radiación ultravioleta. Uno de ellos es el de Kehoe *et al* [48], en el que expusieron la β -lactoglobulina A a luz UV (295 nm). Esta proteína se encuentra en el suero de la leche de vaca. Los autores observaron que la β -lactoglobulina A se desnaturaliza, ya que los grupos sulfhidrilos de la proteína nativa quedan expuestos después de la irradiación, siendo una evidencia de alguna fotooxidación del triptófano.

Recientemente, Manzocco *et al* [49] estudiaron los efectos de la luz ultravioleta en algunas propiedades relacionadas con la estructura de la ovalbúmina, que es comúnmente empleada en la industria alimentaria. Los resultados reportados fueron modificaciones consistentes en escisiones de enlaces peptídicos y agregaciones de la macromolécula. Estas observaciones concuerdan bien con lo reportado en la literatura [50].

En otro trabajo, Muranov *et al* [21] reportaron que las proteínas β -cristalinas extraídas del ojo de bovino se agregan tras la exposición con radiación UV. Este tipo

de luz indujo una fotoxidación de residuos aromáticos que conlleva a una alteración conformacional, y eventualmente, a la agregación [51]. El proceso es asociado con las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas, tal como lo menciona Andley *et al* [52] al estudiar la misma familia de proteínas en humano, en donde fueron observados cambios estructurales de la proteína posteriores a la formación de productos de fotoxidación del triptófano, y cuya evidencia señala a la radiación ultravioleta como una posible fuente de formación de las cataratas. Lo anterior se debe a que una agregación no específica de la β_L -cristalina es una de las causas físicas de las cataratas [12]. Esta agregación ocasiona una opacidad del cristalino, la cual es una de las principales enfermedades a causa de radiación UV, según la OMS [53]. De esta forma, la radiación UV puede considerarse como una perturbación con efectos potenciales en la estructura de las proteínas.

1.4. Planteamiento del problema

Debido a que las proteínas son las macromoléculas más abundantes de la célula, cualquier alteración en su estructura implica un desorden en la función celular y por ende, el desarrollo de algunas enfermedades. Así, en este trabajo de tesis nos planteamos entender algunos efectos producidos en proteínas globulares después de ser expuestas a la luz visible verde y roja (tomando en cuenta que las proteínas tienen una absorbancia nula en las longitudes de onda de la luz visible) y a radiación ultravioleta.

1.5. Hipótesis

Las longitudes de onda visible, particularmente verde y roja, inducen un cambio conformacional en proteínas globulares y tienen también un efecto en las mismas proteínas al exponerlas posteriormente a radiación UV.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- ✓ Estudiar el efecto de la luz verde y roja en proteínas globulares.

Objetivos Particulares:

- ✓ Estudiar el comportamiento de dos proteínas estructuralmente diferentes en solución acuosa (β_L -cristalina y ovalbúmina), bajo dos fuentes de radiación visible.
- ✓ Estudiar el comportamiento de las mismas proteínas en solución bajo la influencia de radiación visible al adicionar una dosis UV.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de proteínas en solución acuosa

Se utilizaron dos proteínas, la β_L -cristalina de ojo de bovino (C5163 Sigma-Aldrich, USA) y la ovalbúmina (A5253 Sigma-Aldrich, USA). Dos buffers se emplearon para la preparación de las soluciones: PBS (que contiene 0.01 M PO_4 , 0.0027 M KCl y 0.137 M NaCl) y un buffer de fosfatos a base de potasio (PBP, que contiene 0.2 M KH_2PO_4 y 0.2 M K_2HPO_4). Se prepararon cuatro soluciones stocks, 2 mg/ml de β_L -cristalina en PBS, 2 mg/ml de ovalbúmina en PBS, 2 mg/ml de β_L -cristalina en PBP y 2 mg/ml de ovalbúmina en PBP. El agua utilizada en estos experimentos fue Mili Q (18.2 M Ω cm). La solución stock de 2 mg/ml de β_L -cristalina en PBS fue preparada al disolver 25 mg de β_L -cristalina en 12.5 ml de solución buffer salina en un frasco de vidrio esterilizado. Un procedimiento similar se siguió para preparar el resto de las soluciones. Se realizó una dilución de las mismas de 2 mg/ml de β_L -cristalina en PBP y de 2 mg/ml ovalbúmina en PBP obteniendo 20 ml de muestra de 0.1 mg/ml de β_L -cristalina y 20 ml de muestra de 0.1 mg/ml de ovalbúmina, ambos en solución buffer de fosfatos (PBP). Las concentraciones de las muestras fueron verificadas por absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Cabe señalar que todas las muestras se realizaron en condiciones fisiológicas (pH de 7.2).

Para todos los métodos de estudio que mencionaremos más adelante se empleó una concentración de 0.1 mg/ml de la proteína en cuestión en buffer de fosfatos (de potasio), a excepción de microcalorimetría diferencial de barrido, que se utilizó 2 mg/ml de proteína en PBS.

2.2. Irradiación de proteínas

Las proteínas en solución fueron expuestas por separado en los siguientes grupos de irradiación, incluyendo un grupo nativo (sin irradiación):

- Proteínas irradiadas con luz visible (verde y rojo)
- Proteínas irradiadas con luz ultravioleta (UV)
- Proteínas irradiadas primero con luz visible y posteriormente con UV

Para el primer grupo de irradiación fueron expuestas individualmente las proteínas a diodos emisores de luz (LEDs) de alta potencia con longitudes de onda en el rango del verde (490-540 nm) y rojo (600-650 nm), LED-P3G-200/41 y LED-P3R-120/41, respectivamente. Cuatro LEDs de la misma longitud de onda fueron colocados en un soporte de aluminio y conectados en paralelo a una fuente de voltaje CD (E3632A, Agilent) en 2.83 V para luz verde y 2.05 V para luz roja. La intensidad luminosa emitida por ambas fuentes de luz fue de 4×10^3 lux, la cual se midió con un luxómetro Lutron LX-1108. Las muestras se colocaron en cajas de Petri a una distancia de 2.5 cm del arreglo de LEDs, donde se midió la irradiancia con un radiómetro digital (RM-21, Dr. Gröbel) registrando un valor de 1.35 W/m^2 . Las muestras fueron irradiadas por 5.5, 11 y 21 hrs (2.67 , 5.35 y 10.2 J/cm^2 , respectivamente).

Para el segundo grupo de estudio las proteínas fueron expuestas a radiación ultravioleta de 254 nm (UV-C), emitida por una mini lámpara germicida (UVG-4, UVP). Las muestras irradiadas fueron colocadas a una distancia de 1.5 cm de la lámpara UV, en la cual la tasa de dosis monitoreada por el radiómetro digital fue de 10.5 W/m^2 por 1.5 hrs (5.67 J/cm^2).

Para el tercer y último grupo de estudio, las soluciones de proteínas fueron expuestas a las mismas condiciones de irradiación que el primer grupo, con la diferencia de que inmediatamente después de la radiación con luz verde y roja, las proteínas fueron irradiadas con la lámpara UV-C, de igual manera que se realizó para

el segundo grupo de estudio, a una dosis única de radiación de 5.67 J/cm^2 . El arreglo experimental se muestra en la Figura 2.1.

