



Cinvestav-Monterrey

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

UNIDAD MONTERREY

*Efecto de la luz verde sobre el plegamiento de proteínas
en estado nativo y desplegado*

Tesis que presenta

Ricardo Antonio Corro Hernández

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

Especialidad en Ingeniería y Física Biomédicas

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Apodaca, Nuevo León, Agosto 2018

Agradecimientos

A mi madre, mi hermano y mis abuelos que en la distancia han sabido siempre permanecer a mi lado, brindándome su amor y cariño.

A mi tutora la Dra. Hilda J. Mercado Uribe que me dio su confianza y me compartió su pasión y amor por la ciencia. También a Denisse Fuentes y Yojana J. P. Carreón mis compañeras del laboratorio por su gran apoyo.

A mis sinodales los doctores Bruno A. Escalante Acosta y Moisés Santillán Zerón que fueron guías y amigos durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. J. Carlos Ruiz Suárez por brindarme la confianza para trabajar en su laboratorio y además aportar en el desarrollo del proyecto. También a los miembros de su laboratorio que en incontables ocasiones me brindaron de su ayuda.

A mis profesores del CINVESTAV unidad Monterrey y a mis profesores no oficiales Víctor A. Flores Tamez, Jorge González Gutiérrez y Amelia P. Ríos Rodríguez. Sin su ayuda este trabajo no se hubiera podido concretar.

A Daniela Nevarez, Elisa Villa, Berenice Pérez, Ángela M. Jaramillo, Eduardo Jiménez, Ubaldo Espíndola, Leonardo López, Alberto L. Ramírez, Daniel A. Coronado, Oscar J. Benavides, Rubén Pérez y Roberto A. Ledezma mis compañeros de generación que más que eso, se convirtieron en grandes amigos que durante el desarrollo de este trabajo fueron un gran aliento para seguir adelante.

A la comunidad del CINVESTAV unidad Monterrey que siempre me brindaron un gesto amable y su incondicional ayuda. En particular a Aidee Mayabel Magdaleno Silva, Jahaira Abigail Córdova Romero, Sandra Zue, Karen Garza, Don Nabor, Doña Tony y Doña Berta.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo y a los miembros de su laboratorio Camila Campos, Dra. Karina S. Pérez, Alejandra Dávila y Omar Velásquez que durante el tiempo que trabajé con ellos me brindaron su apoyo y amistad.

A mis amigos Amaury Pérez, Anahí P. González, Verónica A. Vargaz, José Alonso, M. Inés Isidro, Víctor Juárez Quintero, Cinthia Escobar Jarquín, Teresa J. Hernández Abad, Danna O. López, Sergio Valdivia, Ángel A. Torale, Erika Gonzales, C. Mariví Balderas y a la comunidad biomédica. Todos ellos que a pesar del tiempo, la distancia y un sin número de eventualidades, me siguen brindando su amistad.

Al CONACYT por brindarme una beca que me permitió solventar mis gastos durante todo el desarrollo de este proyecto.

Índice

Abstract	4
Resumen.....	5
Introducción	6
Proteínas	7
Estructura de las proteínas.....	7
Enzimas.....	11
Ovalbúmina y tripsina	12
Desplegamiento y replegamiento de proteínas.....	13
Radiación electromagnética.....	15
Antecedentes	17
Pregunta de investigación.....	19
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Metodología	20
Irradiación	20
Absorbancia	22
Fluorescencia.....	23
Cinética enzimática	23
Análisis estadístico	24
Resultados.....	25
Pérdida de agua.....	25
Absorbancia	25
Fluorescencia.....	26
Cinética enzimática	27
Discusión de resultados	29
Conclusiones	30
Perspectivas	30
Bibliografía	31

Abstract

Proteins are essential biomolecules for life. All organisms need them to survive. For this reason, it is important to understand their structure and function. The majority of the protein functions strongly depend of their structure. In other words, if we modify their structure we modify their function. In this thesis, we investigated if green light produces changes in the structure of two globular proteins: trypsin and ovalbumin. These biomolecules were exposed to a dose of 21 hours coming from light emitter diodes (LEDs). We also exposed the same proteins to ultraviolet radiation (UV), and we evaluated the effect of green light when we apply it before UV. Our results obtained through absorbance, fluorescence and enzymatic kinetic show that green light does not produce changes in the structure of these proteins, and this radiation does not have a neutralizing response in the effect of ultraviolet light.

Resumen

Las proteínas son biomoléculas esenciales para la vida. No existe un ser vivo que no las necesite para su supervivencia. Por esta razón, resulta importante entender su estructura y su funcionamiento. La mayoría de las funciones de las proteínas dependen fuertemente de su estructura; es decir, si modificamos su estructura, es muy probable que modifiquemos su función. En esta tesis investigamos si la luz verde produce cambios en la estructura de dos proteínas globulares: tripsina y ovalbúmina. Para ello, estas biomoléculas fueron expuestas a una dosis de 21 horas de luz verde proveniente de diodos emisores de luz (LEDs). También expusimos las mismas proteínas a radiación ultravioleta (UV), y evaluamos el efecto que tiene la luz verde cuando se aplica antes de la UV. Nuestros resultados obtenidos a través de la absorbancia, fluorescencia y cinética enzimática, muestran que la luz verde no produce cambios en la estructura de las proteínas mencionadas, y que esta radiación no tiene una respuesta neutralizante en el efecto de la luz ultravioleta.

Introducción

Los seres vivos estamos formados por células, se dice que la célula es la unidad fundamental de la vida. Esta a su vez, está constituida por cuatro biomoléculas fundamentales: azúcares, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Karp, 2011). Los azúcares son la principal fuente de energía para los seres vivos. Además, pueden desempeñar otras funciones como marcaje celular o formación de estructuras sólidas. Los lípidos también son fuente de energía para los organismos vivos, pero son más conocidos por su papel estructural en las membranas biológicas. También son sustrato para generar mensajeros químicos, hormonas, etc. En los ácidos nucleicos se encuentra codificada la información necesaria para producir proteínas, así como regiones para autorregularse, tienen actividad catalítica e incluso desempeñan funciones estructurales. Las proteínas participan en diversas tareas como son el transporte de moléculas a través de las membranas celulares, forman y transportan vesículas en el interior de las células, forman andenes estructurales del citoesqueleto, son uniones intercelulares, son receptores o mensajeros moleculares y también aceleran reacciones químicas dentro y fuera de las células (Hans Frauenfelder, 2010; Bruce Alberts, 2015). En general, es difícil enumerar toda la gama de tareas en que se ven involucradas, de ello se puede inferir la gran relevancia que tienen para la vida y porque es necesario entender como están formadas, como funcionan y que agentes pueden modificarlas.

Proteínas

La proteómica es la ciencia que se encarga del estudio y caracterización de las proteínas. A lo largo de los años se han desarrollado diferentes técnicas como la medición de absorbancia, fluorescencia, cristalización, difracción de rayos X, etc. que han permitido descifrar diferentes características de las proteínas, como son su composición química, su función dentro del organismo y en algunos casos, sus estructuras tridimensionales (Karp, 2011; Hoefnagels, 2018).

Estructura de las proteínas

Las proteínas están formadas por aminoácidos, los cuales son moléculas que se caracterizan por tener un grupo amino y otro carboxilo unidos a un átomo de carbono (carbono alfa), los cuales se distinguen entre sí gracias a su cadena lateral conocido como grupo R. De toda la gama de aminoácidos que pudieran formarse, son 20 los que componen a las diversas proteínas de la naturaleza (ver fig.1) (Santos, 2009; David L. Nelson, 2013).

Para que los aminoácidos puedan formar proteínas es necesario que se unan entre sí a través de enlaces peptídicos. Estos son la unión covalente entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido. Al conjunto de aminoácidos enlazados por enlace peptídico se les conoce como cadena polipeptídica. El orden en que se unen los aminoácidos es de gran importancia ya que determina la estructura y las propiedades de las proteínas (Santos, 2009; David L. Nelson, 2013; Hans Frauenfelder, 2010).

