



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Efecto de iones metálicos y radiación ultravioleta en el
desplegamiento y agregación de gamma cristalinas humanas.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MsC. Arline Fernández Silva.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Carlos Daniel Amero Tello

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Efecto de iones metálicos y radiación UV en el desplegamiento y
agregación de gamma cristalinas humanas.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MsC. Arline Fernández Silva.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Carlos Daniel Amero Tello

Resumen.

Las cataratas constituyen la primera causa de ceguera en el mundo. Esta patología se caracteriza por la opacidad parcial o total del lente ocular o cristalino. El cristalino es una estructura compuesta en su inmensa mayoría por proteínas. El 90% de estas proteínas son las cristalinas, que a su vez se dividen en dos familias las α -cristalinas que tienen función chaperona y las $\beta\gamma$ -cristalinas que tienen función estructural. Las gamma S y D cristalinas se encuentran en elevadas concentraciones en el lente ocular y se han visto relacionadas con el desarrollo de las cataratas. Entre los factores de riesgo externos asociados a la aparición de cataratas, están la radiación UV y los iones metálicos. En este sentido existen informes en la literatura que muestran que el Cu(II) y el Zn(II) inducen la agregación de ambas proteínas y que este efecto es dependiente de la concentración del metal. De igual manera, otros trabajos han demostrado que la radiación UV favorece la agregación de la HyD cristalina. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento se emplean elevadas concentraciones de iones metálicos así como largos tiempos de exposición a la radiación. Tomando en consideración que la formación de las cataratas es un proceso lento, cinético, en el cual los daños que sufren las proteínas se van acumulando poco a poco, en este trabajo estudiamos el efecto de bajas concentraciones de Cu(II) y Zn(II) en el desplegamiento y agregación de ambas gamma cristalinas humanas. Además, en este trabajo estudiamos el efecto de la exposición a radiación UV por periodos cortos de tiempo sobre el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina. En ambos casos, los experimentos se siguieron durante 12 horas y con el empleo de diferentes técnicas espectroscópicas, como la absorción de luz en la región visible y fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran que si bien ambos metales inducen la agregación de ambas proteínas, los mecanismos de agregación muestran algunas diferencias. Por otro lado, encontramos que tiempos cortos de exposición a radiación UV inducen agregación de la HyS cristalina. Con la información proporcionada por las técnicas empleadas en este trabajo proponemos modelos de agregación para ambos factores estudiados.

Abstract

Cataracts are the leading cause of blindness in the world. This disease produces partial or total opacity of the ocular lens due to proteins aggregation. The lens is composed mainly of proteins; and crystallins constitute more than 90% of the lens proteins. These are grouped in two families, the α -crystallins, with a chaperone function and the $\beta\gamma$ -crystallines with structural function. The gamma S and D crystallins are the most abundant in the cortex and nucleus of the lens and have been related to the development of cataracts. Within the risk factors associated with developing cataracts, there are external factors such as UV radiation and metal ions. In this sense, it has been reported that Cu(II) and Zn(II) induce the aggregation of both proteins and this effect is dependent on the concentration of the metal. Similarly, other papers indicated that UV radiation favors the aggregation of H γ D crystallin. However, in most of the works published so far, high concentrations of metal ions are used, as well as long time exposure to radiation. Taking account that cataracts formations is a slow, kinetic process, in which the damages suffered by proteins accumulate little by little, in this work we study the effect of low concentrations of Cu(II) and Zn(II) on unfolding and aggregation of both human gamma crystallin proteins. Furthermore, we study the effect of short UV radiation times on the unfolding and aggregation of human gamma S crystallins. In both cases, the experiments were followed for 12 hours and using different spectroscopic techniques such as visible light absorption and fluorescence. The results obtained show that although both metals induce the aggregation of both proteins, the pathways show differences. We find that short UV radiation exposure times induce H γ S aggregation. With the information provided by the techniques used in this work, we propose aggregation models for both factors studied.

Dedicatoria

***A mi papá, donde quiera que estés, tu micy se hizo doctora.
A mi mamá, mi guerrera y mi ejemplo por siempre.
A mi esposo, por su incondicionalidad y su amor.***

Listado de figuras.

Figura 1: Esquema de los tipos de cataratas.

Figura 2: Esquema del ojo humano.

Figura 3: Esquema del plegamiento tipo llave griega presente en las cristalinas de la familia $\beta\gamma$.

Figura 4: Estructura de las HyD y HyS cristalinas.

Figura 5: Algunas modificaciones postraduccionales encontradas en A) HyD (PDB: 1HK0) y B) HyS (PDB: 2M3T) cristalinas aisladas de cataratas. En rojo se muestran las cadenas laterales de las cisteínas que se han encontrado formando puentes disulfuro, en azul se muestran las cadenas laterales de glutaminas y asparaginas que sufren desamidaciones y en cian se muestran las cisteínas metiladas.

Figura 6: Paisaje energético del plegamiento y la agregación de las proteínas.

Figura 7: Esquema de una sigmoide.

Figura 8: Curvas de correlación. A: Aspectos importantes de una curva de correlación, B: Curva de correlación de una muestra monodispersa, C: curva de correlación de la muestra polidispersa.

Figura 9: Relación entre el máximo de emisión de fluorescencia y el plegamiento de las gamma cristalinas. A: máximo de emisión en 325 corresponde a la proteína plegada, B: máximo de emisión en 350 nm corresponde con la proteína desplegada, C: máximo de emisión en un valor intermedio entre 325 y 350 nm se corresponde con la proteína parcialmente desplegada

Figura 10: Cromatografía de exclusión molecular en matriz Sephadex 200.

Figura 11: Electroforesis SDS-PAGE al 14% correspondiente a la expresión en *E. coli* cepa (BI21 RIL) de la HyS cristalina.

Figura 12: Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos en columna HisTrap™ Sepharose.

Figura 13: Electroforesis SDS-PAGE al 14% correspondiente al corte con la proteasa SUMO

Figura 14: Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos en matriz de agarosa.

Figura 15: Cromatografía de intercambio aniónico en matriz Q-Sepharose.

Figura 16: Desplegamiento térmico de gamma cristalinas humanas.

Figura 17: Desplegamiento térmico de gamma cristalinas en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II).

Figura 18: Espectros de fluorescencia gammas cristalinas posterior al despliegamiento térmico.

Figura 19: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HyD cristalina en ausencia y presencia de 1.5eq de Cu(II) y Zn(II).

Figura 20: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HyS cristalina en ausencia y presencia de 1.5eq de Cu(II).

Figura 21: Curvas de correlación del punto inicial y final de la cinética de HyD cristalina en ausencia de metales.

Figura 22: Cinética de agregación de HyD cristalina en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II) por DLS.

Figura 23: Curva de correlación correspondiente a la medición puntual de la HyS cristalina.

Figura 24: Curva de correlación de HyS en ausencia de metal en el punto inicial y final de la cinética por DLS

Figura 25: Curva de correlación de HyS cristalina en ausencia y presencia de Cu(II) en el punto inicial y final de la cinética por DLS .

Figura 26: Curva de correlación de HyS cristalina en ausencia presencia de Zn(II) en el punto inicial y final de la

cinética por DLS.

Figura 27: Relación de la intensidad de fluorescencia (350/325) nm con respecto al tiempo de HyD cristalina en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II).

Figura 28: Espectros de fluorescencia de HyS cristalina a 37°C en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II) a diferentes tiempos de la cinética.

Figura 29: Relación de la intensidad de fluorescencia IF(350/325) nm con respecto al tiempo de HyS cristalina en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II).

Figura 30: Modelos de agregación de la HyD cristalina inducidos por Cu(II) y Zn(II).

Figura 31: Modelo de agregación de la HyS cristalina inducido por Zn(II).

Figura 32: Modelo de agregación de la HyS cristalina inducido por Zn(II).

Figura 33: Mapeo en la estructura tridimensional de: A) HyD (PDB: 1HKO) y B) HyS (PDB: 2M3T) de los residuos de Cys (rojo), His (Azul) y Met (verde) expuestos al solvente según su valores de ASA obtenidos en la tabla 8.

Figura 34: Desplegamiento térmico de HyS cristalina irradiada con luz UVB.

Figura 35: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HyS cristalina sin irradiar e irradiada por 2h con UVB.

Figura 36: Cinética de agregación de HyS cristalina irradiada con luz UVB seguida por DLS.

Figura 37: Relación de la intensidad de fluorescencia IF(350/325) con respecto al tiempo de HyS cristalina no irradiada e irradiada por 2h .

Figura 38: Modelo de mecanismo de agregación de la HyS cristalina inducido por radiación UV.

Anexo 1: Efecto de 15eq de Cu(II) yZn(II) en el despliegamiento y agregación de la HyS cristalina.

Figura 1: Desplegamiento térmico HyS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Cu(II) y Zn(II).

Figura 2: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HyS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Cu(II).

Figura 3: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HyS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Zn(II).