Todas las muestras nativas e irradiadas en cada grupo fueron obtenidas de las soluciones stocks mencionadas. Además, después de realizar las irradiaciones, las muestras fueron almacenadas por 12 hrs a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ antes de su análisis. La temperatura durante las irradiaciones fue de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, la cual se monitoreó con un termopar (USB-TC01, National Instrument).



Figura 2.1. Arreglo experimental de la irradiación de proteínas.

2.3. Métodos de estudio

2.3.1 Microcalorimetría diferencial de barrido

Este método consiste en calentar la muestra de estudio y una de referencia, a través de un flujo de calor constante (H), de tal manera que la diferencia de temperatura (ΔT) entre ambas sea casi nula (ver Figura 2.2). Esto se logra al aplicar tasas de calentamiento constantes a la muestra y a la referencia para realizar un barrido de temperaturas [54]. Con este método, el plegamiento y desplegamiento de proteínas fueron caracterizados termodinámicamente en las proteínas irradiadas.

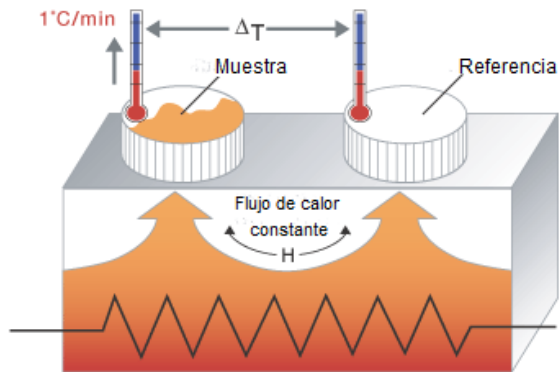


Figura 2.2. Principio de medición de la microcalorimetría diferencial de barrido [55].

Los perfiles de la capacidad calorífica de las muestras (nativas e irradiadas) fueron registrados usando un calorímetro (Microcalorímetro, Nano DSC, TA Instruments, USA) el cual está interfaciado a una computadora. Antes de que las muestras se colocaran en los capilares del equipo, fueron desgasificadas a 635 mm Hg durante 5 minutos a 25 °C y 500 r.p.m. La solución de β_L -cristalina fue calentada desde 30 a 80 °C y la ovalbúmina de 45 a 95 °C. Las muestras fueron medidas a una presión constante de 3 atm y a una tasa de calentamiento de 1 °C/min. Cada experimento se realizó tres veces utilizando diferentes muestras preparadas bajo las mismas condiciones. Los datos fueron analizados utilizando el software que se proporciona con el calorímetro (Launch NanoAnalyze).

2.3.2 Dispersión dinámica de luz

Este método de espectroscopía de correlación de fotones mide el movimiento browniano de las partículas y lo relaciona con su tamaño. Esto se hace mediante la iluminación de la muestra con un láser y su análisis de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada [56] (ver Figura 2.3).

Con el fin de determinar la naturaleza de los cambios conformacionales de las proteínas irradiadas, la distribución de tamaño de partícula fue determinada en términos de la dispersión dinámica de luz a 25 °C usando un Zetasizer NanoZS

(Malvern, UK). Las suspensiones de proteína de 1 ml (a una concentración de 0.1 mg/ml en un buffer de fosfatos) fueron colocadas en cubetas de poliestireno desechables y se expusieron a un láser de He-Ne de 633 nm. Cada medición se realizó tres veces, pero cada una de ellas es el promedio de doce iteraciones.

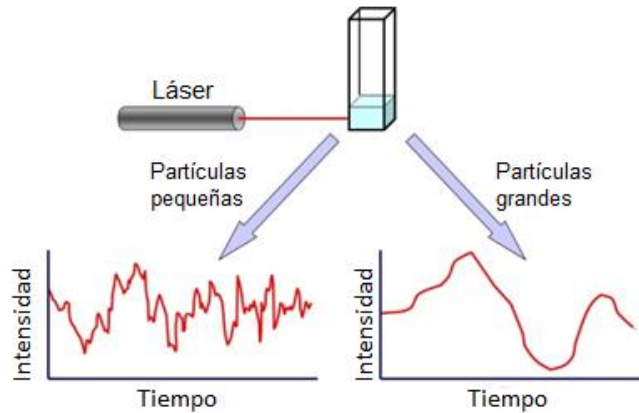


Figura 2.3. Dispersión dinámica de luz por partículas según sus tamaños relativos [56].

2.3.3 Espectroscopía de fluorescencia

Este método consiste en hacer pasar un haz a través de un monocromador de excitación, que transmite la energía que induce la fluorescencia en una cierta molécula (muestra), y como consecuencia provoca una emisión de radiación espontánea de menor energía, la cual llega a un fotodetector después de haber pasado por un monocromador de emisión [57] (ver Figura 2.4).

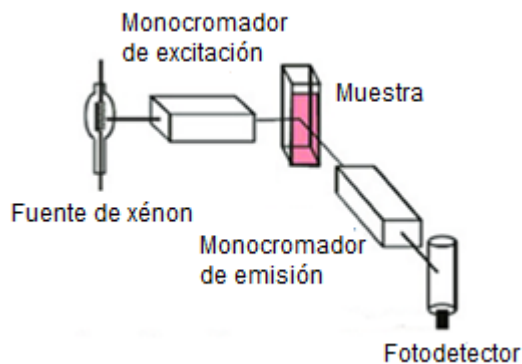


Figura 2.4. Esquema general de un espectrofluorómetro [58].

Para explorar el cambio en las propiedades moleculares de las proteínas irradiadas, se evaluó la interacción de los residuos aromáticos en su entorno (solución acuosa) con este método. La fluorescencia intrínseca de proteínas fue registrada con un espectrofluorómetro (FluoroMax-4, Horiba Jobin Yvon).

Los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario se registraron entre 290 a 500 nm después de la excitación de la muestra a 280 nm, a 25°C. La concentración de proteína fue de 0.1 mg/ml en un buffer de fosfatos de 10 mM, a un pH 7.2.

2.3.4 Dicroísmo circular

Es un método que consiste en hacer pasar un haz de luz polarizada en una muestra (activa ópticamente) que puede absorber luz a diferentes ángulos, dependiendo del haz incidente polarizado (Figura 2.5). Este método fue empleado para analizar la estructura secundaria de las proteínas irradiadas. Los espectros DC se registraron en un espectropolarímetro J-1500 (JASCO Inc., Easton MD, USA) usando una celda con longitud de trayectoria de 0.1 cm en el rango de 190-240 nm. La concentración de proteína fue de 0.1 mg/ml en un buffer de fosfatos de 10 mM a un pH de 7.2, y la temperatura regulada a 25°C por un sistema Peltier (PTC-435, JASCO). Los espectros de las proteínas nativas e irradiadas se adquirieron cada 0.1 nm con un

tiempo promedio de 1s por punto y un ancho de banda de 1nm. Se hicieron tres mediciones para cada muestra. Cada espectro se obtuvo como un promedio de tres scans para reducir el ruido, y se suavizó antes de que se realizara un análisis de estructura. La predicción de la estructura secundaria se llevó a cabo utilizando el algoritmo CONTIN y SMP180 (optimizado para 190-240 nm) con librerías de referencia a través del servidor Dichroweb [60].