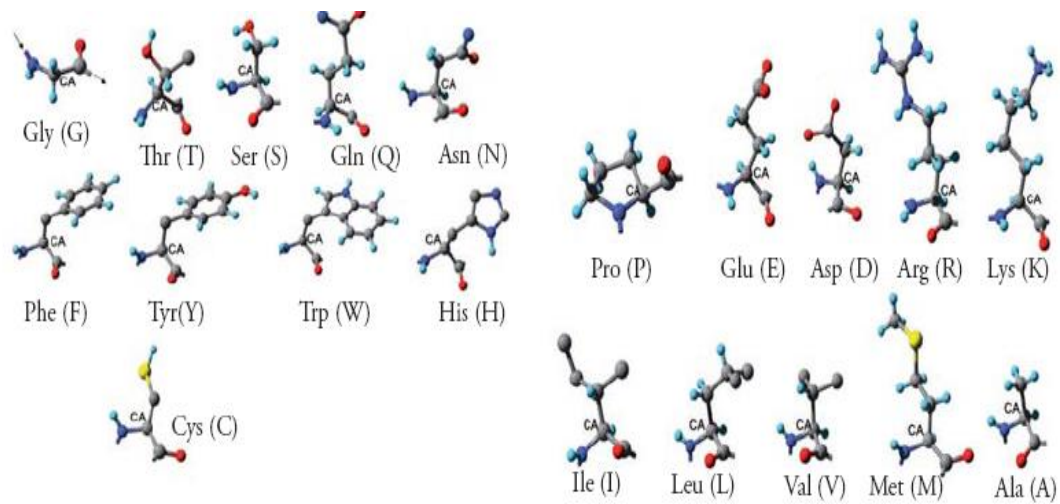


Figura 1. Aminoácidos presentes en proteínas. En esta figura se esquematizan los 20 aminoácidos que encontramos en la naturaleza formando proteínas. En color gris se representa el carbono, en rojo el oxígeno, en azul el nitrógeno, en celeste el hidrógeno y en amarillo el azufre. El carbono alfa indica con "CA". Imagen tomada de (Santos, 2009).

La secuencia con que se enlazan los aminoácidos se conoce como estructura primaria y es el resultado de dos procesos, la transcripción y traducción (ver fig.2). La transcripción se lleva a cabo en el núcleo de las células y consiste en sintetizar una molécula de mRNA partiendo de una región (gen) del DNA en donde se encuentra codificada la secuencia de aminoácidos para la síntesis de la proteína en cuestión. El mRNA sintetizado viaja hasta el citoplasma para su consecuente traducción. La traducción es la síntesis de una cadena polipeptídica partiendo de la información codificada en el mRNA previamente sintetizado. Este trabajo lo llevan a cabo unas moléculas llamadas ribosomas, las cuales se encuentran en citoplasma y en el retículo endoplásmico de las células (Karp, 2011; Bruce Alberts, 2015).

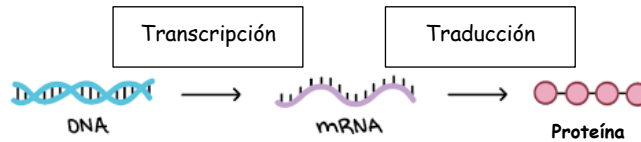


Figura 2. Esquema de la síntesis de proteínas. En color azul se representa el DNA, en morado RNA mensajero (mRNA) y en rojo la secuencia de aminoácidos de la proteína sintetizada. Imagen tomada de (Khan Academy, 2018).

La cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma y produce dos estructuras: hélices alfa y láminas beta. Ambas son la estructura secundaria (ver fig. 3). Las hélices alfa y láminas beta que se forman interactúan entre sí y se organizan de tal manera que producen una estructura aún más complejas que denominamos estructura terciaria. En este punto ya podemos llamar proteína a este arreglo de aminoácidos. Sin embargo, hay proteínas más complejas que están formadas por subunidades con organización terciaria, a este nivel de organización se le llama estructura cuaternaria (ver fig. 4). Una vez que la proteína está completamente plegada se dice que se encuentra en su estado nativo (Santos, 2009; Hoefnagels, 2018).

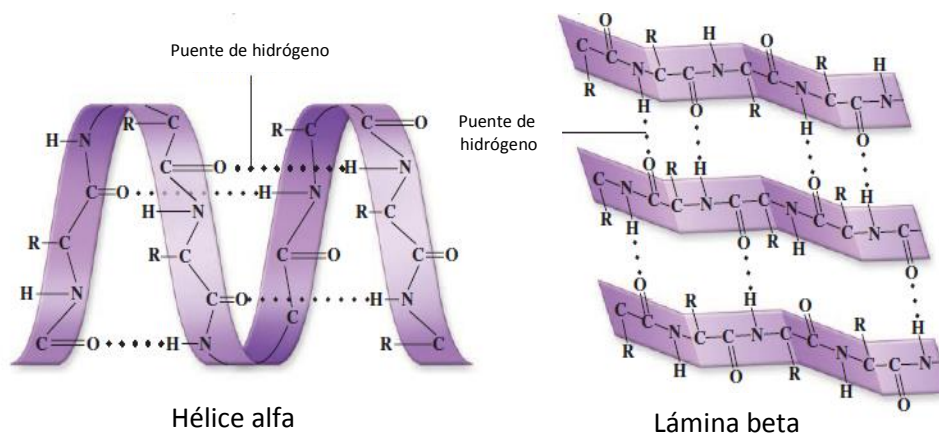


Figura 3. Estructura secundaria. En esta figura se esquematiza las dos estructuras en que puede plegarse la estructura primaria. Del lado izquierdo se encuentra la hélice alfa y del lado izquierdo la lámina beta. Imagen tomada y modificada de (Hoefnagels, 2018).

Aún no se entiende por completo el proceso de plegado de las proteínas, pero se sabe que la configuración plegada tiene menor energía, por lo tanto es más estable (Santos, 2009; Igor N. Berezovsky, 2016; Bruce Alberts, 2015). Una vez plegadas las proteínas aún pueden sufrir otras modificaciones para su correcto funcionamiento como glucosilaciones, metilaciones, etc. (Bruce Alberts, 2015).

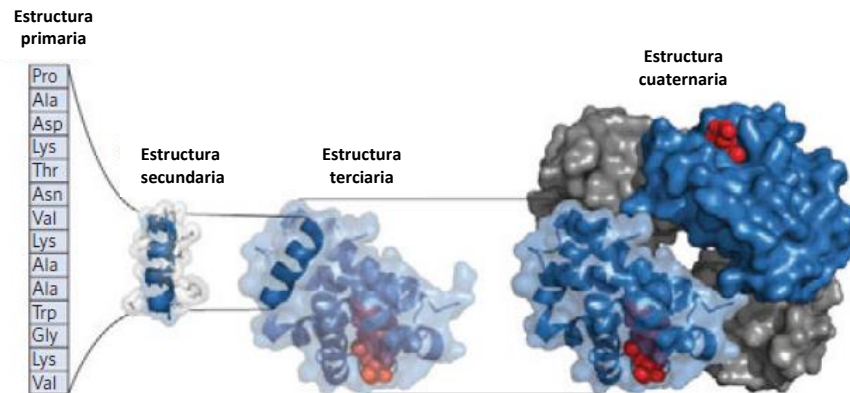


Figura 4. Niveles de organización. En esta figura están representados los diferentes niveles de organización en las proteínas. Están ordenados según su complejidad de izquierda a derecha partiendo de la estructura primaria y llegando hasta estructura cuaternaria. Imagen tomada y modificada de (David L. Nelson, 2013).

Durante el proceso de síntesis es posible que el pegamiento de las proteínas no ocurra de forma correcta, es por esto que la naturaleza ha desarrollado una estrategia para garantizar que la mayoría de las proteínas lleguen a buen término, las chaperoninas. Las chaperoninas son proteínas que reconocen proteínas mal plegadas y ayudan a que estas adquieran la configuración correcta. En caso de que estos esfuerzos fueran insuficientes, las células también tienen una estructura encargada de reciclar las proteínas dañadas o mal plegadas, esa estructura es el proteosoma (Bruce Alberts, 2015).

Los diferentes niveles de organización y las diversas modificaciones post-traduccionales dan cuenta de la inmensa gama de tipos de proteínas con que cuenta

la naturaleza y también de sus variadas funciones. Entre esta variedad encontramos a las enzimas.

Enzimas

Las enzimas son un tipo de proteínas que tienen la propiedad de ser catalizadores específicos para una reacción química. Un catalizador es una sustancia con la capacidad de hacer más rápida una reacción química sin consumirse en ella (James N. Spencer, 2000; Mathews & Holde, 2001). Las enzimas permiten la vida, ya que sin ellas muchas de las reacciones que sustentan la vida se llevarían a cabo en escalas de tiempo tan largas que serían incompatibles con la vida (ver tabla 1). Además, gracias al entendimiento de las mismas se han podido utilizar en la ingeniería química, tecnología alimentaria, la agricultura, etc (Karp, 2011).