Figura 4: Curva de correlación de HyS cristalina en ausencia y presencia de 15eq Cu(II) en el punto inicial y final de la cinética por dispersión dinámica de luz.

Figura 5: Curva de correlación de HyS cristalina en ausencia y presencia de Zn(II) en el punto inicial y final de la cinética por dispersión dinámica de luz.

Figura 6: Relación de la intensidad de fluorescencia IF(350/325) nm con respecto al tiempo de HyS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Cu(II).

Figura 7: Relación de la intensidad de fluorescencia IF(350/325) nm con respecto al tiempo de HyS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Zn(II).

Anexo 2: Búsqueda de inhibidores de la agregación de la HyS cristalina.

Figura 1: Turbidez a 405 nm de la proteína HyS cristalina irradiada en ausencia y presencia de los posibles moléculas inhibidores de la agregación.

Figura 2: Curvas de correlación de la HyS cristalina irradiada con UVB por 2h e incubada 37°C por 12h.

Listado de tablas

Tabla 1: Algunos factores de riesgo asociados con el desarrollo de cataratas.

Tabla 2: Tabla resumen de algunas características de las diferentes cristalinas.

Tabla 3: Diferentes modificaciones postraduccionales encontradas en γ -cristalinas aisladas de lentes con cataratas.

Tabla 4: Valores de T_m obtenidos para gamma cristalinas humanas en ausencia y presencia de iones metálicos.

Tabla 5: Radio hidrodinámico de la HyS cristalina en el punto inicial y final de la cinética en ausencia de metales.

Tabla 6: Radio hidrodinámico de la HyS cristalina en el punto inicial y final de la cinética con 1.5eq Cu(II).

Tabla 7: Radio hidrodinámico de la HyS cristalina en el punto inicial y final de la cinética en presencia de 1.5eq Zn(II)

Tabla 8: Área accesible al solvente (ASA) de los principales residuos capaces de interaccionar con iones metálicos en ambas gamma cristalinas humanas.

Anexo 1: Efecto de 15eq de Cu(II) yZn(II) en el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina.

Tabla 1: Valores de T_m de la HyS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Cu(II) y Zn(II).

Tabla 2: Radio hidrodinámico de HyS cristalina en la medición inicial y final de la cinética con 15eq Cu(II).

Tabla 3: Radio hidrodinámico de HyS cristalina en la medición inicial y final de la cinética con 15eq Zn(II).

Listado de abreviaturas y acrónimos.

HyD: gamma D cristalina humana.

HyS: gamma S cristalina humana.

HSP: Heat shock proteins.

UV: Ultravioleta.

DLS: Dispersión dinámica de luz.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

OMS: Organización mundial de la salud.

OPS: Organización panamericana de la salud.

HSQC: Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy

Índice General

Prólogo.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Cataratas.....	2
1.2 Epidemiología de las cataratas.....	4
1.3 Factores de riesgo.....	5
2.1 Cristalinas.....	6
2.2. Gamma D y gamma S cristalinas humanas.....	8
2.3 Mal plegamiento y agregación de proteínas.....	11
2.4 Plegamiento y agregación de gamma cristalinas.....	13
3.1 Metales y cataratas.....	16
3.2 Radiación UV y cataratas.....	17
3. Justificación.....	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivo General.....	22
6. Metodología.....	23
6.1. Expresión y Purificación de HyD en E.coli.....	23
6.2. Expresión y Purificación de HyS en E.coli.....	23
6.2.1. Purificación de HyS cristalina.....	23
6.2.1.1. Cromatografía de Afinidad 1.....	24
6.2.1.2. Corte con proteasa SUMO.....	24
6.2.1.3. Cromatografía de Afinidad 2.....	24
6.2.1.4. Cromatografía de intercambio aniónico.....	25
6.3. Electroforesis SDS-PAGE.....	25
6.4. Determinación de la concentración de proteínas.....	25
6.5. Desplegamiento térmico de HyS y HyD por espectroscopía de fluorescencia.....	26
6.6. Cinética de agregación de HyS por turbidez.....	26
6.7. Cinética de agregación de HyD y HyS por dispersión dinámica de luz.....	27
6.8. Estudio de cambios conformacionales por espectroscopía de fluorescencia.....	29
6.9. Ensayos de radiación UV de la HyS cristalina.....	29
7. Resultados.....	31
7.1. Expresión y purificación de proteínas.....	31
7.1.1. Purificación de la HyD cristalina humana.....	31
7.1.2. Expresión de HyS cristalina en E.coli.....	32
7.1.3. Purificación de la HyS cristalina.....	32
7.1.3.1. Cromatografía de afinidad 1.....	33
7.1.3.2. Cromatografía de afinidad 2.....	34
7.1.3.3. Cromatografía de intercambio aniónico.....	35
7.2. Desplegamiento térmico de la HyS y HyD cristalinas humanas.....	36
7.3. Desplegamiento térmico de HyD y HyS cristalinas en presencia de Cu(II) y Zn(II).....	37
7.4. Efecto de iones metálicos Cu(II) y Zn(II) en el despliegamiento y agregación de gammas cristalinas humanas.....	40
7.4.1. Cinética de agregación de HyD cristalina por turbidimetría.....	40
7.4.2. Cinética de agregación de HyS cristalina por turbidimetría.....	41
7.4.3. Cinética de agregación de HyD cristalina por dispersión dinámica de luz.....	43
7.4.4. Cinética de agregación de HyS cristalina por dispersión dinámica de luz.....	47
7.4.5. Cambios conformacionales en la HyD inducidos por Cu(II) y Zn(II).....	51

7.4.6. Cambios conformacionales en la HyS cristalina inducidos por iones metálicos.....	52
8. Discusión de resultados del efecto de iones metálicos en el desplegamiento y agregación de gamma cristalininas humanas.....	56
9. Efecto de la radiación UV en la agregación de la HyS cristalina.....	68
9.1. Desplegamiento térmico de la HyS cristalina irradiada.....	68
9.2. Cinética de agregación de HyS cristalina irradiada con luz UV seguida por turbidez....	69
9.3. Cinética de agregación de HyS cristalina irradiada por dispersión dinámica de luz.....	70
9.4. Estudio de cambios conformacionales en la HyS cristalina por espectroscopía de fluorescencia.	71
10. Discusión de resultados del efecto de la radiación en el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina.....	73
11. Conclusiones.....	77
12. Recomendaciones.....	79
13. Referencias bibliográficas.....	80
Anexo 1: Efecto de 15eq de Cu(II) yZn(II) en el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina.....	95
Anexo 2: Búsqueda de inhibidores de la agregación de la HyS cristalina.....	102

Prólogo.

Durante el periodo correspondiente a mi doctorado he tenido la oportunidad de trabajar en diferentes proyectos de investigación, algunos constituyen proyectos del laboratorio en el que he estado vinculada y otros han sido proyectos en colaboración con otros investigadores. En esta tesis se resumen los resultados obtenidos en dos vertientes de un gran proyecto denominado: Caracterización del efecto de iones metálicos y radiación UV en el desplegamiento y agregación de gamma cristalinas humanas. Búsqueda de inhibidores.

Además de este proyecto, he trabajado en otros que se listan a continuación.

1. Caracterización de una nueva lipasa sensible a hormona (BaEstB) aislada del hongo *Bjerkandera adusta*. Este proyecto se realizó en colaboración con la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente. Dr. Jorge Luis Folch Mallol del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB).
2. Sitio de unión específico en profilinas de plantas y su papel en la comunicación alostérica entre los sitios de unión a actina y PLP. Proyecto en colaboración con la Dra. Nina Pastor del CIDC y la Dra. Claudia Díaz Camino del Instituto de Biotecnología de la UNAM.
3. Caracterización del estado oligomérico de la chaperona PvNod22 aislada de frijol. En colaboración con la Dra. Claudia Díaz Camino del Instituto de Biotecnología de la UNAM.
4. Caracterización de la estabilidad de la proteína formadora de *virus like particles*, CCMV y algunas mutantes. Proyecto en colaboración con el Dr. Mauricio Carrillo Tripp del CINVESTAV-Unidad Monterrey.
5. Caracterización del efecto de iones metálicos y radiación UV en el desplegamiento y agregación de beta cristalinas humanas. Proyecto del Dr. Carlos Amero Tello, Participantes: Vanesa Margarita Ramírez Bello.
6. Diferentes rutas de desplegamiento de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G, asociadas con la amiloidosis de cadena ligera. Proyecto del Dr Carlos Amero Tello, Participantes: Roberto Carlos Maya Martínez, Leidys French Pacheco y Joselin González Onofre.