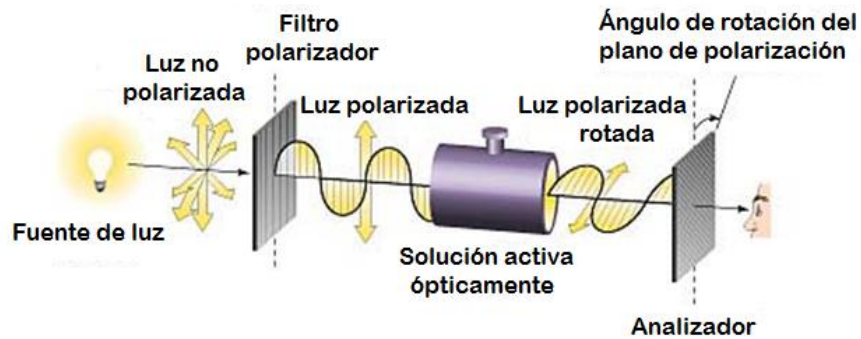


Figura 2.5. Principio físico de la técnica dicroísmo circular [59].

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Evaluación de proteínas irradiadas con luz visible

Los efectos producidos por la luz verde y roja en las dos proteínas globulares de estudio, fueron evaluados mediante su respuesta calorimétrica, distribución de partícula, estructura secundaria y emisión fluorescente. Estas mediciones se realizaron después de refrigerar durante 12 hrs las muestras irradiadas.

Por convención, utilizaremos de aquí en adelante los símbolos λ_{Verde} y λ_{Rojo} que aparecerán en las gráficas para referirnos a la luz verde y luz roja, respectivamente. Dichas graficas corresponden a resultados representativos de cada experimento.

3.1.1 Cambio en la entalpía

Se obtuvieron los perfiles calorimétricos de las proteínas β_L -cristalina y ovalbúmina que fueron expuestas a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo (5.5, 11 y 21 hrs), así como de las nativas de cada proteína (Figura 3.1). Las temperaturas de transición (picos calorimétricos) de las proteínas nativas fueron similares a las reportadas en la literatura con diferentes buffers [61,62], cuyos valores son 67.87 ± 0.48 °C y 78.66 ± 0.02 °C para β_L -cristalina y ovalbúmina, respectivamente. No obstante, es evidente que el área bajo la curva (entalpía) aumenta a medida que el tiempo de irradiación incrementa (de 305 a 732 kJ/mol para (a) β_L -cristalina, y de 867 a 2,252 kJ/mol para (b) ovalbúmina). Ambas longitudes de onda tienen un efecto calorimétrico en la β_L -cristalina (Figura 3.1a), la cual es más pronunciada con la luz verde, especialmente en tiempos intermedios. Por otro lado, la luz roja causa un efecto importante en la ovalbúmina (Figura 3.1b) con una respuesta significativa en el tiempo de exposición de 21 hrs. (ver los insets). Estos resultados ilustran que ambos tipos de luz inducen cambios en estas proteínas, con el consecuente aumento en la entalpía.

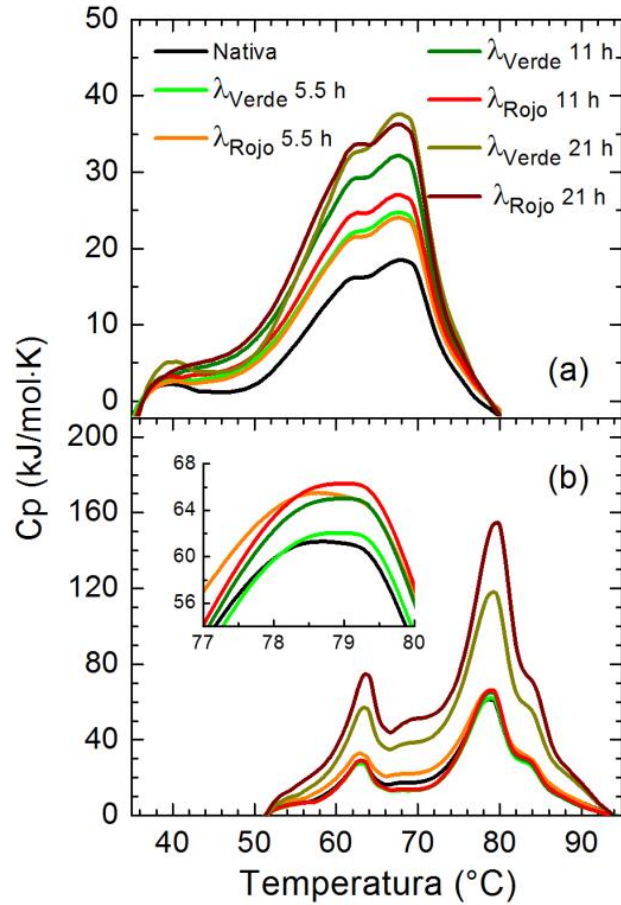


Figura 3.1. Perfiles calorimétricos de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.

3.1.2 Análisis de la distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula fue medida en términos de la dispersión dinámica de luz. La Figura 3.2 muestra como la distribución de tamaño de la β_L -cristalina (a-b) y la ovalbúmina (c-d) cambia debido a la luz verde y roja. Observemos que la β_L -cristalina, la cual se autoasocia principalmente en dímeros, reduce su tamaño después de la exposición, indicando que la luz visible promueve más empaquetamiento. Pero el efecto más importante es una agregación significativa en la dosis más alta para ambas longitudes de onda. Mientras que la ovalbúmina también parece encogerse, sin presentar agregación alguna debido a la luz verde y roja.

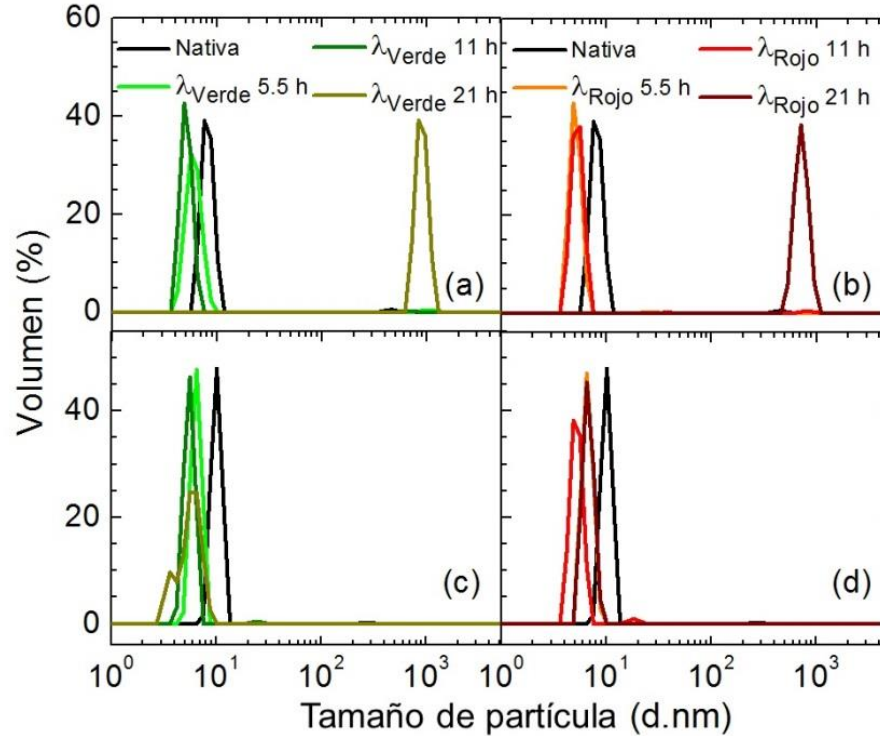


Figura 3.2. Distribución de tamaño de partícula de la (a,b) β_L -cristalina y (c,d) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.