Enzima	$t_{1/2}$ sin enzima	Aumento de velocidad
OMP descarboxilasa	78 000 000 años	1.4×10^{17}
Nucleasa estafilocócica	130 000 años	5.6×10^{14}
Adenosina desaminasa	120 años	2.1×10^{12}
AMP nucleosidasa	69 000 años	6.0×10^{12}
Citidina desaminasa	69 años	1.2×10^{12}
Fosfotriesterasa	2.9 años	2.8×10^{11}
Carboxipeptidasa A	7.3 años	1.9×10^{11}
Cetosteroide isomerasa	7 semanas	3.9×10^{11}
Triosafofato isomerasa	1.9 días	1.0×10^9
Corismato mutasa	7.4 h	1.9×10^6
Anhidrasa carbónica	5 s	7.7×10^6
Ciclofilina humana	23 s	4.6×10^5

Tabla 1. Actividad catalítica de diversas enzimas. En la primera columna se enlistan diferentes enzimas. En la segunda columna se muestran los tiempos que tardan los reactivos en convertirse en productos en ausencia de la enzima. En la tercera columna se muestra el aumento de la velocidad en presencia de la enzima. Tabla toma y modificada de (Karp, 2011).

Esta propiedad de hacer más rápidas las reacciones químicas nos permite también evaluar su actividad, ya que es posible monitorear la velocidad con que se

lleva a cabo una reacción a través de una técnica llamada cinética enzimática. En términos generales esta técnica consiste en medir la velocidad de una reacción determinada en presencia de una enzima y algún tratamiento que se sospeche cambiará la función de la enzima y por ello alterará la velocidad con que se lleva a cabo la reacción.

En este proyecto trabajamos con dos proteínas: ovalbúmina y tripsina. Tripsina es una enzima por lo que es posible realizar una cinética enzimática con ella.

Ovalbúmina y tripsina

Ovalbúmina es la proteína más abundante en la yema del huevo, más del 60%, tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa (Stein, Leslie, & Finch, 1991). Tripsina es comúnmente usada en los laboratorios debido a su actividad de proteasa, es decir, que es capaz de digerir proteínas cortando los enlaces peptídicos, es secretada como parte del jugo pancreático y tiene un peso molecular de 23.8 kDa (Nasser Brumano, Rogana, & Swaisgood, 2000; David L. Nelson, 2013). Ambas son proteínas globulares, solubles en agua y han sido bastante estudiadas a lo largo de los años.

Estas proteínas son económicas y de fácil obtención, además son de fácil manejo y almacenamiento. Otro aspecto a resaltar es que sus estructuras cristalizadas son bien conocidas (ver fig. 5). Todo esto las convierte en excelentes modelos experimentales para estudiar los cambios estructurales en las proteínas, es por eso que fueron escogidas para el presente trabajo.

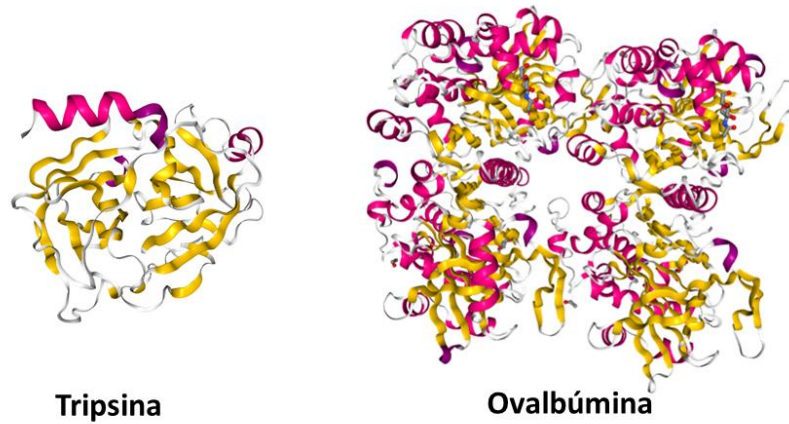


Figura 5. Modelos de tripsina y ovalbúmina. En esta figura se muestra el *modelo in silico* de tripsina y ovalbúmina. En morado se ilustran las hélices alfa y en amarillo las láminas beta. Imagen tomada de (RCSB Protein Data Bank, 2017).

En general, todas las proteínas dependen de la integridad de su estructura para desempeñar sus funciones (David L. Nelson, 2013). Como veremos a continuación, existen varios agente que alterar su estructura y por lo tanto, su funcionamiento.

Desplegamiento y replegamiento de proteínas

Cuando una proteína adquiere su estado nativo se dice que se ha plegado. Sin embargo, existen diversos agentes que pueden modificar la estabilidad de esta conformación provocando la pérdida de la estructura cuaternaria, terciaria y/o secundaria. A este pérdida de la estructura se le denomina despleamiento, lo que conduce a la pérdida de su función (Santos, 2009).

Antes de la década de los años 50 no había un consenso sobre cómo se pliegan las proteínas y aunque aún es un tema de estudio, el primer gran paso para comprenderlo fue dado por el investigador Christian Anfinsen en 1956. Descubrió que si desplegaba una proteína y después extraía el agente que la desplegó, la proteína se volvía a plegar recuperando su función (ver fig. 6). ¡La proteína se replegaba! Con este hallazgo pudo deducir que la información necesaria para el plegamiento de las proteínas se encontraba en la estructura primaria y que gracias a

la conjunción de fuerzas hidrófobas, hidrofílicas y a las fuerzas de Van der Waals, la proteína era capaz de plegarse sobre sí misma hasta alcanzar su forma nativa (Anfisen, 1973; Karp, 2011). Sin embargo, esto no ocurre con todas las proteínas. Existen algunas que requieren la participación de chaperoninas para poder alcanzar su conformación funcional (Bruce Alberts, 2015).

No obstante, el estudio del replegamiento de las proteínas sigue siendo un campo vigente y se siguen desarrollando diversas técnicas para tratar de hacer más eficiente el proceso (Run-Chao & cols.; Volodina, Avnir, & Vinogradov, 2017; Ishimaru, Ito, Tanaka, & Matsudomi, 2017; Ganim & Rief, 2017).

Los agentes que pueden desplegar a una proteína son de diversa naturaleza, pueden ser jabones, solventes orgánicos, ácidos, bases, altas o muy bajas temperaturas, esfuerzos mecánicos e incluso la radiación electromagnética (H. Durchschlag, 1999; Santos, 2009; Md Abu Bakar Siddique, 2017). Este último agente lo analizaremos más a detalle en la siguiente sección.

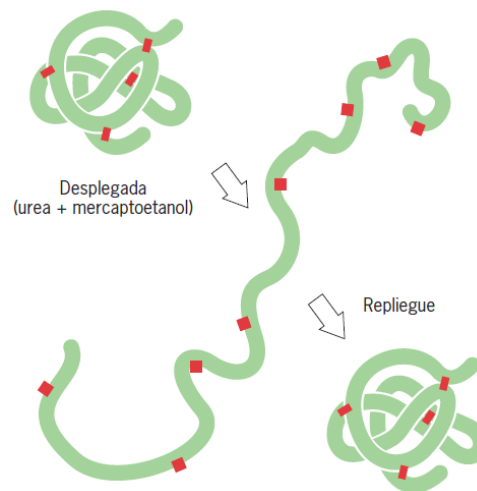


Figura 6. Desplegamiento y replegamiento. En esta figura se esquematiza el proceso de desplegamiento con urea y mercaptoetanol como agente desplecante y el replegamiento al quitarlo de una molécula de ribonucleasa, proteína con la que trabajó Christian Anfisen. En rojo se marcan los puentes disulfuro que presenta esta proteína. Imagen tomada de (Karp, 2011).

Radiación electromagnética

La radiación electromagnética es una propagación de energía que da lugar a fenómenos de difracción, interferencia y polarización, como una onda, pero que al mismo tiempo se comporta como un flujo constante de partículas. Dado lo anterior, se asume a la radiación electromagnética como un fenómeno dual (Beiser, 1990; Björn, 2015).

Debido a su cualidad de onda la radiación electromagnética puede ser caracterizada por su longitud de onda (Klein, 1966). La luz visible corresponde al intervalo que va de 400 a 700 nm (ver fig. 7). El resto de longitudes de onda son invisibles para nuestros ojos. Sin embargo, podemos ver sus efectos y con ellos percatarnos de su presencia. Los rayos X por ejemplo son utilizados en medicina debido a que su longitud de onda es absorbida por los huesos de nuestro cuerpo y permite tomar imágenes de ellos con los rayos X. En el otro extremo tenemos e infrarrojo que ha sido utilizado para transmitir información. Las microondas que son capaces de agitar las moléculas del agua y con ello calentar nuestros alimentos.