1. Introducción.

1.1 Cataratas

Las cataratas se definen como la opacidad parcial o total del lente ocular que provoca el deterioro de la visión. Esta patología constituye una de las primeras causas de ceguera en el mundo, fundamentalmente en países en vías de desarrollo (Pascolini y Mariotti 2012; Song *et al.* 2014; Bourne *et al.* 2017; Liu *et al.* 2017a). Las cataratas se pueden clasificar según la causa que las originan como cataratas asociadas al envejecimiento, cataratas pediátricas y cataratas secundarias a otros padecimientos. Las cataratas asociadas al envejecimiento son las más comunes y aparecen mayormente en adultos entre los 45 y 50 años de edad. Todas las cataratas pueden clasificarse a su vez en cataratas nucleares, corticales y subcapsulares de acuerdo a la zona del lente que presenta opacidad (Lam y Rao 2017). Las cataratas nucleares son aquellas donde la opacidad se ubica justo en la zona central del cristalino, mientras que en las cataratas corticales la opacidad comienza en la corteza y posteriormente se extiende hacia el centro del lente con forma de rebanada. En el caso de las subcapsulares la opacidad tiene forma de placa y se desarrolla en la capa axial posterior. En la mayoría de los pacientes se puede encontrar más de un tipo (Liu *et al.* 2017a). La formación de cataratas es un proceso cinético lento, donde los daños se acumulan poco a poco hasta que luego de 5 o 6 décadas aparece la enfermedad.

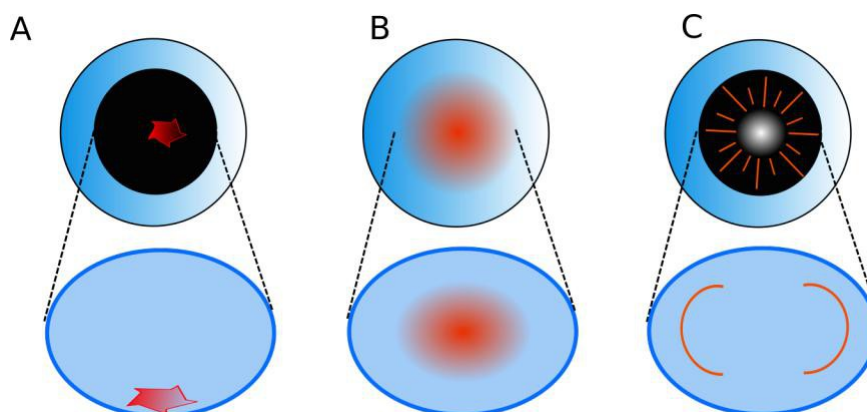


Figura 1: Esquema de los tipos de cataratas. A: Catarata cortical, B: Catarata nuclear, C: Catarata subcapsular. Modificado de Lam *et al.*, 2015.

El lente ocular es el responsable del enfoque de la luz en la retina. Para cumplir esta función esta estructura necesita ser transparente, garantizando de esta manera la agudeza visual. El desarrollo del lente ocurre durante las primeras etapas del desarrollo del embrión (Grainger 1992) y está compuesto por dos tipos celulares: las células epiteliales y las fibrilares (Andley 2007; Moreau y King 2012). Las células epiteliales durante su proceso de diferenciación se alargan dando lugar a las células fibrilares (Bron y Vrensen 2000). Diferentes clases de proteínas cristalinas se expresan durante la diferenciación de las células fibrilares. La expresión de estos genes se ha regulado evolutivamente, de esta forma algunas cristalinas se expresan principalmente durante el desarrollo del cristalino fetal y otras sólo más tarde. Por lo tanto, las cristalinas que se sintetizaron durante el desarrollo temprano se ubicarán en el núcleo del cristalino maduro, mientras que las cristalinas expresadas durante el desarrollo posterior abundarán en la corteza (Horwitz 2003; Sharma y Santhoshkumar 2009; Moreau y King 2012)

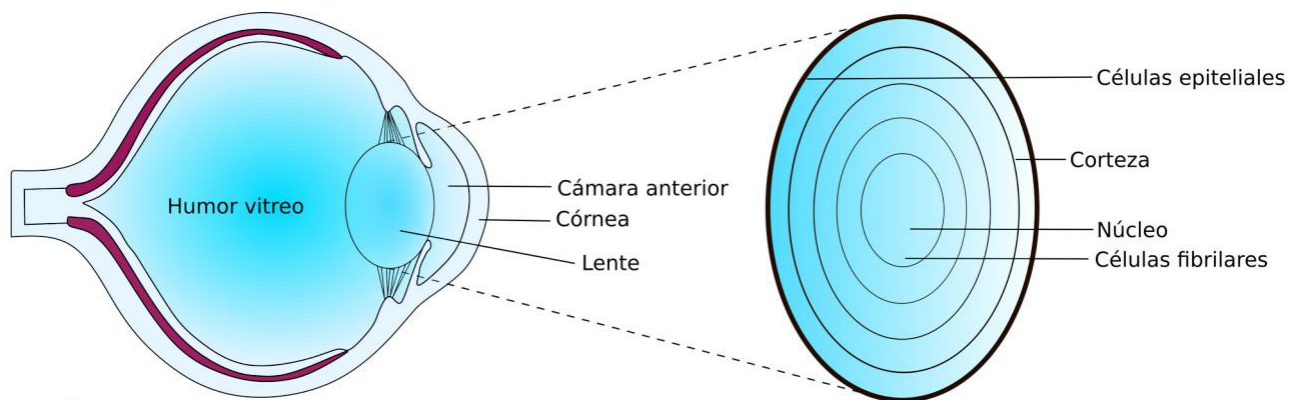


Figura 2: Esquema del ojo humano. Diferentes partes del lente y donde se localizan los dos tipos celulares en el lente ocular. Modificado de Lam *et al.* 2015.

El último paso en la diferenciación de las células de fibra es la degradación coordinada de sus organelos (núcleos, mitocondrias y ribosomas). Este proceso es necesario para la transparencia, pero tiene como consecuencia que las células fibrilares una vez diferenciadas, carecen de la maquinaria necesaria para la síntesis de nuevas proteínas, así como para su degradación (Bassnett 2002; Rivillas-Acevedo *et al.* 2015). Esto determina que las proteínas que se encuentran en el centro del lente y se sintetizan durante el desarrollo fetal, no se pueden reemplazar y deben durar toda la vida del organismo (Bloemendal *et al.* 2004). Por otro lado el lente ocular es una estructura que carece también de irrigación sanguínea, de esta manera el cristalino es una estructura formada principalmente por proteínas. El 90% de las proteínas presentes en el lente son las cristalinas. El otro 10% está compuesto

por canales iónicos, proteínas asociadas al metabolismo y proteínas del citoesqueleto que contribuyen a mantener la forma del lente (Nartey 2017).

1.2 Epidemiología de las cataratas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 95 millones de personas padecieron discapacidad visual por cataratas en el año 2014 (Liu *et al.* 2017a). Estudios poblacionales han demostrado que la prevalencia de esta enfermedad aumenta con la edad, de 3.9% a los 55-64 años a 92.6% a los 80 años (Mitchell *et al.* 1997). El padecimiento de cataratas también se ha asociado con el aumento de la mortalidad; esto se debe al vínculo entre las cataratas y otros padecimientos como la diabetes mellitus y el hábito de fumar (Nartey 2017). Hasta el momento, el único tratamiento que existe para esta enfermedad es la intervención quirúrgica donde reemplazan el lente dañado por una prótesis de lente intraocular.

En los últimos años la prevalencia de cataratas ha disminuido debido al aumento del número de cirugías (Brown *et al.* 2019). Sin embargo, en los países en vías de desarrollo las cataratas continúan figurando entre las primeras causas de ceguera. Según las estadísticas de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el 60% de los casos de ceguera en América Latina y el Caribe se deben a cataratas (https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13691:prevention-blindness-eye-care-cataracts&Itemid=39604&lang=es). Por otro lado, el efecto socio-económico de la cirugía de cataratas es sustancial, permitiendo a los pacientes mejorar su estilo de vida, así como su productividad durante el primer año posterior a la cirugía. Sin embargo, los costos de esta operación siguen siendo elevados para un porcentaje importante de la población en países en vías de desarrollo. Además, a pesar de ser poco comunes, existen complicaciones producto de la cirugía, como es el caso del aumento de la presión intraocular, así como la dislocación del lente intraocular, entre otros (Liu *et al.* 2017b). Tomando en consideración las estadísticas anteriormente mencionadas es necesario el trabajo mancomunado de la comunidad científica en la búsqueda de posibles moléculas que puedan servir como inhibidores de la agregación de las proteínas del lente. Estas moléculas pudieran ser el punto de partida para un futuro desarrollo de algún tratamiento preventivo o paliativo para esta enfermedad.

1.3 Factores de riesgo.

Existen múltiples factores que se han asociado al padecimiento de cataratas. Entre ellos pueden mencionarse factores individuales o personales, factores genéticos, o factores externos como la radiación UV y los iones metálicos. También, existen enfermedades crónicas en las cuales las cataratas son complicaciones secundarias o desórdenes oculares que aumentan la propensión a padecer cataratas (Tabla 1) (Rivillas-Acevedo *et al.* 2015).

Tabla 1: Algunos factores de riesgo asociados con el desarrollo de cataratas. Modificado de Liu *et al.* 2017.