3.1.3 Espectro de emisión fluorescente

Evaluamos la emisión fluorescente intrínseca de las proteínas irradiadas con luz verde y roja, para determinar el grado de exposición del triptófano a la solución acuosa. Si el triptófano está enterrado dentro de la proteína, se espera un incremento en la intensidad de fluorescencia; es decir, el residuo estaría en un entorno menos polar (por ejemplo, por la disminución de moléculas de agua) y viceversa [57,63]. En estos experimentos el triptófano fue excitado en 280 nm, y las proteínas nativas mostraron una emisión fluorescente máxima de 333 nm para la β_L -cristalina y 334 nm para la ovalbúmina. Una vez que la β_L -cristalina fue expuesta a luz verde y roja, la intensidad de fluorescencia aumentó (Figura 3.3a). Estos incrementos son debido a los cambios conformacionales de la proteína a una estructura más compacta, como lo confirman los resultados de calorimetría y dispersión dinámica de luz. Dado que la proteína se empaqueta más por la radiación visible, es claro que los aminoácidos aromáticos (predominantemente el triptófano) se esconden aún más dentro de ella. Con respecto

a la ovalbúmina, observamos el mismo efecto pero con menos intensidad (Figura 3.3b).

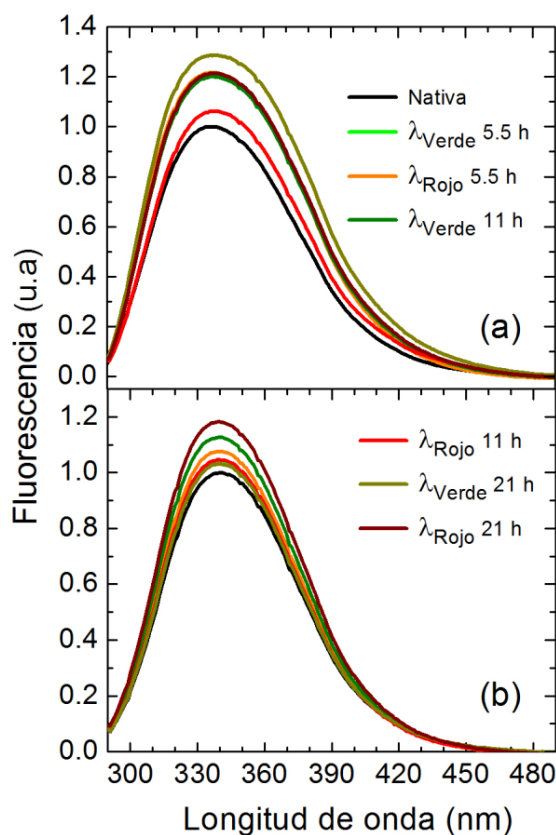


Figura 3.3. Espectro de emisión fluorescente de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.

3.1.4 Análisis de la estructura secundaria

Para obtener información acerca de los cambios en la estructura secundaria de las proteínas estudiadas, analizamos el porcentaje de residuos en una estructura conformacional dada. En la Figura 3.4 se muestra el espectro obtenido con dicroísmo circular de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina en un buffer de fosfatos después de la irradiación. Se puede observar que la luz roja en β_L -cristalina disminuye gradualmente el contenido de la hélice α y aumenta significativamente las hojas β , lo que confirma los resultados obtenidos por la técnica de dispersión dinámica de luz. Por el contrario, la luz roja aumenta ligeramente el contenido de hélice α sin cambios evidentes en las hojas β para la ovalbúmina. De acuerdo con nuestros resultados, la

luz verde no produce cambios significativos y consistentes al incrementar la dosis de radiación visible en ambas proteínas.

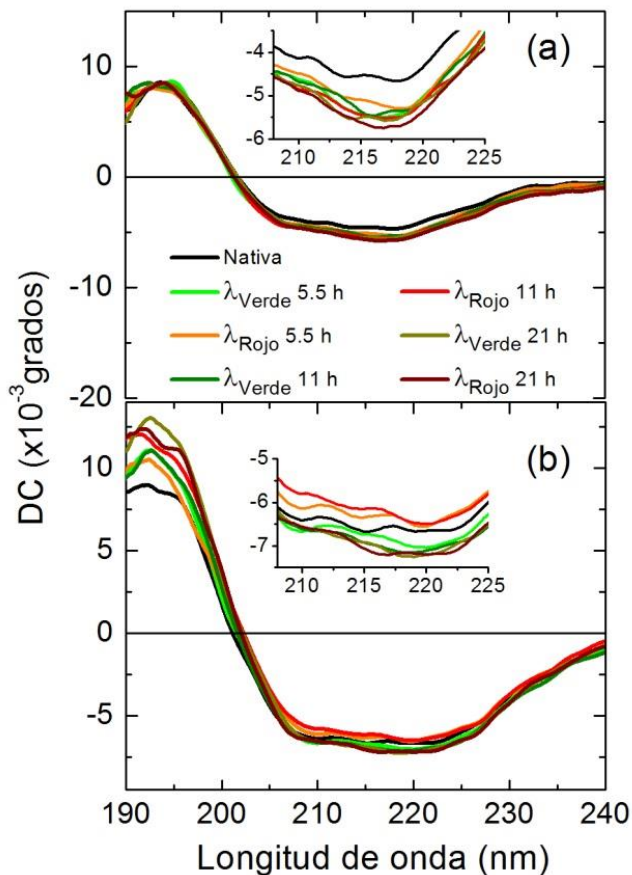


Figura 3.4. Espectros de dicroísmo circular obtenidos de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, en función de la exposición a luz verde y roja a diferentes intervalos de tiempo.

La información detallada de la estructura secundaria de estos espectros se presenta en la Tabla 1. La proporción de estructuras secundarias se estimó a partir de la deconvolución de los espectros de dicroísmo circular utilizando el servidor en línea DICHROWEB con el algoritmo CONTIN [60].

	% Hélice α % Hoja β		% Hélice α % Hoja β	
	β_L -Cristalina		Ovalbúmina	
Nativa	10.4	38	20.2	30
	Irradiada			
Verde 5.5 h	11.9	36.9	20.7	30.5
Rojo 5.5 h	11.7	37.8	18.6	33
Verde 11 h	4.4	48.5	21.3	29.7
Rojo 11h	2.7	49.4	19.6	32.9
Verde 21 h	9	38.3	21.4	30.8
Rojo 21 h	2.3	51.1	22	30.5

Tabla 1. Estructura secundaria obtenida de dicroísmo circular para (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a diferentes intervalos de tiempo de luz verde y roja.

3.2. Evaluación de proteínas irradiadas con luz visible y UV

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con las mismas proteínas, irradiadas ahora con una dosis adicional de radiación UV-C (5.67 J/cm^2) inmediatamente después de ser expuestas a luz visible (luz verde y roja). Las evaluaciones fueron realizadas midiendo la respuesta calorimétrica, la distribución de partícula y la emisión fluorescente de las proteínas irradiadas. Nuevamente, las mediciones se llevaron a cabo después de refrigerar por 12 hrs las muestras irradiadas.