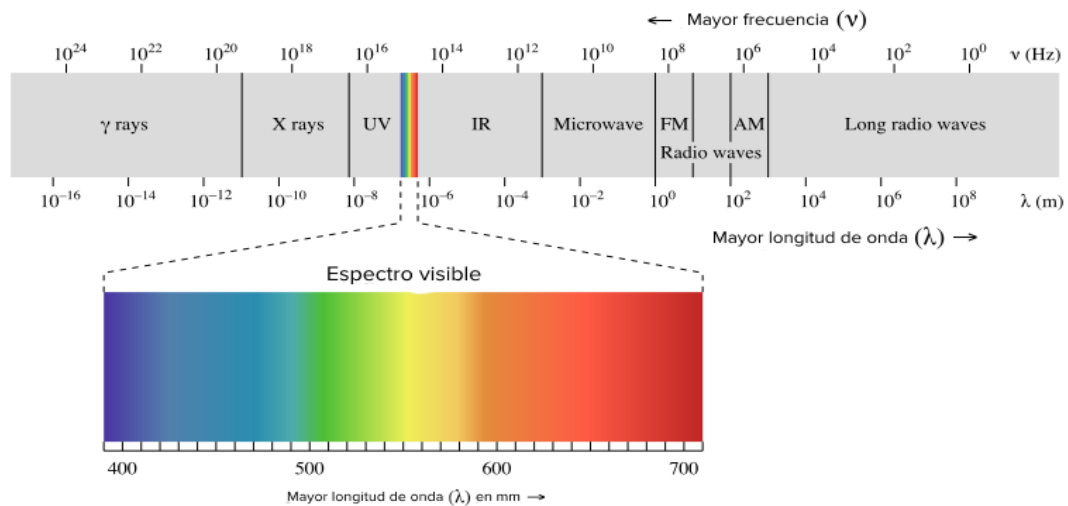


Figura 7. Espectro electromagnético. Se ilustran diferentes longitudes de onda ordenadas de izquierda a derecha de las que tienen mayor energía hasta las de menor energía. Se resalta en colores el rango que corresponde a la radiación visible. Imagen tomada de (Academy, 2017)

Nuestra fuente de radiación electromagnética por excelencia es sin duda el Sol. Una estrella amarilla compuesta por átomos de hidrógeno que se fusionan y dan lugar a átomos de helio. Esta reacción genera la energía que irradia y llega hasta nuestro planeta donde la podemos percibir como calor y luz (Asimov, 1993). Pero esta luz que llega puede ser peligrosa, esto se debe a que además de luz visible también llega luz UV (200 a 400 nm), que al tener menor longitud de onda es más energética y las proteínas son capaces de absorberla, lo que puede provocar que estas se desplieguen y ello conduzca a un mal funcionamiento (McLean & Giese, 1950; L.G. & Ghiron, 1961; Donovan, John W., 1969; Björn, 2015).

En este trabajo exploraremos la radiación electromagnética en el rango de 490-540nm, que se encuentra dentro del espectro visible y corresponde a la luz verde. A continuación, se presentarán algunos de los descubrimientos que hacen interesante el estudio de este rango de longitud de onda en particular.

Antecedentes

En diversos estudios se ha reportado una gran variedad de efectos asociados con tratamientos con luz verde como la estimulación del crecimiento de algunas plantas, produciendo bajo crecimiento en otras e incluso en disminuyendo el crecimiento de células HeLa (Edsall, 1967; Sommer & Ralf-Peter, 2006; Folta & Maruhnich, 2007; Choi, Kim, Choi, Kim, & Oh, 2016). Sin embargo, no existe un consenso de cuál es la razón de estas observaciones. Como ya es conocido, las proteínas no absorben luz en el rango que corresponde al espectro visible, es debido a esto que resulta difícil determinar las causas de los efectos encontrados. Se han postulado diversas explicaciones como adjudicarles estos cambios a modificaciones en la producción de radicales libres, a la expresión de genes, a la interacciones del agua, etc. (Sommer & Ralf-Peter, 2006; Folta & Maruhnich, 2007; Onder Idil, 2013; Yoshiki Kuse, 2014). Comorosan y colaboradores proponen que la luz verde es capaz de provocar cambios en el agua y que debido a esto podemos observar cambios en los sistemas biológicos con que se trabajen (Comorosan, y otros, 2014; Comorosan, y otros, 2015). Nuestro grupo de laboratorio en 2015 reportó que la exposición a radiación verde y roja conduce a cambios conformacionales en proteínas globulares (beta-cristalina y ovoalbúmina) (Espinoza & Mercado-Uribe, 2015).

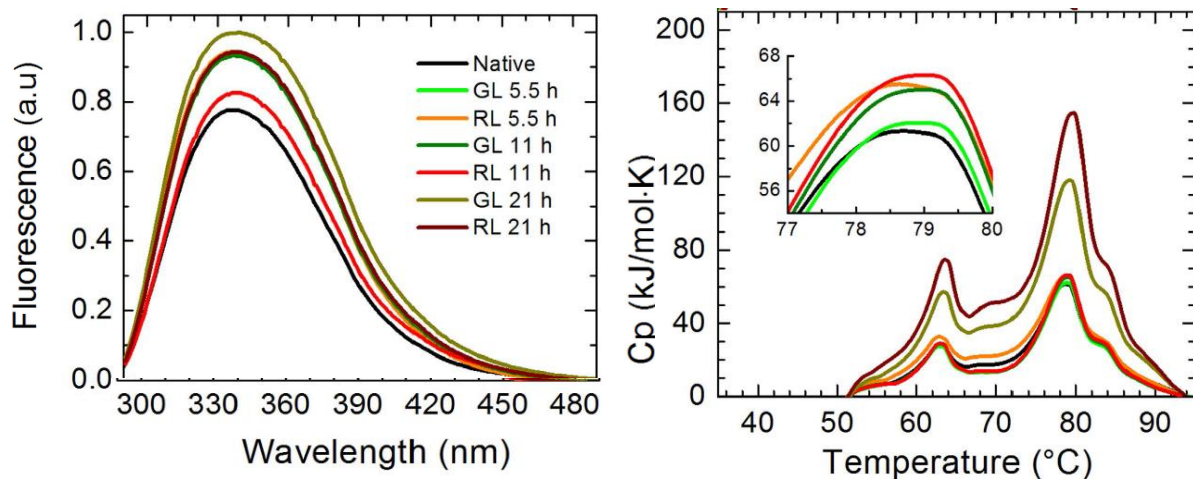


Figura 8. Efecto de la luz verde y roja en ovalbúmina. Del lado izquierdo se muestra la señal de fluorescencia y en el derecho la señal de calorimetría. Figuras tomadas y modificadas de (Espinoza, & Mercado-Uribe, 2015).

En 2017 Espinoza y Mercado-Urbe (Espinoza & Mercado-Urbe, 2017) describen que además de producirse modificaciones estructurales, también se genera un aumento en la resistencia a la desnaturalización por luz ultravioleta en las proteínas irradiadas previamente con luz verde y roja. Esto sugiere que la luz verde y roja son capaces de provocar un efecto neutralizante a los efectos de la luz UV (ver Fig. 9).

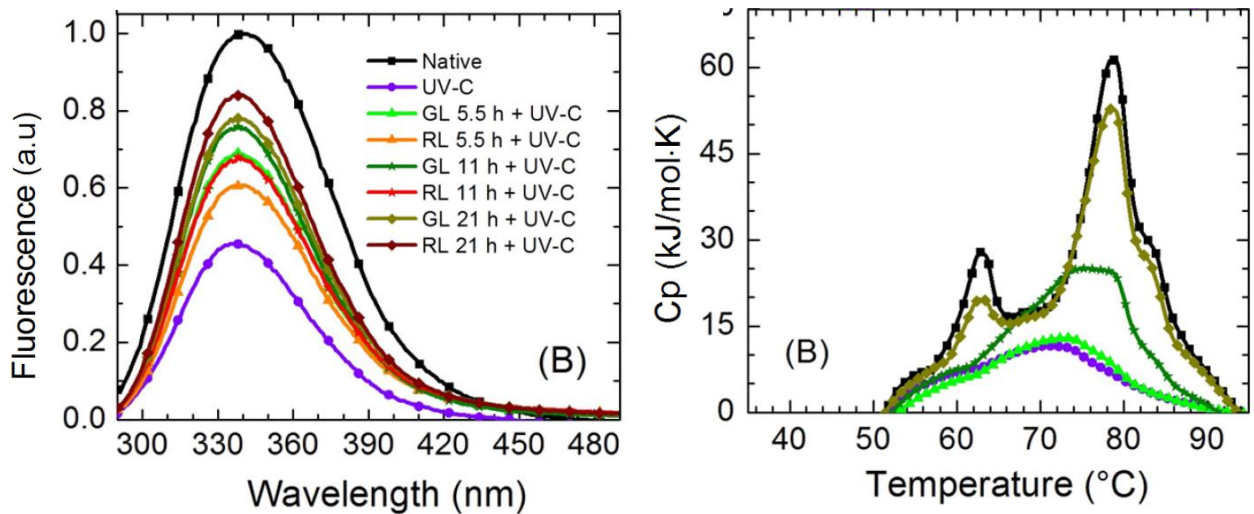


Figura 9. Efecto neutralizante de la luz verde y roja en ovalbúmina. Del lado izquierdo se muestra la señal de fluorescencia y en la gráfica de la derecha se puede observar la señal de calorimetría. Figuras tomadas y modificadas de (Espinoza & Mercado-Urbe, 2017).