Factores de riesgo.		
Individuales	Edad	(Bourne <i>et al.</i> 2017)
	Estatus socioeconómico	(Klein <i>et al.</i> 2003)
	Sexo.	(Sperduto <i>et al.</i> 2001)
	Etnia o raza.	(Lam <i>et al.</i> 2015)
Genéticos	Mutaciones	(Rivillas-Acevedo <i>et al.</i> 2015)
Externos	Radiación UV	(Andley 2007)
	Iones metálicos.	(Löfgren 2017)
	Hábito de fumar	(Srivastava <i>et al.</i> 1992)
Enfermedades crónicas	Diabetes Mellitus.	(Langford-Smith <i>et al.</i> 2016)
	Síndrome metabólico.	(Pollreisz 2010).
		(Glynn <i>et al.</i> 2009)

En el caso de los factores genéticos, para todas las cristalinas se han descrito diferentes mutaciones encontradas en pacientes con cataratas juveniles (Karri *et al.* 2013; Pande *et al.* 2015; Rivillas-Acevedo *et al.* 2015). En todos los casos estas mutaciones disminuyen la estabilidad de la proteína y favorecen su agregación (Pande *et al.* 2010; Vendra *et al.* 2012).

El efecto de la radiación UV ha sido ampliamente estudiado y se ha observado que existe una relación directa entre la exposición a la radiación UV y la incidencia de cataratas (Delcourt *et al.* 2000; Roberts 2001b; Truscott 2005; Ji *et al.* 2015). Con relación a los iones metálicos existen estudios que muestran como algunos iones metálicos como Cu(II) y Zn(II) favorecen la agregación de diferentes tipos de cristalinas (Singh *et al.* 2009; Quintanar *et al.* 2015). De igual manera, en lentes aislados de cataratas se ha observado un aumento de la concentración de iones metálicos (Dawczynski *et al.* 2002). Por otro

lado, algunos estudios han mostrado como las personas que fuman tienen mayor propensión a desarrollar cataratas en comparación con las personas que no tienen este hábito.

Por último, las cataratas constituyen una complicación asociada a otras enfermedades crónicas como por ejemplo la diabetes mellitus. Varios estudios indican que en los diabéticos aumenta la concentración de sorbitol en el lente ocular por la activación de la aldosa reductasa; esto provoca un desbalance osmótico que favorece la insolubilización de las proteínas y el desarrollo de cataratas (Srivastava *et al.* 2005; Patel *et al.* 2012; Singh Grewal *et al.* 2016).

2.1 Cristalinas.

Las cristalinas son las principales proteínas que conforman el lente ocular y en vertebrados se agrupan en dos familias: α y $\beta\gamma$ cristalinas (Slingsby *et al.* 2013). La familia de las α cristalinas está compuesta por dos proteínas la αA y la αB ; ambas se asocian no covalentemente para formar oligómeros de elevado peso molecular (Graw 2009). Estas proteínas son homólogas y forman parte de la familia de las *heat shock proteins* (HSP) (PDOC00269). Los oligómeros se encuentran en equilibrio constante de asociación y disociación, lo que determina que dichos oligómeros sean asociaciones dinámicas (Goulet *et al.* 2009). La estructura secundaria de estas proteínas está formada mayormente por hojas β y la función más importante que desempeñan las α cristalinas es su función chaperona (Derham y Harding 1999; Horwitz 2003; Sun *et al.* 2005). Estas proteínas son chaperonas independientes de ATP y en el contexto del lente secuestran las proteínas parcialmente desplegadas pero no las repliegan. Además, existen evidencias que las asocian a la protección y remodelaje del citoesqueleto, a la resistencia al estrés y a la inhibición de apoptosis (Goulet *et al.* 2011).

Las β y γ -cristalinas son miembros de la superfamilia de las $\beta\gamma$ -cristalinas. Están conformadas estructuralmente por hojas β que forman dos dominios, cada uno formado a su vez, con dos motivos con plegamiento del tipo llave griega (Figura 3) (Fu y Liang 2001; Bateman *et al.* 2003). Las β -cristalinas se han descrito como proteínas multiméricas mientras que las γ -cristalinas son monoméricas en solución (Dolinska *et al.* 2009). La subfamilia de las β -cristalinas está constituida por siete proteínas, de ellas tres son básicas ($\beta B1$, $\beta B2$, $\beta B3$) y las cuatro restantes son ácidas ($\beta A1$, $\beta A2$, $\beta A3$,

β A4) (Gawad 2015). Las cristalinas β B1, β B3 y β A4 forman homo-oligómeros (Downard *et al.* 2011), mientras que las cristalinas β B2 forman dímeros en solución y hetero-oligómeros con las cristalinas β A1, β A2 y β A3 (Bateman *et al.* 2003). La identidad de secuencia entre las β y γ cristalinas es de alrededor de 30%, sin embargo, al realizar un análisis de estructural podemos observar que el plegamiento tridimensional se mantiene entre ambas familias.

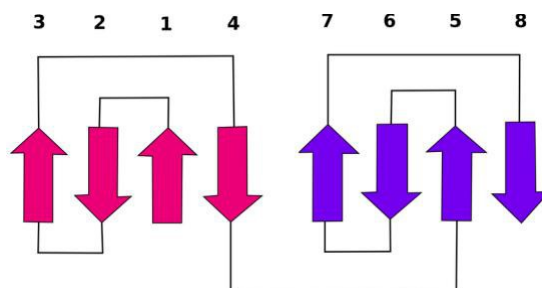


Figura 3: Esquema del plegamiento tipo llave griega presente en las cristalinas de la familia $\beta\gamma$.

Las γ -cristalinas están codificadas en siete genes diferentes γ A, γ B, γ C, γ D, γ E, γ F, y γ S, todos codifican para proteínas de aproximadamente 20 KDa. No obstante, solo las cristalinas γ D, γ C y γ S se expresan en concentraciones apreciables en el lente humano (Tabla 2) (Goulet *et al.* 2009).

Tabla 2: Tabla resumen de algunas características de las diferentes cristalinas. Modificado de Moreau y col., 2012.

Proteína	Peso Molecular (Da)	Residuos	Gen	Referencia
α A	19909	173	CRYAA	Horwitz 2003
α B	20159	175	CRYAB	Horwitz 2003
β A1	23191	198	CRYBA1	Ma <i>et al.</i> 2016
β A2	21964	196	CRYBA2	Lampi <i>et al.</i> 1997
β A3	25150	215	CRYBA1	Dolinska <i>et al.</i> 2009
β A4	22243	195	CRYBA4	Zhou <i>et al.</i> 2010
β B1	27892	251	CRYBB1	Van Montfort <i>et al.</i> 2003
β B2	23249	204	CRYBB2	Xi <i>et al.</i> 2017
β B3	24230	211	CRYBB3	Diemer <i>et al.</i> 2009
γ D	20607	173	CRYGD	Wang <i>et al.</i> 2010
γ S	20875	177	CRYGS	Sun <i>et al.</i> 2005

γ C	20747	173	CRYGC	Wang <i>et al.</i> 2010
------------	-------	-----	-------	-------------------------

En el lente ocular están presentes las tres familias de cristalinas en elevadas concentraciones y organizadas de una forma particular para garantizar la transparencia deseada (Andley 2006; Rivillas-Acevedo *et al.* 2015). Todas estas proteínas con el paso de los años y producto de la incidencia de diferentes factores sufren diversos daños (oxidaciones, desamidaciones, etc) que modifican su estructura nativa (Tabla 3).

Tabla 3: Diferentes modificaciones postraduccionales encontradas en γ -cristalinas aisladas de lentes con cataratas.

Modificaciones	Daños	Referencia
Desamidaciones	Se introduce un anión carboxilato que puede provocar cambios conformacionales en la proteína.	(Hanson <i>et al.</i> 1998b)
Formación de puentes disulfuro	Intracatenarios: Provocan cambios conformacionales en la proteína. Intercatenarios: Provocan la formación de oligómeros.	(Hanson <i>et al.</i> 1998b)
Metilaciones	Evita la formación de puentes disulfuros.	(Lapko <i>et al.</i> 2003)
Oxidaciones	Se generan como respuesta a las variaciones en el estado oxidativo y desestabilizan a las proteínas	(Kantorow <i>et al.</i> 2004)

Estas modificaciones disminuyen su estabilidad y se ha postulado que provocan su desplegamiento parcial (Hanson *et al.* 1998a; Serebryany y King 2014). Mientras las chaperonas funcionan correctamente pueden secuestrar las proteínas β y γ dañadas. Sin embargo llega el momento en que las cristalinas dañadas superan la capacidad de las alfa cristalinas o bien estas últimas también sufren daños, y entonces a partir de este momento se comienzan a acumular las proteínas dañadas provocando en última instancia la aparición de las cataratas (Bloemendal *et al.* 2004).