3.2.1 Cambio en la entalpía

Se obtuvieron los perfiles calorimétricos de las proteínas β_L -cristalina y ovalbúmina después de ser irradiadas con UV-C, así como, de estas mismas después de ser expuestas a luz visible (a diferentes intervalos de tiempo) primero, y luego, a una dosis fija de radiación UV. Los resultados muestran una evidente disminución en la entalpía de las proteínas (Figura 3.5) cuando ambas fueron expuestas únicamente a radiación UV-C (de 305 a 152 kJ/mol para la β_L -cristalina, y de 867 a 235 kJ/mol para ovalbúmina). En el caso de las irradiaciones combinadas (Visible + UV) se observa que a medida que aumenta el tiempo de exposición con luz verde y roja, existe un incremento en la entalpía en la β_L -cristalina (Figura 3.5 (a, b)), hasta alcanzar valores de 430 y 454 kJ/mol para un tiempo de 21 hrs de exposición de luz

verde y roja, respectivamente. Estos valores superan al de la proteína nativa (305 kJ/mol). Incluso, para el tiempo intermedio de luz verde se logra apreciar ligeramente un incremento en la entalpía (370 kJ/mol); es decir, el efecto es más significativo para la luz verde. Mientras que en el caso de la ovalbúmina (Figura 3.5 (c, d)) se observa que, al incrementar el tiempo de exposición de luz visible, aumenta la entalpía, aproximándose al valor de la proteína nativa, (753 y 784 kJ/mol para luz verde y roja por 21 hrs, respectivamente). En esta ocasión, el efecto es más representativo para la luz roja.

En resumen, nuestros resultados muestran que al irradiar previamente las proteínas con luz verde y roja, antes de la radiación UV-C, evidentemente existen distintos cambios conformacionales que se resisten a ocupar una configuración desplegada tal como la inducida aparentemente por la radiación ultravioleta.

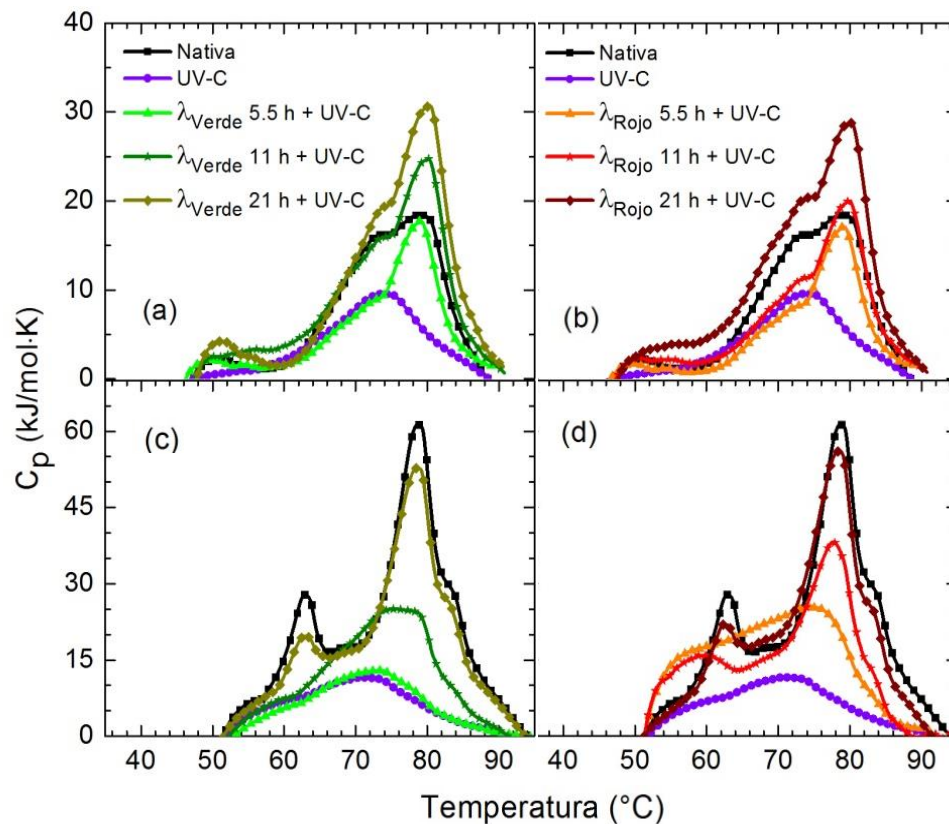


Figura 3.5. Perfiles calorimétricos de la (a,b) β_L-cristalina y (c,d) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja, a diferentes intervalos de tiempo, más una dosis de radiación UV-C.

3.2.2 Análisis de la distribución de tamaño de partícula

Se obtuvieron patrones de distribución de tamaño de partícula de las proteínas de estudio que fueron irradiadas con luz UV-C, tras la exposición con luz verde y roja. La Figura 3.6 muestra la distribución de tamaño de la (a-b) β_L -cristalina, en el cual se observa que la radiación UV-C induce la formación de tres poblaciones, del orden de 10^2 a 10^3 nm. Estos agregados se formaron por el desdoblamiento de esta proteína con el paso de la radiación UV-C, tal como lo reportó Muranov *et al* [51]. Nuestros resultados muestran que el tamaño de estas poblaciones se reduce con la luz verde y roja, cuando las proteínas son independientemente expuestas a estas dos longitudes de onda, y posteriormente se irradian con UV-C. Sin embargo, al irradiar la proteína únicamente con UV-C, podemos apreciar claramente dos poblaciones (en 10.8 nm y 200 nm aproximadamente), que son agregaciones esperadas tras la radiación con ultravioleta, como agente físico de desplegamiento de proteínas [49,50,64]. Por otro lado, la distribución de tamaño de la ovalbúmina (Figura 3.6 (c-d)), pareciera no verse perturbada ante la radiación UV-C cuando se exponen previamente a luz verde o roja; de hecho, tiende a tener un comportamiento similar al discutido en la sección 3.1.2, donde se irradian las proteínas solamente con luz verde y roja, exhibiendo una ligera compactación.