Aunque los resultados previamente descritos constatan que la luz verde es capaz de provocar cambios en las proteínas, no se detallan los cambios específicos que ocurren en ellas, sugieren un cambio en el arreglo estructural, pero no a que nivel del plegado, ni tampoco si pudieran ser afectadas las proteínas desplegadas presentes al irradiar la muestra de proteína. Es por esto que nos planteamos responder la siguiente pregunta de investigación.

Pregunta de investigación

¿Qué cambios en el plegamiento produce la exposición a luz verde en proteínas nativas y desplegadas?

Hipótesis

La exposición a luz verde conduce a un plegamiento más estable de proteínas en estado nativo y a un replegamiento de las proteínas desplegadas.

Objetivo general

Caracterizar los cambios en estructura de proteínas en su forma nativa y desplegada.

Objetivos específicos

- Determinar el tiempo de exposición e irradiancia necesarios para producir un cambio en las proteínas.
- Determinar qué cambios en el plegamiento produce la luz verde sobre las proteínas respecto a su plegamiento nativo.
- Determinar si la luz verde produce replegamiento en las proteínas desplegadas.

Metodología

Como modelo experimental se eligieron dos proteínas globulares: tripsina (23.8 kDa) y ovalbúmina (45 kDa). Ambas fueron compradas a Sigma-Aldrich en su presentación liofilizada y fueron suspendidas en buffer PBS (PO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM). La tripsina se preparó a una concentración de 0.312 mg/mL a un pH de 7.4. La ovalbúmina se preparó a una concentración de 1 mg/mL a un pH de 7.2. En ambos casos el pH se ajustó usando HCl. Posteriormente se colocaron en tubos Falcon de 15 mL y se almacenaron por aproximadamente una semana a -20°C para su posterior utilización.

Irradiación

Para irradiar las muestras, primeramente se descongeló un tubo de proteína colocándolo a una temperatura de 24°C por 1 hora. Posteriormente se colocaron 5 mL de la suspensión de proteína en dos cajas Petri respectivamente. Se pesó cada una de las cajas para registrar la masa antes del proceso de irradiación. Después se colocó una de ellas debajo de un arreglo de LEDs (LED-P3G-200/41) que emite luz verde (490-540 nm) con una irradiancia de 1.05 W/m² a una distancia de 1.5 cm y se mantuvo así por 21 horas, mientras la otra caja Petri se colocó a una distancia tal que evitara ser expuesta a la irradiación del arreglo de LEDs por el mismo tiempo. La irradiación se realizó en una caja oscura a temperatura controlada de 23-24°C. Una vez finalizada, se volvió a pesar cada caja Petri para registrar su masa y con la diferencia del valor de la masa se determinó la pérdida de agua debida a la evaporación. Después de la irradiación con luz verde se tomaron 2.4 mL de la muestra irradiada y 2.4 mL de la muestra sin irradiar y se colocaron 300µL en 16 pozos de una placa de 96 pozos. La distribución fue tal que permitió irradiar con luz UV-C (254 nm) al mismo tiempo la mitad de los pozos con la proteína irradiada y la mitad de los pozos con la proteína no irradiada. Para irradiar con UV-C se utilizó una

lámpara Mini UV (UVG-4, UVP) a una distancia de 1.5 cm con una irradiancia de 10.5 W/m² (ver fig. 10 y 11).

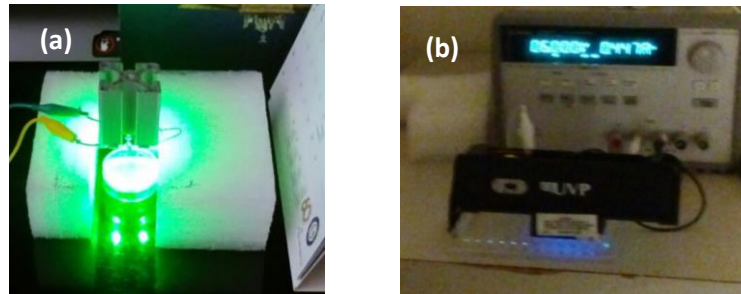


Figura 10. Equipo de irradiación. En la figura (a) se muestra una fotografía del arreglo de LEDs verde irradiando una muestra, la figura (b) muestra la lámpara de luz UV-C irradiando una placa de 96 pozos.

Después del tratamiento con luz UV obtuvimos cuatro muestras diferentes:

- Control: no recibió el tratamiento de luz verde ni el tratamiento de luz UV-C.
- Verde: fue expuesta por 21 horas a luz verde.
- UV: fue expuesta por 1.5 horas a UV-C.
- Verde + UV: fue expuesta por 21 horas a luz verde y después 1.5 horas a UV-C.

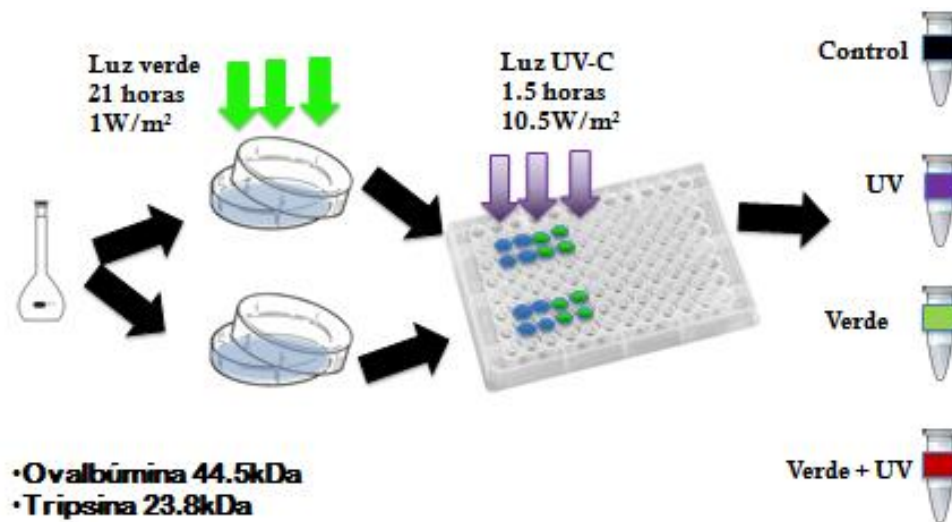


Figura 11. Arreglo experimental. En esta imagen se esquematizan de izquierda a derecha la secuencia de pasos del tratamiento de irradiación al que se sometieron las proteínas. Al final de los tratamientos obtenemos cuatro grupos: control (negro), tratado con UV (morado), tratado con luz verde (verde) y ambos tratamientos (rojo).

Cada muestra fue sometida a la medición de absorbancia y fluorescencia. En el caso de tripsina también se analizó la velocidad de reacción a través de una cinética enzimática.

Absorbancia

Una vez que la proteína fue irradiada se colocó en hielo y se analizó en un equipo NanoDrop 2000/2000c, marca Thermo Scientific. Se realizó un barrido de absorbancia de 220 a 340 nm, usando un volumen de 2 μ L de la muestra. Cada muestra se midió de manera consecutiva. Una vez obtenidos los datos, estos se graficaron con el programa OriginPro8. Se consideró la intensidad a 280 nm como parámetro de interés debido a que las proteínas absorben a esta longitud de onda.

La absorbancia de una solución de proteínas depende de la presencia de grupos aromáticos (figura 1) y de la concentración de proteína con que se esté trabajando (Santos, 2009; Hans Frauenfelder, 2010; David L. Nelson, 2013), si modificamos la concentración de proteína, la absorbancia se modificará. Por otro lado, si la cantidad de grupos aromáticos de la muestra cambia o la capacidad de absorción de los mismos, la absorbancia de la muestra también se verá alterada, de igual manera si se producen moléculas que absorban en el rango de longitud de onda en que estamos midiendo, también veremos modificada la curva de absorbancia. En particular, la irradiación con luz UV provoca la oxidación de los grupos aromáticos. Por ello es de esperar un aumento en la absorbancia (McLean & Giese, 1950; Augenstine, Chiron, Grist, & Mason, 1962).