2.2. Gamma D y gamma S cristalinas humanas.

La gamma-D-cristalina humana (HyD) y la gamma-S-cristalina humana (HyS) son las cristalinas gammas más abundantes del lente ocular (Goulet *et al.*, 2009). La HyD se encuentra mayoritariamente

en el núcleo del lente mientras que la HyS se ubica en la corteza. Ambas proteínas presentan un 50% de identidad de secuencia y conservan el plegamiento característico de la familia. Están compuestas por dos dominios, el N-terminal y el C-terminal, que se conectan por un linker de 10 (HyD) y 6 (HyS) residuos (Figura 4). Sus estructuras tridimensionales han sido resueltas por cristalografía de rayos X y por resonancia magnética nuclear (Basak *et al.* 2003; Kingsley *et al.* 2013). Para estas proteínas se ha planteado que su principal función es contribuir con el mantenimiento de las propiedades ópticas del lente durante la vida de los individuos. En este sentido, ambas proteínas son muy estables con Tm de 83.9°C para la HyD y 79.9°C para la HyS.

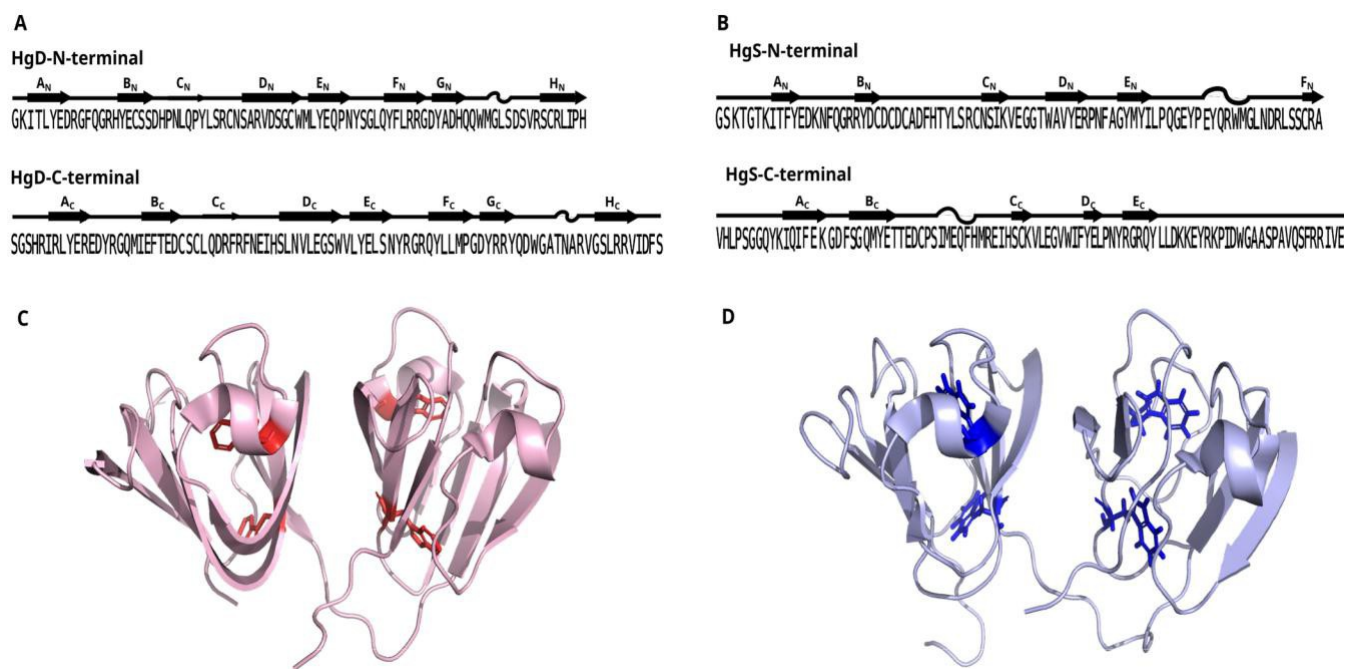


Figura 4: Estructura de las HyD y HyS cristalinas. A) Secuencia de las HyD, B) Secuencia de la HyS, con los elementos de estructura secundaria de cada una, C) Estructura tridimensional de la HyD cristalina (PDB: 1HK0). D) Estructura tridimensional de la HyS cristalina (PDB: 2M3T). Se señalan en rojo y azul las cadenas laterales de los triptofanos.

Entre las características que le confieren estabilidad térmica y termodinámica a ambas proteínas están la presencia de seis pares de residuos aromáticos distribuidos en toda la proteína, se ha planteado que funcionan como sitios de nucleación durante las primeras etapas del plegamiento de estas proteína (Kong y King 2011a). Otro elemento que contribuye a la estabilidad de estas proteínas, es la presencia de un grupo de residuos hidrofóbicos y polares en la interfase entre los dos dominios (Slingsby and

Wistow 2014). Algunos estudios han demostrado que estos aminoácidos de la interfase son importantes para el mantenimiento de la conformación nativa de las proteínas (Flaugh *et al.* 2005). Un aspecto interesante, es el hecho de que, estas proteínas tienen 6 (HyD) y 7 (HyS) cisteínas (más que el resto de las cristalinas de las familias α y β), sin embargo en estado nativo ninguna de las cristalinas forma puentes disulfuro (Basak *et al.* 2003; Kingsley, *et al.* 2013; Xi *et al.* 2017; Domínguez-Calva *et al.* 2018b). En este sentido, se ha planteado que los residuos de cisteínas tienen un papel importante para las propiedades refractivas del lente (Roskamp *et al.* 2019), toda vez que son los aminoácidos con mayor refractividad molar (Zhao *et al.* 2011). Otra característica importante de estas proteínas es que presentan cuatro triptofanos altamente conservados en vertebrados; dos en el dominio N-terminal y dos en el dominio C-terminal (Figura 4) (Bloemendal *et al.* 2004). El estudio de mutantes puntuales de estos triptofanos mostró que existe un efecto de apagamiento de fluorescencia cuando la proteína está plegada mientras que el desplegamiento provoca que este efecto de apagamiento de la fluorescencia se pierda. Esto se debe a que existe un proceso de transferencia de energía entre los triptofanos muy eficiente. Este proceso se ha planteado que constituye un mecanismo para prevenir la degradación fotoquímica (Chen *et al.* 2008, 2009). Por otro lado la presencia de los triptofanos permite el empleo de la espectroscopía de fluorescencia para el estudio de estos sistemas.

A pesar de que estas proteínas son muy estables, como ya se mencionó anteriormente, el paso de los años provoca por un lado que los daños en la proteína se vayan acumulando y por el otro, fallos en los mecanismos de protección, provocando finalmente el aumento de proteínas dañadas en el lente eventualmente su precipitación. Algunas modificaciones postraduccionales descritas para estas proteínas son: para la HyD la desamidación de Q26 y N49 (Searle *et al.* 2005; Lampi *et al.* 2014), la oxidación de Y45 y W156 (MacCoss *et al.* 2002; Searle *et al.* 2005) y la metilación de C110 (Lapko *et al.* 2003). Estas y otras modificaciones pudieran constituir el primer paso para el desarrollo de cataratas (Stacy R.A *et al.* 1998). Por su parte en el caso de la HyS se han descrito como principales modificaciones postraduccionales la desamidación de Q92, Q106 y Q170 así como la oxidación de M73 (Figura 5) (Hanson *et al.* 2000).

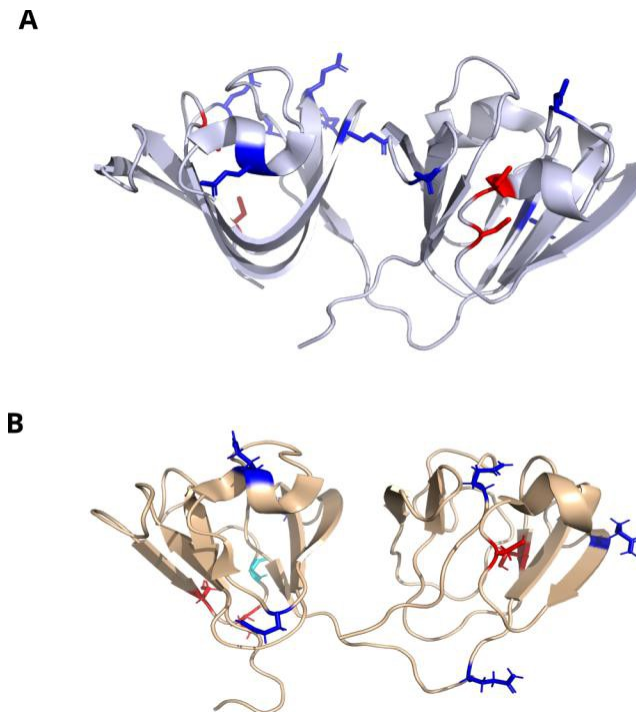


Figura 5: Algunas modificaciones postraduccionales encontradas en A) H γ D (PDB: 1HK0) y B) H γ S (PDB: 2M3T) cristalinas aisladas de cataratas. En rojo se muestran las cadenas laterales de las cisteínas que se han encontrado formando puentes disulfuro, en azul se muestran las cadenas laterales de glutaminas y asparaginas que sufren desamidaciones y en cian se muestran las cisteínas metiladas.