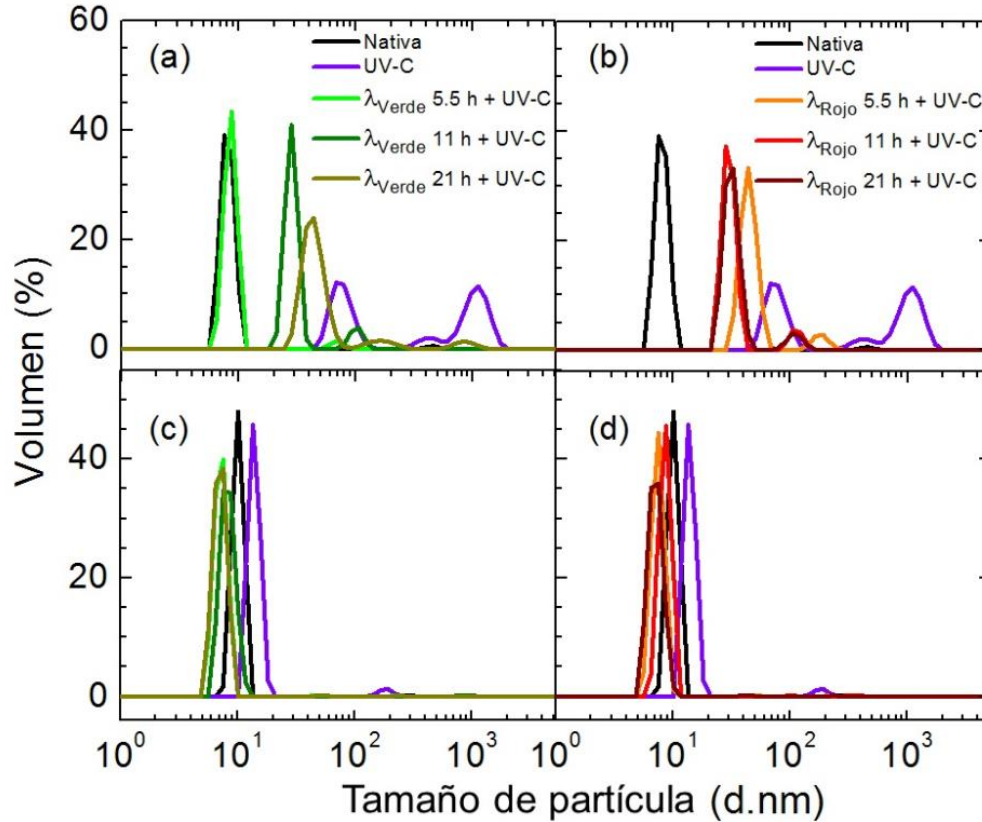


Figura 3.6. Distribución de tamaño de partícula de la (a,b) β_L -cristalina y (c,d) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja, a diferentes intervalos de tiempo, más una dosis de radiación UV-C.

3.2.3 Espectro de emisión fluorescente

Examinamos la respuesta fluorescente intrínseca de las proteínas después de ser expuesta a luz visible, y luego a UV al excitar el triptófano en 280 nm. La irradiación con UV-C provoca un notable decremento en la intensidad del pico fluorescente, especialmente en el caso de la β_L -cristalina, y la posición del pico no cambia. Cuando ambas proteínas son previamente expuestas a luz verde o roja, observamos que la dosis UV-C aplicada en cada muestra irradiada con luz visible causa una disminución progresiva de la intensidad fluorescente (Figura 3.7), lo cual sugiere un desdoblamiento parcial en las proteínas por la exposición de los residuos aromáticos al entorno acuoso. Cabe señalar que dicho descenso no es tan acentuado como el de las proteínas irradiadas únicamente con radiación UV-C, lo que hace pensar que la luz visible reprime de alguna manera la acción desnaturalizante de la radiación

ultravioleta. Finalmente, hay que mencionar que en la β_L -cristalina (Figura 3.7a), este efecto es más pronunciado en los tiempos intermedios de radiación, mientras que, en la ovalbúmina (Figura 3.7b) se aprecia en tiempos largos de irradiación, no obstante se observa que a medida aumenta el tiempo de irradiación, este efecto es notable.

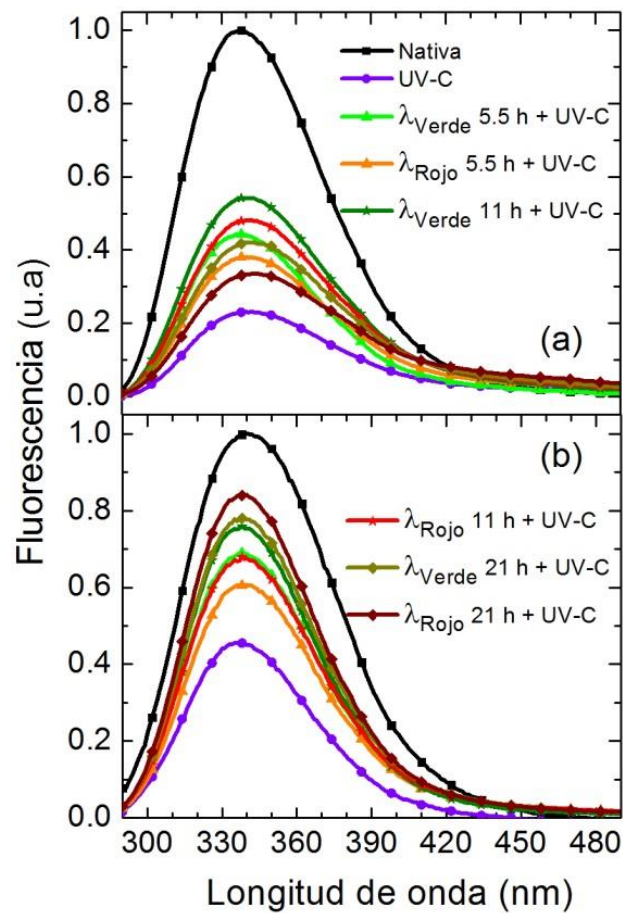


Figura 3.7. Espectro de emisión fluorescente de la (a) β_L -cristalina y (b) ovalbúmina, expuestas a luz verde y roja, a diferentes intervalos de tiempo, más una dosis de radiación UV-C.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En este estudio primeramente investigamos los efectos de la luz verde y roja en β_L -cristalina y la ovalbúmina. Nuestros resultados muestran que esta radiación produce modificaciones conformacionales en ambas proteínas. Dichas macromoléculas adquieren una forma más empaquetada presuntamente debido a cambios en los puentes de hidrógeno (ver Figuras 3.2 y 3.3). Dado que se necesita una energía térmica adicional para romper nuevos enlaces, la entalpía calorimétrica aumenta, como se ilustra en la Figura 3.1. Simultáneamente, la composición de la estructura secundaria de las proteínas se modifica tras dicha radiación (ver Figura 3.4). Estos cambios son evidentes en β_L -cristalina y poco apreciables en la ovalbúmina. En el caso de la β_L -cristalina, la luz visible promueve agregación (solamente una población). De acuerdo a nuestros experimentos de dispersión dinámica de luz, la ovalbúmina no se agrega pero la entalpía aumenta debido al colapsamiento de la proteína. Mientras que en las pruebas de fluorescencia encontramos un aumento en la intensidad fluorescente en ambas proteínas expuestas a la luz visible, lo cual indica un debilitamiento en la capacidad del entorno para donar hidrógeno a la proteína, y así disminuye la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares (entre el medio acuoso y la proteína), tal como lo reporta Zhao *et al* [65,66]. Lo anterior nos sugiere que, al colapsarse las proteínas debido a la luz visible, éstas expulsan moléculas de agua tanto del interior pero mayoritariamente del exterior (superficie) de las proteínas, como si ocurriera una desolvatación en ellas. Por lo tanto hay una disminución de puentes de hidrógeno intermoleculares. Algo similar a lo que reportan Tarek *et al* [67]: “La superficie de una proteína deshidratada se rigidiza por las fuertes interacciones (electrostáticas y puentes de hidrógeno) entre las cadenas laterales polares”.