Fluorescencia

Después del tratamiento de irradiación, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (23-24°C). Para medir la fluorescencia se usó un espectrofluorómetro, FluoroMax-4 marca HORIBA JOBIN YVON. Se colocó 1 mL de la proteína en una celda cilíndrica de vidrio, posteriormente se excitó con una longitud de onda de 280 nm y se registró la emisión de 290 a 500 nm y se analizaron los datos con el programa FluorEssence. Se consideró el valor máximo de fluorescencia como parámetro de interés.

La fluorescencia de las proteínas depende de la presencia de grupos aromáticos en las mismas y de su ubicación con respecto al medio acuoso, una configuración que los exponga en mayor medida al buffer en que se encuentran suspendidas, provocará una disminución en su fluorescencia. En caso que estos grupos se encuentren en un medio anfipático como suele ser el núcleo de las proteínas la fluorescencia se verá favorecida (Santos, 2009; Hans Frauenfelder, 2010).

Cinética enzimática

Las pruebas de cinética enzimática sólo se hicieron en tripsina debido a que ovalbúmina no es una enzima.

Después de irradiar la muestra, se colocaron en hielo. Para medir la actividad enzimática se usó un Multiskan GO marca Thermo Scientific. Las muestras se colocaron en una placa de 96 pozos, de los cuales sólo se usaron seis. En el primer pozo se colocaron 40 µL dimetilsulfóxido (DMSO) que es el solvente en que se disolvió el sustrato utilizado y 160 µL de la proteína sin irradiar, en el segundo pozo se colocaron 160 µL de buffer PBS y 40 µL de N α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida, clorhidrato (BAPNA) a 4 mM, que es el sustrato sobre el que actúa la enzima. En los pozos restantes se colocaron 160 µL de proteína sin irradiar (pozo 3), irradiada con

UV (pozo 4), irradiada con luz verde (pozo 5), e irradiada con verde y UV (pozo 6). Finalmente la reacción se inició colocando 40 μ L del sustrato. Inmediatamente después de agregar el sustrato se inició la lectura de las muestras. Se registraron 300 puntos cada 2 segundos. La lectura de la muestra se realizó a una longitud de onda de 410 nm a 25°C. Una vez obtenidos los datos se procesaron en OriginPro8. Se tomaron los primeros 20 puntos que corresponden a la primera etapa de la reacción, donde es lineal y así se puede ajustar estos datos a una recta para medir las pendientes.

Análisis estadístico

Una vez obtenidas las mediciones correspondientes se realizó el análisis estadístico con ayuda del programa GraphPad Prism 5. Se utilizó la prueba T-Student para comparar al grupo control con el tratado con luz verde, así como al tratado con UV contra el grupo que tenía ambos tratamientos. Se consideró como criterio de exclusión a los experimentos donde la diferencia de peso antes y después fue 0.2 gramos mayor en un grupo con respecto al otro. Para cada grupo se completó una $n=5$ y se consideró una $p \geq 0.05$. A continuación se presentan los resultados correspondientes a los experimentos antes mencionados.

Resultados

En esta sección se describirán los resultados separados por método de medición. Se incluye un registro típico de cada medición en cada proteína. Las gráficas de barra corresponden a la media obtenida de cinco experimentos independientes, también se muestra el error estándar para cada medición.

Pérdida de agua

En la figura 12 podemos observar los valores de la pérdida de agua del grupo control (barras negras) y el grupo tratado con luz verde (barras verdes) para tripsina y ovalbúmina. Al comparar ambos grupos podemos notar que no se observan diferencias significativas, esto sugiere que la pérdida de agua debida a la evaporación fue similar en ambos grupos. No se tomaron mediciones relacionadas con el tratamiento con luz UV debido a que el tratamiento dura muy poco tiempo en comparación al tratamiento con luz verde.

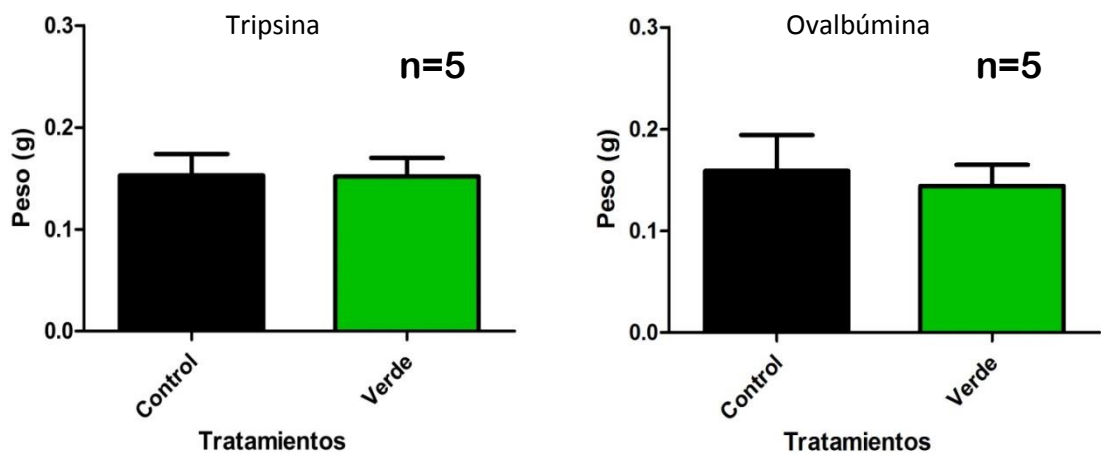


Figura 12. Gráficas de pérdida de agua. En esta figura se muestran las gráficas de la media \pm error estándar de la diferencia de peso antes y después de irradiar con luz verde por 21hrs. Del lado izquierdo podemos observar los resultados de tripsina y del lado de ovalbúmina.

Absorbancia

Respecto a la absorbancia podemos notar en las figuras 13 y 14 del lado izquierdo que no hay cambios evidentes entre el grupo control (trazo negro) y el tratado con luz verde (trazo verde), tampoco se observaron diferencias claras entre el grupo tratado con luz UV-C (trazo morado) y el tratado con luz verde y posteriormente con luz UV-C (trazo rojo). Del lado derecho se muestran la media más el error estándar de las mediciones de la absorbancia a 280 nm para cada grupo experimental. Al comparar los grupos tampoco se observaron diferencias significativas.

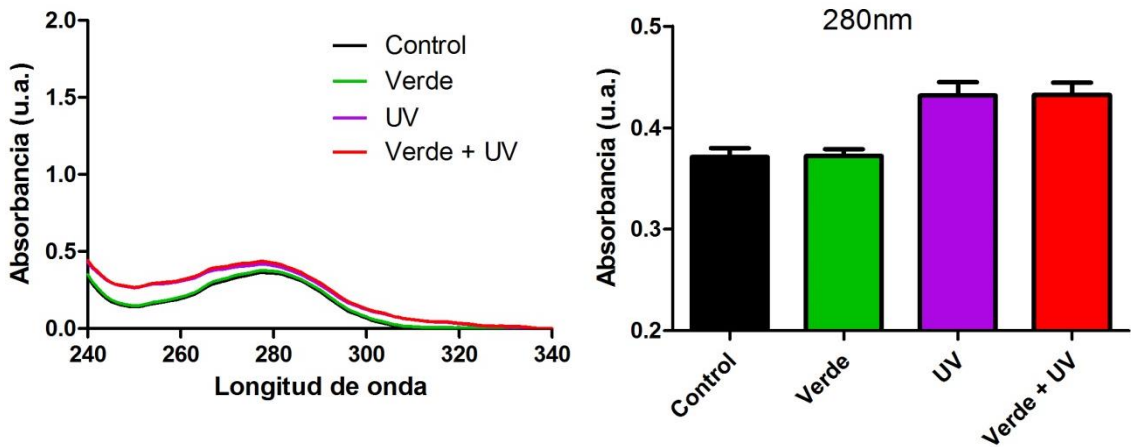


Figura 13. Absorbancia de tripsina. En la figura del lado izquierdo se muestra un registro típico correspondiente a la absorbancia de tripsina (0.312 mg/mL) con sus diferentes tratamientos. En el lado derecho se observan las medias \pm error estándar para cada grupo experimental, n=5.