2.3 Mal plegamiento y agregación de proteínas.

Durante el plegamiento de las proteínas se establecen un conjunto de interacciones no covalentes que dirigen a la misma a una conformación energéticamente favorable y estable, llamada conformación nativa. En algunos casos, entre los intermediarios de plegamiento se dan interacciones no nativas que pueden llegar a ser más estables que las primeras, generando así conformaciones no deseadas (Eichner y Radford 2011). En este sentido, se ha descrito un modelo de embudo doble que incluye el embudo de plegamiento y el embudo de agregación. Como se observa en la figura 6, si bien el estado nativo constituye un mínimo energéticamente favorable, existen otros como los correspondientes a agregados amorfos y fibras amiloides que constituyen mínimos de energía aún más estables. En este sentido la célula necesita evitar el paso de las proteínas hasta estos agregados (Agbas 2018). Para esto, la célula cuenta con proteínas chaperonas que pueden secuestrar a las proteínas mal plegadas o replegarlas, entre

otros mecanismos. No obstante, cuando estos mecanismos de defensa fallan o no son suficientes se genera la acumulación de agregados de proteínas que pueden ser dañinos para los organismos vivos. Existen numerosas enfermedades que se caracterizan por la agregación parcial o completa de proteínas. Entre ellas se pueden mencionar la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, amiloidosis de cadena ligera, y las cataratas, entre otras (Martínez *et al.* 2014; Chuang *et al.* 2018). En algunas de estas enfermedades, como es el caso de la amiloidosis de cadena ligera, los agregados de proteínas son fibras amiloides (Maya-Martínez *et al.* 2019). Otras enfermedades como las cataratas, se caracterizan por la formación de agregados no fibrilares (Boatz *et al.* 2017).

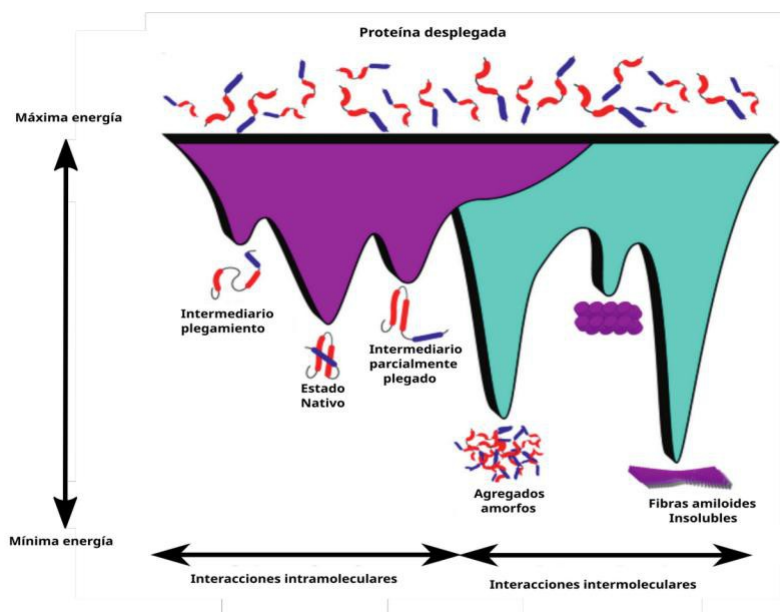


Figura 6: Paisaje energético del plegamiento y la agregación de las proteínas. Modificado de Agbas, 2018

La agregación de proteínas puede darse por asociación física entre moléculas sin que existan cambios en la estructura primaria o por formación de interacciones covalentes. Estas interacciones pueden provocar la agregación directa de las proteínas o pueden modificar la tendencia a agregar del sistema original (Finke *et al.* 2000). En una proteína dada, se pueden dar ambos mecanismos de agregación, dando lugar a la formación de agregados solubles o insolubles en dependencia del sistema en cuestión y del estado del proceso de agregación. Un ejemplo de esto es la insulina, que puede agregarse por asociación física, formando hexámeros solubles o fibras insolubles. Asimismo, puede formar dímeros

solubles o agregados insolubles mediados por interacciones covalentes del tipo de anhídrido cíclico y puentes disulfuro respectivamente (Darrington y Anderson 1995; Toichi *et al.* 2013). En el caso de la agregación por interacciones físicas, muchos estudios soportan la idea de que los intermediarios que se forman durante el desplegamiento o plegamiento de las proteínas son los precursores para la formación de agregados (Fink 1998; Moreau y King 2012; Shamsi *et al.* 2017). En este sentido, se ha planteado que la presencia de zonas hidrofóbicas cercanas en los intermediarios son las responsables del inicio del proceso de agregación (Wang 2005a). Esto ha sido demostrado para varios sistemas, tal es el caso de la versión recombinante de la hormona de crecimiento humana (Bam *et al.* 1996) y la anhidrasa carbónica C (Hammarström *et al.* 1999). La primera etapa en el paso de proteína nativa a agregados se ha denominado como proceso de nucleación y constituye en muchas ocasiones, el paso limitante para la agregación (Wang 2005b; Buell 2017). Este proceso de nucleación se ha sugerido que es el paso inicial en la agregación de varias proteínas como el péptido beta amiloide (Ghosh *et al.* 2016) y una secuencia de la proteína OsmB de *E.coli* (Jarrett y Lansbury 1992). El crecimiento de los agregados luego del proceso de nucleación puede tener lugar de dos formas: a través de la unión de monómeros a multímeros o la unión entre multímeros.

La formación de puentes disulfuro es la reacción química más común relacionada con la agregación de proteínas. Los residuos de cisteínas libres se oxidan dando lugar a la formación de nuevos puentes disulfuros o al intercambio de estos, resultando en la agregación de proteínas (Toichi *et al.* 2013). La agregación puede estar mediada por otras reacciones químicas como la oxidación (Mehrnaz Khosravi *et al.* 2000), la formación de intermediarios del tipo de anhídrido cíclico (Strickley y Anderson 1997) o el entrecruzamiento mediado por formaldehído (Schwendeman *et al.* 1995).

2.4 Plegamiento y agregación de gamma cristalinas.

La H γ D cristalina humana es una proteína que se mantiene estable frente a altas concentraciones de agentes desnaturizantes (8 M de urea y 5.5 M de cloruro de guanidinio) y presenta una T_m mayor a 80°C (Kosinski-Collins 2003). La existencia de intermediarios parcialmente plegados se demostró a

partir de estudios cinéticos realizados con triples mutantes (Kosinski-Collins et al. 2004). En este sentido, el proceso de desplegamiento de la proteína se ha descrito por pasos: el primero es el desplegamiento del dominio N-terminal y el segundo paso es el desplegamiento del C-terminal. El intermediario con el N-terminal desplegado y el C-terminal plegado tiene un tiempo de vida muy corto y se ha planteado que pudiera ser el punto de partida para la formación de agregados (Kosinski-Collins y Flaugh 2004). Por otro lado, en estudios de dinámica molecular propusieron que la estructura del intermediario en la ruta de agregación pudiera estar formado por *domain swapping* del dominio carboxilo terminal (Das et al. 2011). En este sentido es importante resaltar que la mayoría de los trabajos proponen que el intermediario de desplegamiento es la estructura a partir de la cual se forman los agregados; esta propuesta asevera que el desplegamiento de la proteína es un evento imprescindible para la formación de agregados.

Si bien parte de la comunidad científica se inclina hacia el mecanismo de *domain swapping* como vía de agregación, los resultados experimentales obtenidos en otros trabajos han permitido proponer al menos otros dos mecanismos de agregación para esta proteína. El primero de ellos involucra la formación de fibras amiloides. En este mecanismo la proteína se despliega parcial o totalmente y a partir de la proteína desplegada se forman las fibras amiloides. Las fibras se han observado en la mutante G61C de la HyD cristalina así como en la HgC cristalina (Zhang y Liu 2003; Wang et al. 2010b). El segundo se conoce como mecanismo de condensación; en este, la proteína no se despliega necesariamente sino que las alteraciones físico-químicas de la superficie de la proteína provocan la auto-asociación de monómeros y la consecuente formación de agregados (Whitley et al. 2017). Este mecanismo ha sido propuesto para las mutantes P23T y R76S de la HyD cristalina (Pande et al. 2010; Ji et al. 2012) y para la V41M de la HyS (Bharat et al. 2014).

Asimismo, la formación de puentes disulfuros ha resultado importante en la formación de agregados de estas proteínas en otros estudios. Como se mencionó anteriormente, la HyD cristalina presenta seis cisteínas en su estructura, sin embargo, en estado nativo ninguna de ellas forma puentes disulfuro. Recientemente varios trabajos plantean que la formación de puentes disulfuro tiene un papel importante en el mecanismo de agregación de la HyD cristalina (Quintanar et al. 2015; Serebryany y King 2015; Serebryany et al. 2016). En este sentido los trabajos de Serebryany y colaboradores (2016) muestran

que en los agregados de las mutantes de la HyD; W42Q y W42R las cisteínas 32 y 41 se encuentran formando puente disulfuro (Serebryany *et al.* 2016).