De acuerdo con la ecuación 1.2, la energía de un puente de hidrógeno varía proporcionalmente a $1/r^3$, siendo r la distancia que separa al donador y al aceptor de hidrógeno. Entonces, como las proteínas se compactaron, las distancias entre las cadenas laterales disminuyeron, y por lo tanto, hay un aumento global en la energía de estos puentes de hidrógeno intramoleculares. Este efecto puede explicarse partiendo del hecho de que las energías de los fotones con longitudes de onda verde y rojo (228 y 171 kJ/mol, respectivamente) son del orden de las energías de los puentes de hidrógeno, las cuales oscilan entre 33 y 175 kJ/mol, según lo reportado en la literatura [68]. Esto es debido a que este tipo de luz excita, y en algunos casos rompe los puentes de hidrógeno que conforman a las proteínas.

Por otra parte, investigamos también el efecto de la luz visible en las mismas proteínas que posteriormente fueron irradiadas con UV (se sabe que la energía de esta radiación es capaz de romper enlaces covalentes, como los puentes de disulfuro de 470 kJ/mol). Nuestros experimentos revelan que la radiación resultante de esta combinación (Vis + UV) también produce modificaciones conformacionales en ambas proteínas, evitando un estado desplegado (como ocurre al irradiar con UV). Se observa un desplegamiento moderado de las proteínas, debido a una disminución en la entalpía calorimétrica, indicando que una menor energía es requerida para desdoblarlas (Figura 3.5). Simultáneamente, los residuos aromáticos se exponen cada vez más al medio acuoso (Figura 3.7). Mientras que, el análisis de la distribución de partícula para la β_L -cristalina consolida este suceso, pues la formación de agregados (más de una población) es indicio de que la proteína sufrió fragmentaciones que la situaron eventualmente en un estado desplegado (Figura 3.6). Sin embargo, para el caso de la ovalbúmina no es evidente tal desdoblamiento, debido probablemente a que es más estable. Estas evidencias experimentales indican que las proteínas irradiadas con la combinación Vis + UV, alcanzan un estado menos plegado que el nativo. Los resultados de fluorescencia respaldan lo anterior, pues la disminución de la intensidad fluorescente sugiere una fuerte capacidad de donar hidrógeno del medio hacia la macromolécula [65,66]. Esto implica un incremento en la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua y las proteínas. En otras palabras, las proteínas se mantienen relativamente hidratadas (caso contrario a lo que sucedía

cuando se irradian solamente con luz visible); esto es, no llegan a adquirir un estado tan compacto como el logrado por la luz visible, pues se ve impedida por la dosis de UV a la que fue expuesta, pero tampoco alcanzan un estado de desplegamiento, lo cual sugiere que las proteínas se encuentran en un estado intermedio.

Finalmente, el interesante efecto que tiene la luz visible en las proteínas globulares lo podemos resumir en el siguiente embudo energético modificado de plegamiento de proteínas (Figura 4.2). Si irradian las proteínas globulares solamente con luz visible (λ_{Verde} o λ_{Rojo}), podemos acceder a estados más profundos de energía que el nativo, pues la energía requerida para desdoblar la proteína es mayor que la conformación de mínima energía que se reporta tradicionalmente en la literatura para un pozo de plegamiento de proteínas [5,6]. Mientras que al irradiar las proteínas únicamente con luz ultravioleta (λ_{UV}), necesitamos mucho menos energía para desdoblarlas pues la llevamos a un estado parcialmente desnaturalizado. Finalmente, al exponer a las proteínas a luz visible y luego a radiación ultravioleta ($\lambda_{Verde/Rojo} + \lambda_{UV}$), encontramos que si bien, no podemos lograr un estado igual o más profundo que el nativo con las dosis de luz visible usadas, tampoco se obtiene un estado desplegado.

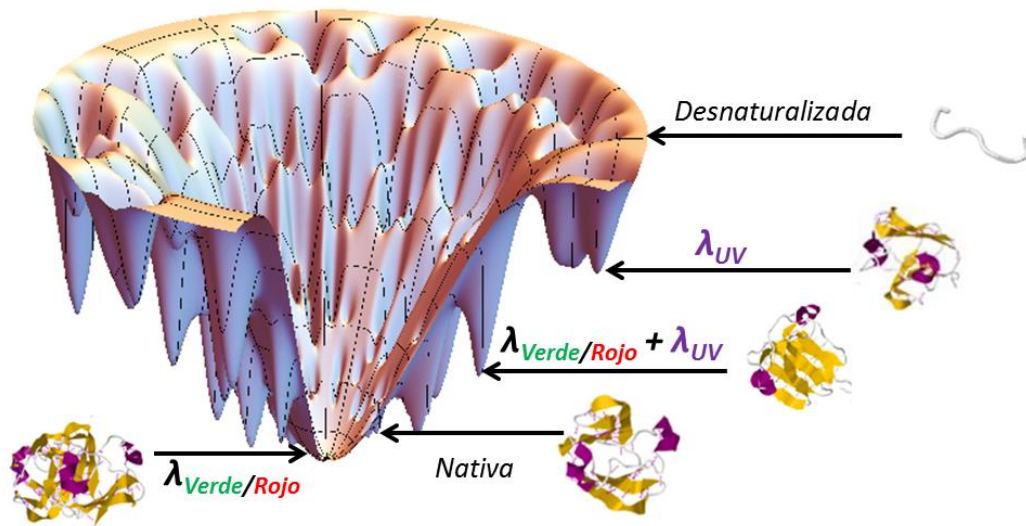


Figura 4.1. Embudo energético de plegamiento de las proteínas irradiadas. Imagen generada del Oas Lab [69].

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la β_L -cristalina y la ovalbúmina expuestas a luz verde y roja durante periodos de tiempo superior a 5 horas dan lugar a cambios conformacionales y termodinámicos. Dichos hallazgos son relevantes, debido a que las alteraciones producidas normalmente por rayos X y radiación UV en tiempos muy cortos se pueden alcanzar con energías más bajas.

Sorprendentemente, la luz verde y roja promueve la agregación en la β_L -cristalina a la dosis más alta, lo cual es una de las aportaciones más importantes de este trabajo, por ser la primera vez que se reporta que radiación de baja energía provoca dichos cambios.

La luz visible (roja y verde) provoca una mayor cohesión o empaquetamiento de las proteínas: ovalbúmina y β_L -cristalina.

La luz verde y roja exhibe un comportamiento peculiar en nuestras proteínas globulares. Ésta puede actuar como un protector contra el daño provocado por los rayos UV, pues minimiza el efecto desnaturizante.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, las perspectivas son las siguientes:

- ❑ Exponer con luz visible a las proteínas globulares por un tiempo de irradiación superior a las 21 hrs, con el fin de localizar el tiempo máximo de irradiación, en el cual se pueda observar acentuadamente el efecto de compactamiento.
- ❑ Irradiar las mismas proteínas con luz azul bajo las mismas condiciones de emisión para fines comparativos.
- ❑ Desnaturalizar las proteínas con otros agentes físicos, por ejemplo, perturbación por calor (desnaturalización térmica), en lugar de la irradiación con UV, y comparar con lo obtenido aquí.
- ❑ Investigar más a fondo si nuestros hallazgos se correlacionan con el fenómeno de la formación de cataratas en los ojos humanos. Para esto, proponemos formar un complejo proteico de nuestra proteína (β_L -cristalina) con una proteína chaperona de la misma familia (α -cristalina). Posteriormente, utilizar las mismas condiciones de irradiación a las mencionadas en este trabajo de tesis.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Britt A.B. *Plant Physiol.*, 108: p. 891, 1995.
- [2] Dr. Wellness. Spectrum of electromagnetic radiation,
<http://www.drwellnesstherapy.com/tanningbeds/article13.php>, 2013.
- [3] Prasad S., Häder P. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1: p. 225, 2002.
- [4] Kowalski W. Ultraviolet germicidal irradiation handbook. 2009.
- [5] Lehninger N. Principles of Biochemistry. 2009.
- [6] McKee T. Biochemistry: The Molecular Basis of Life. 2012.
- [7] Frauenfelder H. The physics of proteins: An introduction to biological physics and molecular biophysics. 2010.
- [8] Particle Sciences, Inc. Technical Brief: Protein Structure. 2009.
- [9] Alberts B. Molecular Biology of the Cell. 2008.
- [10] Hubbard R., *Encyclopedia of Life Science*, (John Wiley & Sons, Ltd): p. 1, 2001.
- [11] Atkins P. Physical chemistry for the life science. 2010.
- [12] Trinkl S., Glockshuber R., Jaenicke R. *Protein Sci.*, 3: p. 1392, 1994.
- [13] Protein Data Bank. *Nature New Biology* 233:223. page www.rcsb.org
- [14] Bax B., et al. *Nature*, 347: p. 776, 1990.
- [15] Mayr E., Jaenicke R., Glockshuber R. *J. Mol. Biol.* 235: p. 84, 1994.
- [16] Slingsby C. *TIBS* 10: p. 281, 1985.
- [17] Wang R., et al. *Mol. Biol. Rep.*, 40: p. 3409, 2013.
- [18] Huntington J.A., Stein P.E. *J. Chromatography B*, 756: p.189, 2001.

- [19] Omana D.A., et al. *Proteomics*, 11: p. 144, 2011.
- [20] Sulkowsky E., et al. *Nature*, 202: p. 36, 1964.
- [21] Kelly M.S., Gay J.L. *Archiv. Mikrobiol.*, 66: p. 259, 1969.
- [22] Klein R.M. *Biol. Rev.*, 67: p. 199, 1992.
- [23] Folta K. M., Maruhnich S.A. *J. Exp. Bot.*, 58: p. 3099, 2007.
- [24] Lee N.Y., et al. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 53: p. 685, 2010.
- [25] Olle M., Virsile A. *Agric. Food Sci.*, 22: p. 223, 2013.
- [26] Sohni J., Vojisavljevic V., Pirogova E. *PIERS Proceedings*, p. 25, 2013.
- [27] Rózanowska M., Sarna T., *Photochem. Photobiol.*, 81: p. 1305, 2005.
- [28] Korbee N., et al. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 80: p. 71, 2005.
- [29] Kuse, Y., et al. *Sci. Rep.*, 4: p. 1, 2014.
- [30] Hori M., et al. *Sci. Rep.*, 4: p. 1, 2014.
- [31] Lee J.B., et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 55: p. 4119, 2014.
- [32] Owaga K., et al. *BMC Complement. Altern. Med.*, 14: p. 120, 2014.
- [33] Klein R.M., Edsall P.C. *Photochem. Photobiol.*, 6: p. 841, 1967.
- [34] Organisciak D.T., Vaughan D.K. *Prog. Retin Eye Res.*, 29: p. 113, 2010.
- [35] Lin C., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: p. 8423, 1995.
- [36] Karu T.I., et al. *Laser Chem.*, 5: p. 19, 1984.
- [37] Idil O., et al. *Jundishapur J. Microbiol.*, 6: p. 230, 2013.
- [38] Muneer S., et al. *Int. J. Mol. Sci.*, 15: p. 4657, 2014.
- [39] Durchschlag H., et al. *Radiat. Phys. Chem.*, 47: p 501, 1996.
- [40] Diffey B.L. *Phys. Med. Biol.*, 36: p. 299, 1991.
- [41] Matallana S., Wattiez R. *Proteomes*, 1: p. 70, 2013.
- [42] Cadet J., et al. *Mutation Research*, 571: p. 3, 2005.

- [43] Banyasz A., et al. *J. Phys. Chem. C*, 113: p. 11747, 2009.
- [44] Vass I., et al. *Eur. J. Biochem.*, 267: p. 2640, 2000.
- [45] Ichihashi M., et al. *Toxicology*, 189: p. 21, 2003.
- [46] Park M., et al. *Exp. Dermatol.*, 22: p. 336, 2013.
- [47] Skobowiat C., et al. *Br. J. Dermatol.*, 168: p. 595, 2013.
- [48] Kehoe J., et al. *J. Agric. Food Chem.*, 56, p. 4720, 2008.
- [49] Manzocco L., Panozzo A., Nicoli M. *Food Chem.*, 135: p. 522, 2012.
- [50] Kaplan J.G., Andrews D.H., Fraser M.J. *J. Colloid Sci.*, 9: p. 203 (1954).
- [51] Muranov K.O., et al. *Exp. Eye Res.*, 92: p. 76, 2011.
- [52] Andley U., Clark B. *Photochem. Photobiol.*, 50: p. 97, 1989.
- [53] World Health Organization. Health topics. www.who.int/en/ , 2016.
- [54] Privalov P.L. *Microcalorimetry of Macromolecules: The Physical Basis of Biological Structures*. 2012.
- [55] Menzel H. Home of macromolecular science.
<http://www.itc.tubs.de/Abteilungen/Makro/makro.html>. 2011.
- [56] Malvern Instruments. *Zetasizer Nano Series User Manual*. 2004.
- [57] Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006.
- [58] Horiba Scientific. *Manual FluoroMax Series*. 2008.
- [59] Centre for Storage Ring Facilities. Aarhus University. www.isa.au.dk , 2013.
- [60] Whitmore L., Wallace B. A. *Nucleic Acids Res.*, 32: p. 668, 2004.
- [61] Khanova H.A., et al. *Biochemistry*, 44: p. 15480, 2005.
- [62] Shinohara H., et al. *Biochem. Biophys. Acta*, 1770: p. 5, 2007.
- [63] Stryer L. *Science*, 162: p. 526, 1968.
- [64] Clark J.H. *J. Gen. Physiol.*, 19: p. 199, 1935.

[65] Zhao G.J., Han K.L. *Acc. Chem. Res.*, 45: p. 404, 2012.

[66] Zhao G.J., et al. *J. Phys. Chem. B*, 111: p. 8940, 2007.

[67] Tarek M., Tobias D.J. *Phys. Rev. Lett.*, 88: p. 138101, 2002.

[68] Sheeler P.J. *Cell and Molecular Biology*. 1987.

[69] Oas Lab. Departments of Biochemistry & Chemistry. Duke University.

https://oaslab.com/Drawing_funnel.html.

APÉNDICE

Publicación

Como contribución científica de este trabajo doctoral, fue publicado el siguiente artículo:

- ✓ Espinoza, J. Horacio; Reynaga-Hernández Elizabeth; Ruiz-García Jaime; Montero-Morán Gabriela; Sanchez-Dominguez Margarita & Hilda Mercado-Uribe. Effects of green and red light in β_L -crystallin and ovalbumin. *Sci. Rep.* **5**, 18120; doi: 10.1038/srep18120 (2015).