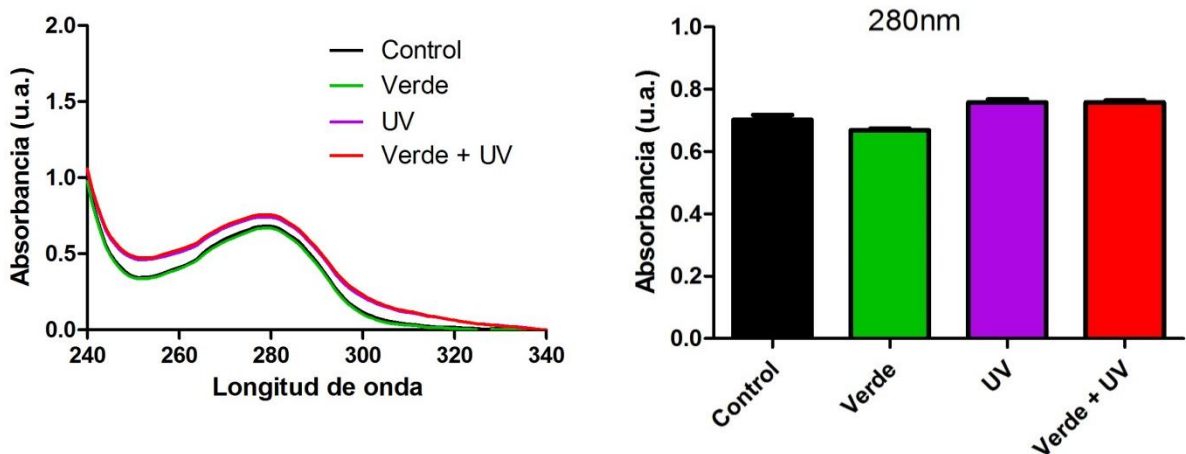


Figura 14. Absorbancia de ovalbúmina. En la figura del lado izquierdo se muestra un registro típico correspondiente a la medición de absorbancia en ovalbúmina de 68% (1 mg/mL) de pureza con sus diferentes tratamientos. En el lado derecho podemos observar las medias \pm error estándar para cada grupo experimental, n=5.

Fluorescencia

En relación a los experimentos de fluorescencia podemos observar en las figuras 15 y 16 del lado izquierdo que no existe ninguna diferencia entre los grupos tratados con luz verde contra sus respectivos controles. Del lado derecho se muestran los promedios con su respectivo error estándar, para cada grupo experimental. En estas figuras es posible discernir que efectivamente no hay cambios debidos a los tratamientos con luz verde en tripsina ni en ovalbúmina.

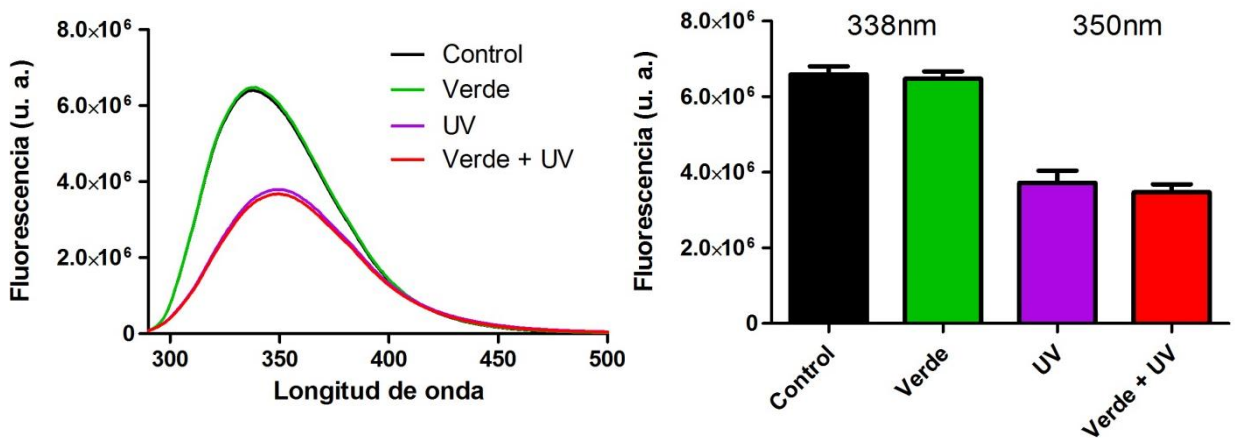


Figura 15. Fluorescencia de tripsina. En la figura del lado izquierdo se muestra un registro típico correspondiente a la medición de la fluorescencia de tripsina (0.312 mg/mL) con sus diferentes tratamientos. En el lado derecho podemos observar las medias \pm error estándar para cada grupo experimental, n=5.

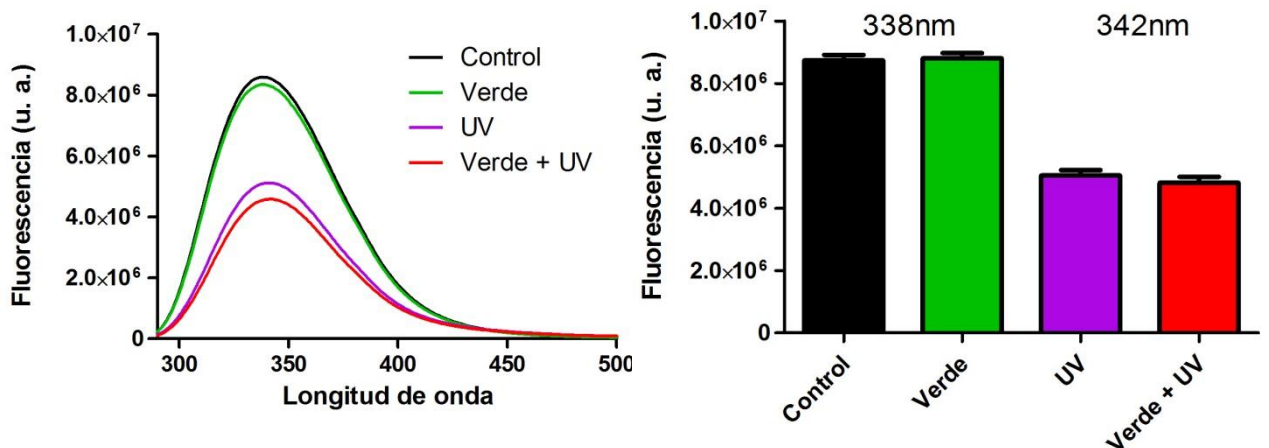


Figura 16. Fluorescencia de ovalbúmina. En la figura del lado izquierdo se muestra un registro típico correspondiente a la medición de la fluorescencia de ovalbúmina con 68% (1 mg/mL) de pureza de sus diferentes tratamientos. En el lado derecho podemos observar las medias \pm error estándar para cada grupo experimental, n=5.

Cinética enzimática

Finalmente los resultados de los experimentos de cinética enzimática se ilustran en la figura 17. Del lado izquierdo podemos observar un registro típico de la formación de p-Nitroanilide, producto de la acción de tripsina sobre BAPNA. Podemos observar que conforme avanza el tiempo de la reacción, aumenta la concentración del producto. Las muestras tratadas con UV lo realizan más lentamente debido al daño que sufre la enzima al exponerse a esa longitud de onda. Del lado derecho se muestran las medias \pm error estándar de las pendientes de cada curva. Podemos notar que el tratamiento con luz verde no provocó cambios significativos.

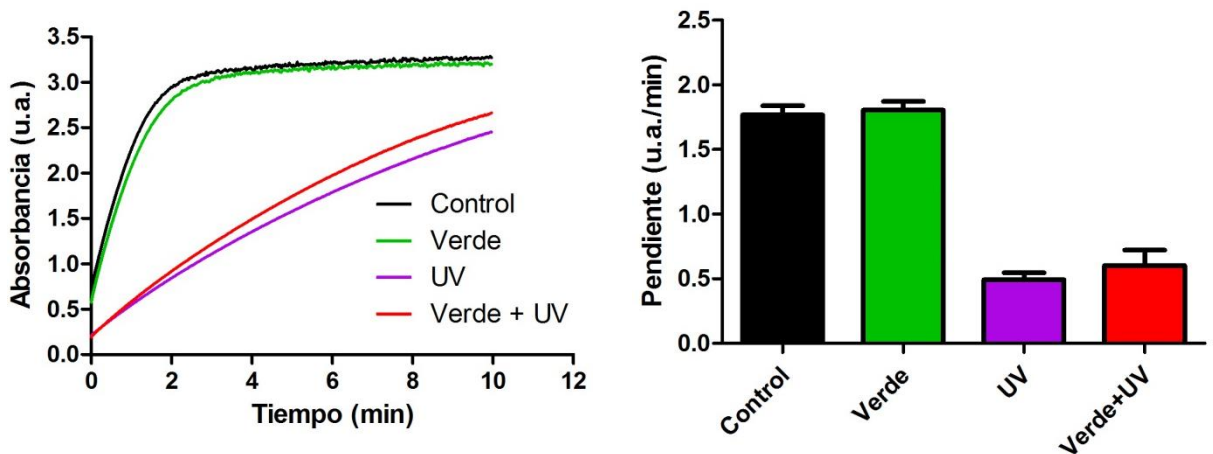


Figura 17. Cinética enzimática de tripsina. En la figura del lado izquierdo se muestra un registro típico de una cinética enzimática de tripsina (0.25 mg/mL) con sus diferentes tratamientos usando BPANA a 4 mM como sustrato para la reacción. En el lado derecho podemos observar las medias \pm error estándar para cada grupo experimental, n=5.