Numerosos estudios para profundizar los conocimientos acerca de la estabilidad y el desplegamiento de la proteína se han realizado con mutantes de la HyD cristalina. Entre los principales residuos mutados se pueden mencionar los pares de residuos aromáticos conservados, los triptofanos y los residuos de la interfase entre los dominios. Para el caso de los residuos de la interfase se demostró que las mutaciones provocan la desestabilización del dominio N-terminal sin afectar el C-terminal y se observó una región clara de meseta en la curva de desplegamiento (Flaugh *et al.* 2005). Para el caso de otras mutaciones el efecto depende del dominio donde se encuentre el residuo mutado; cuando las mutaciones están en el dominio N-terminal disminuyen la estabilidad de dicho dominio y no afectan el dominio C-terminal. Esta disminución de estabilidad; en muchos casos se traduce en aumento de la población del intermediario (Kong y King 2011b). Por el contrario las mutaciones en el C-terminal no afectan la estabilidad del dominio N-terminal ni parecen tener efecto en la curva de desplegamiento (Kong y King 2011b).

Para el caso de la HyS cristalina, al igual que para la HyD, varios trabajos con mutantes han mostrado que el dominio N-terminal es menos estable que el C-terminal (Vendra *et al.* 2012; Khago *et al.* 2016; Bari *et al.* 2019). Tal es el caso de la mutante F9S, asociada con el desarrollo de cataratas en ratones, donde se observó por resonancia magnética nuclear (RMN) que la mutante presentó un plegamiento muy similar a la proteína nativa, sin embargo, el dominio N-terminal presentó una disminución de 3.5 kcal/mol en la energía libre de desplegamiento (Lee *et al.* 2010). De igual forma en la mutante G57W se observó un aumento en la exposición de parches hidrofóbicos que provocó la formación de agregados de la proteína (Bari *et al.* 2019). Asimismo, con el empleo de simulaciones de dinámica molecular y RMN se ha propuesto que para el caso de esta mutante, la formación de agregados pudiera ser a partir de un intermediario con el N-terminal desplegado y a través de *domain swapping* (Bari *et al.* 2019).

Se ha planteado que la formación de puentes disulfuro en HyS tiene un papel crucial en la formación de agregados. Thorn y colaboradores en 2019 mostraron que esta proteína puede formar un dímero mediante la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas 24 y que en determinadas condiciones, éste puede ser la base para la formación de agregados de la HyS (Thorn *et al.* 2019). De igual forma, la agregación en mutantes de HyS (N14D y N76D) se ha visto favorecida en presencia de glutatión oxidado, lo que apunta a la posible formación de puentes disulfuro durante la agregación (Forsythe *et al.* 2019)

3.1 Metales y cataratas.

Los iones metálicos son elementos esenciales para el cuerpo humano como cofactores de enzimas. En el caso del lente ocular se conoce que existen enzimas como la superóxido dismutasa que utiliza cobre y zinc como cofactores (González-Iglesias, *et al.* 2017; Quintanar *et al.* 2015). Además se ha observado la presencia de proteínas que contribuyen con la homeostasis de iones metálicos como las metalotioneínas (Hancock *et al.* 2014). A pesar de esto, los iones metálicos han sido reconocidos como agentes etiológicos en el desarrollo de las cataratas. En este sentido, se ha observado prevalencia de esta enfermedad entre los trabajadores de la industria metalúrgica (Carter y Spurgeon 2018). Por otro lado, en lentes extraídos de cataratas se ha observado un aumento de los niveles de diversos iones metálicos como Cu(II), Zn(II) y Cd(II) en comparación con lentes sanos (Dawczynski *et al.* 2002). Las concentraciones de iones metálicos en el lente varían con la edad y se pueden modificar con los hábitos. Tal es el caso del hábito de fumar, que ha sido relacionado con el desarrollo de las cataratas. Se ha observado un aumento de las concentraciones de Cd(II), Cu(II) y Pb(II) en lentes con cataratas de pacientes fumadores en comparación con pacientes no fumadores (Cekic 1998).

Existen algunos trabajos in vitro que muestran el efecto de diferentes iones metálicos en la agregación de las cristalinas. Tanto la α A como α B cristalinas interaccionan con Cu(II) y Zn(II). El aumento de las concentraciones de Zn(II) potencian la actividad chaperona de la alfa cristalina (Biswas y Das 2008). Por otro lado Singh y colaboradores en 2009 informaron que el Zn(II) y Cd(II) promueven la agregación de una mutante de la α A cristalina (Singh *et al.* 2009). En el caso de las γ -cristalinas, se ha

observado que el Cu(II), el Zn(II) y el Hg(II) favorecen la agregación de la HyD cristalina y este efecto es dependiente de la concentración (Quintanar *et al.* 2015; Domínguez-Calva *et al.* 2018b). Para el caso particular de la HyS cristalina aún no existe un consenso en cuanto al efecto del Zn(II) en la agregación de la proteína; en este sentido, existen trabajos que plantean que el Zn(II) no induce agregación de la misma (Domínguez-Calva *et al.* 2018a), mientras que otros autores si han observado que tanto el Zn(II) como el Cu(II) inducen la agregación de esta cristalina (Roskamp *et al.* 2019). En nuestro grupo de trabajo durante mis estudios de maestría pudimos comprobar que bajas concentraciones de Cu(II) y Zn(II) favorecen la agregación de la HyD cristalina durante tiempos largos. En este trabajo los resultados obtenidos indican que ambos metales favorecen la agregación de la HyD cristalina por mecanismos diferentes (Fernandez-Silva 2015).

3.2 Radiación UV y cataratas.

La radiación ultravioleta comprende las longitudes de onda entre los 180 y los 400 nm. Se divide en tres tipos: UVA (315-400 nm), UVB (295-315 nm), y UVC (100-280 nm) (Young 2006). La exposición a esta radiación puede provocar diferentes daños en los tejidos a través de reacciones fotoquímicas con aminoácidos, nucleótidos y lípidos. De igual manera existen daños indirectos a través de la generación de especies reactivas del oxígeno y daños oxidativos. La exposición a radiación UV ha sido relacionada en muchos tejidos con incremento en mutaciones y muerte celular. De la misma manera, se ha visto asociada a enfermedades como la queratitis (Roberts 2001a) y el cáncer de piel (D'Orazio *et al.* 2013).

Para el caso particular del ojo humano, se conoce que éste es capaz de filtrar todas las longitudes de onda menores a 295 nm. Se ha comprobado, sin embargo, que la exposición a la radiación UVB provoca un aumento de la opacidad del cristalino (Sloney 2001). Por otra parte, estudios epidemiológicos han asociado las horas de exposición a la radiación UV con el desarrollo de cataratas (Dongn *et al.* 2003). Para el caso de las gamma cristalinas, estudios realizados en HyD han comprobado que la radiación UVB provoca cambios estructurales en los triptofanos y esto desestabiliza la proteína y aumenta la velocidad de desplegamiento (Xia *et al.* 2013). Otros residuos como las tirosinas y las cisteínas han sido relacionados con los primeros pasos en la foto-agregación de esta

proteína (Schafheimer *et al.* 2014). Otros reportes han planteado que la radiación UVB provoca la formación de fibras amiloides por parte del dominio C-terminal de la HyD (Moran *et al.* 2013). Para el caso de la HyS no existen reportes del efecto de la radiación UV.

En el caso de las beta cristalinas, se han realizado estudios en lentes con cataratas y se ha planteado que la radiación UV induce cambios estructurales en los triptofanos de la proteína. Estas modificaciones generan derivados de los triptofanos como la kinurenina, el hidroxitriptofano, la hidroxiquinurenina, entre otros (Gakamsky *et al.* 2016). Hasta el momento, no existen informes de la presencia de estos derivados en las gamma cristalinas.