Discusión de resultados

Este trabajo tuvo como eje central entender con mayor detalle los efectos de la luz verde sobre proteínas globulares. Para ello era indispensable reproducir los resultados presentados en los antecedentes (Comorosan, y otros, 2014; Espinoza, & Mercado-Urbe, 2015; Espinoza & Mercado-Urbe, 2017) o al menos encontrar algún tratamiento que provocara efectos similares o congruentes a los reportados. Sin embargo, como se puede notar en los resultados, todas las pruebas dieron negativo. Dado todo lo anterior podemos discrepar con los resultados de los antecedentes y plantear que los tratamientos con luz verde no conducen a cambios en las proteínas en estado nativo y por lo anterior consideramos que no hay evidencia que sugiera cambios en las proteínas desplegadas, ya que la hipótesis de estos cambios surge de los efectos reportados en los antecedentes.

Las causas de la disparidad entre los resultados de este trabajo y los observados en los antecedentes podrían ser de diferente índole. Consideramos que un factor determinante es la medición de evaporación de la muestra que se genera durante el proceso de irradiación, pues de no tener en cuenta este aspecto se pueden obtener falsos positivos, ya que los métodos utilizados en los antecedentes y para este estudio son sensibles a los cambios de concentración. Las muestras irradiadas con luz verde son expuestas a una cantidad mayor de calor proveniente de la fuente de luz, por ello, si no se toman las medidas adecuadas, la muestra irradiada se concentrará perdiendo mayor cantidad de agua que el grupo control y con ello aumentará también la respuesta en las diferentes técnicas.

Conclusiones

- La luz verde no produce cambios en el plegamiento y no neutraliza los efectos de la UV-C en tripsina y ovalbúmina.
- La luz verde no produce cambios en la actividad enzimática de tripsina.

Perspectivas

- Realizar experimentos con la técnica de calorimetría para corroborar las conclusiones antes enlistadas.
- Evaluar el efecto de la irradiación con otras longitudes de onda del espectro visible en estas proteínas.
- Realizar experimentos con la proteína beta cristalina para comprobar si se repiten los resultados aquí presentados.

Bibliografía

- Academy, K. (15 de 22 de 2017). *Khan Academy*. Obtenido de <https://es.khanacademy.org/science/physics/light-waves/introduction-to-light-waves/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>
- Anfisen, C. B. (1973). Studies on the principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 223-240.
- Asimov, I. (1993). *La relatividad del error*. RBA Coleccionables.
- Augenstine, L. G., Chiron, C. A., Grist, K. L., & Mason, R. (1962). The inactivation of trypsin by ultraviolet light, II. The involvement of intramolecular hydrogen bond disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1733-1741.
- Beiser, A. (1990). *Conceptos de física moderna*. Ciudad de México: McGRAW-HILL.
- Björn, L. O. (2015). *Photobiology, The Science of Light and Life*. New York: Springer.
- Bruce Alberts, A. J. (2015). *Molecular Biology of THE CELL*. Garland Science.
- Choi, J. Y., Kim, T. H., Choi, Y. J., Kim, N. N., & Oh, S.-Y. (2016). Effects of various LED light spectra on antioxidant and immune response in juvenile rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed to bisphenol A. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 140-149.
- Comorosan, S., Polosan, S., Apostol, M., Popescu, I., Farcasanu, I., Paslaru, L., y otros. (2014). Effects Induced in complex biological systems by high density green photons. *Springer International Publishings Switzerland*.
- Comorosan, S., Popescu, I., Polosan, S., Pirvu, C., Ionescu, E., Paslaru, L., y otros. (2015). Conformational changes and metastable states induced in proteins by green light. *The European Physical Journal B*, 1-9.
- David L. Nelson, M. M. (2013). *Lehninger, Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and company.
- Donovan, John W. (1969). Changes in Ultraviolet Absorption Produced by Alteration of Protein Conformation. *Journals of Biological Chemistry*, 1961-1967.
- Edsall, R. M. (1967). Interference by near ultraviolet and green light with growth of animal and plant cell. *Photochemistry and Photobiology*, 841-850.
- Espinoza, J. H., & Mercado-Urbe, H. (2017). Visible light neutralizes the effect produced by ultraviolet radiation in proteins. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 15-119.
- Espinoza, J. H., Reynaga-Hernández, E., Ruiz-García, J., Montero-Morán, G., Sanchez, M., & Mercado-Urbe, H. (2015). Effects of green and red light in β L-crystallin and ovalbumin. *Scientific Reports*.
- Folta, K. M., & Maruhnich, S. A. (2007). Green light: a signal to slow down or stop. *Journal of Experimental Botany*, 3099-3111.
- Ganim, Z., & Rief, M. (2017). Mechanically switching single-molecule fluorescence of GFP by unfolding and refolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11052-11056.
- H. Durchschlag, C. F. (1999). Radiation effects on eye components. *Radiation Physics and Chemistry*, 691-697.

- Hans Frauenfelder, S. S. (2010). *The Physics of Proteins, An Introduction to Biological Physics*. New York: Springer.
- Hoefnagels, M. (2018). *Biology. Concepts and Investigations*. McGrawHill.
- Igor N. Berezovsky, E. G. (2016). Basic units of protein structure, folding, and function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1-15.
- Ishimaru, T., Ito, K., Tanaka, M., & Matsudomi, N. (2017). Participation of cysteine 30 residue in the folding process of ovalbumin evaluated in a refolding experiment using cysteine mutants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1-6.
- James N. Spencer, G. M. (2000). *QUÍMICA, Estructura y dinámica*. México: CECSA.
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. McGrawHill.
- Khan Academy. (2018). *Khan Academy*. Recuperado el 01 de 07 de 2018, de <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-rna-and-protein-synthesis/v/rna-transcription-and-translation>
- Klein, A. (1966). *Masers y lasers*. Barcelona: Labor.
- L.G., A., & Ghiron, C. A. (1961). The inactivation of trypsin by ultraviolet light, I. The correlation of inactivation with the disruption of constituent cystine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1530-1547.
- Lars Redecke, S. B. (2009). UV-light-induced conversion and aggregation of prion proteins. *Free Radical Biology & Medicine*, 1353-1361.
- Mathews, C. K., & Holde, K. E. (2001). *Bioquímica*. Madrid: McGraw-Hill.
- McLean, D., & Giese, A. C. (1950). Absorption spectra of proteins and amino acids after ultraviolet irradiation. *Journal of Biological Chemistry*, 537-542.
- Md Abu Bakar Siddique, P. M. (2017). Influence of pulsed light treatment on the aggregation of whey protein. *Food Research International*, 419-425.
- Nasser Brumano, M. H., Rogana, E., & Swaisgood, H. E. (2000). Thermodynamics of Unfolding of β -Trypsin at pH 2.8. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 57-62.
- Onder Idil, C. D. (2013). The effect of UV-A and various visible light wavelengths radiations on expression level of escherichia coli oxidative enzymes in seawater. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 226-232.
- RCSB Protein Data Bank. (2017). *RCSB PDB*. Recuperado el 15 de 11 de 2017, de <http://www.pdbusa.org>
- Run-Chao, L., Jin-Xin, X., Ao-Neng, C., Lu-Hua, L., Bu-Yao, Z., & Guo-Xi, Z. (2005). Surfactant-induced refolding of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 271-281.
- Santos, J. (2009). *PROTEÍNAS, Estructuras fascinantes*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina: Ministerio de Educación.
- Sommer, A. P., & Ralf-Peter, F. (2006). Plants grow better if seeds see green. *Short Communication*, 334-337.
- Stein, P. E., Leslie, A. G., & Finch, J. T. (1991). Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 941-959.

- Volodina, K. V., Avnir, D., & Vinogradov, V. V. (2017). Alumina nanoparticles-assisted enzyme refolding: A versatile methodology for proteins renaturation. *Scientific Reports*, 1-7.
- Yoshiki Kuse, K. O. (2014). Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Scientific reports*, 1-12.