Hasta el momento el mecanismo por el cual se forman los agregados que originan las cataratas no se conoce a ciencia cierta, aunque, como ya se mencionó, los resultados experimentales tanto in vitro como in vivo han permitido proponer varios modelos. La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento emplean condiciones extremas (altas dosis de radiación y elevadas concentraciones de iones metálicos). Sin embargo, la formación de las cataratas es un proceso, acumulativo, lento, en el cual las proteínas están expuestas a factores externos en bajas dosis, acumulan daños por años, hasta que estos superan los mecanismos con que cuenta el lente y las proteínas comienzan a agregarse. En tal sentido, parte de lo que nos interesa en este trabajo es intentar tener un escenario un poco más cercano a lo que fisiológicamente ocurre con esta patología. En trabajos anteriores para ambas proteínas (HyD y HyS) se ha demostrado, que el efecto de los iones metálicos es dependiente de la concentración. Además, se ha demostrado que el empleo de 1 equivalente de ambos iones metálicos no induce agregación de las proteínas. Por esta razón, pretendemos utilizar bajas concentraciones de iones metálicos, específicamente 1.5 equivalentes y tiempos cortos de radiación para estudiar el efecto de ambos factores en el desplegamiento y agregación de HyD y HyS. Este trabajo, es una continuación de mi trabajo de maestría, donde ya comenzamos a caracterizar el efecto de bajas concentraciones de iones metálicos en el desplegamiento y agregación de la HyD cristalina humana. En este estudio empleamos diferentes técnicas como la dispersión dinámica de luz, la absorción UV-Visible y la espectroscopía de fluorescencia. Durante el doctorado, además de realizar nuevos experimentos, hemos realizado un re-análisis con mayor profundidad de los resultados obtenidos en la maestría llegando a observaciones relevantes que serán expuestas en este documento de tesis. Finalmente, durante este periodo obtuvimos los primeros avances en el estudio el efecto de posibles moléculas inhibidoras de la agregación de la HyS cristalina; estos resultados preliminares son presentados en un anexo en este documento de tesis.

De manera que en este trabajo de tesis se resumen tres vertientes de un gran proyecto con el que se trabaja en nuestro laboratorio.

1. Caracterización del efecto de bajas concentraciones de iones metálicos en el desplegamiento y agregación de las HyD y HyS.
2. Caracterización del efecto de la radiación UV en el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina.

3. Búsqueda de inhibidores de la agregación de diferentes proteínas de la familia $\beta\gamma$ cristalinas.

3. Justificación.

Las cataratas forman parte del grupo de enfermedades asociadas al mal plegamiento y la agregación de proteínas. En las cataratas asociadas al envejecimiento, las proteínas cristalinas con el paso del tiempo y por diferentes factores externos sufren diversas modificaciones como oxidaciones, desamidaciones, y truncamiento que provocan la agregación de estas y en última instancia el desarrollo de la enfermedad. Entender como tiene lugar este proceso resulta de gran interés para entender la fisiopatología de esta enfermedad, así como para intentar buscar tratamientos preventivos o paliativos para la misma.

4. Hipótesis.

Tiempos cortos de exposición a radiación UV, inducen el desplegamiento parcial y la agregación de la HyS de forma similar al efecto de los iones metálicos Cu (II) y Zn (II) en la HyD cristalina.

5. Objetivo General.

Caracterizar el efecto de bajas dosis de iones metálicos y radiación UV en el desplegamiento y la agregación de las H γ S y H γ D cristalina humana durante el tiempo.

Objetivos específicos.

1. Expresar y purificar H γ S y H γ D.
2. Caracterizar el efecto del Cu(II) y el Zn(II) en la agregación de ambas proteínas empleando diferentes técnicas espectroscópicas.
3. Caracterizar el efecto de la radiación UV en la agregación de la H γ S cristalina utilizando diferentes técnicas espectroscópicas.

6. Metodología.

6.1. Expresión y Purificación de HyD en *E.coli*.

Como ya se informó anteriormente en la tesis de maestría, la HyD cristalina se expresó en la cepa de *E.coli* BL21(RIL) (Fernández-Silva 2015). Esta cepa fue transformada con el plásmido pET16b-HyD. A partir de una colonia, se creció 1L en medio 2x YT suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 30 µg/mL de cloranfenicol, hasta que la DO a 600 nm alcanzó valores de 0.9. La expresión de la proteína se realizó con 1 mM de isopropyl D-tiogalactósido (IPTG) a 18°C por 12 h. Las células fueron resuspendidas en 10 mM acetato de amonio, 50 mM NaCl pH 7.2. La ruptura celular se realizó mediante la incubación con lisozima 1mg/mL por 30 min y posteriormente la sonicación con 10 ciclos de 1 min. Las células lisadas fueron centrifugadas por 45 min a 17000 rpm. El sobrenadante fue aplicado a una columna Q-Sepharose. Posteriormente, las fracciones donde se comprobó por electroforesis, la presencia de la proteína HyD cristalina fueron concentradas y eluidas a una columna Sephadex 200.

6.2. Expresión y Purificación de HyS en *E.coli*.

Para la expresión de HyS se partió del plásmido pE-SUMO-CRYGS y se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(RIL) por choque térmico. A partir de una colonia transformada se inoculó un volumen de 20 mL de medio LB y se dejó crecer a 37°C por 12 h. Posteriormente, este cultivo posteriormente se utilizó para inocular 1 L de medio *superbroth*. Las células se dejaron crecer a 37°C con una agitación de 200 rpm hasta una DO a 600 nm de 2. Posteriormente se procedió a la inducción de la expresión de la proteína con IPTG 0.33 mM por 12 h a 18°C. El cultivo se centriugó a 4,000 rpm por 30 min. El precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, 10 mM de imidazol pH 8. Para la lisis celular, las células se incubaron con lisozima 1 mg/ml por 30 min. a 25°C y luego se sonicaron en hielo, 10 ciclos de 1 min. con descansos de 1 min. entre ciclos. El lisado se centrifugó a 13,000 rpm por 60 min. y el sobrenadante se filtró con membranas de 0.22 µM.

6.2.1. Purificación de HyS cristalina.

El protocolo de purificación de HyS contó con tres etapas. Las dos primeras etapas fueron cromatografías de afinidad y la última etapa fue una cromatografía de intercambio aniónico. La primera y última etapa se realizaron en un equipo AKTA PRIME mientras que la segunda etapa se realizó de forma manual.

6.2.1.1. Cromatografía de Afinidad 1.

Posterior a la ruptura celular, la columna HisTrap™ Sepharose® se cargó con 4 volúmenes de NiSO₄ 100 mM, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.22 µm y se inyectó a la columna. Para eliminar las proteínas no fijadas a la matriz se realizó un lavado con 3 volúmenes de columna (Vc) de tampón Tris HCl 50 mM, 10 mM de imidazol pH 8. Para la elución se empleó un gradiente lineal de 10 a 500 mM de imidazol y se colectaron fracciones de 3 mL.

6.2.1.2. Corte con proteasa SUMO

Las fracciones donde se comprobó la presencia de la proteína en la cromatografía de afinidad 1 fueron dializadas contra el tampón Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl pH 8 para eliminar el imidazol. Posteriormente se adicionó la proteasa SUMO (Sigma Aldrich, USA) y se incubó por 12 h a 25°C. Para corroborar la eficiencia de la reacción de corte se realizaron electroforesis SDS-PAGE al 14%.

6.2.1.3. Cromatografía de Afinidad 2.

Posterior al corte con la proteasa SUMO se realizó una segunda cromatografía de afinidad con la columna HisTrap™ Sepharosa® para eliminar la etiqueta SUMO. Posterior a la inyección de la muestra, para eliminar las proteínas no fijadas a la matriz se realizó un lavado con 3Vc de tampón Tris HCl 50 mM, pH 8. Para la elución se empleó un gradiente por pasos con 100 y 200 mM de imidazol. Durante toda la cromatografía se colectaron fracciones de 3 mL. La presencia de la proteína de interés fue comprobada por electroforesis SDS-PAGE al 14%. Las fracciones donde se comprobó la presencia

de la proteína fueron concentradas para su utilización en la etapa posterior de la purificación.

6.2.1.4. Cromatografía de intercambio aniónico.

La muestra de HyS se inyectó en una columna Hi-Load 6/60, con matriz Q-sepharosa. La columna fue equilibrada previamente con 2Vc de tampón A (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl pH 8). Posterior a la inyección de la proteína, se realizó un lavado con 2Vc para eliminar las proteínas no fijadas al intercambiador. Para la elución de las proteínas fijadas al intercambiador se empleó un gradiente lineal de (0-50% B y 50 a 100% B), tampón B (acetato de amonio 10 mM-NaCl 100 mM). Para corroborar la presencia de la proteína así como su grado de pureza se realizaron electroforesis SDS-PAGE al 14%.

6.3. Electroforesis SDS-PAGE.

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 14% con dodecilsulfato de sodio, según el método descrito por Laemmli y colaboradores (Laemmli 1970). Durante toda la corrida se utilizó un voltaje de 160 mV en una cámara Mini-Protean Tetrasystem (Bio-Rad, EUA). Las muestras se mezclaron con tampón de ruptura 3x (Tris 1 M pH 8, SDS, betamercaptoetanol, glicerol, bromofenol azul) y se calentaron durante 5 min. en un bloque térmico a 100°C. Para la tinción de los geles se utilizó una solución de fijación (10% isopropanol, 10% ácido acético y 0.003% de azul de Coomassie R-250) por 30 min. y posteriormente una solución de tinción (10% ácido acético y 0.003% de azul de coomassie R-250) por 1 h. Para la decoloración se empleó una solución de ácido acético al 10%. Se utilizó el patrón de peso molecular comercial *Spectra multicolor broad range protein ladder* (Thermo Scientific, EUA).

6.4. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas en las muestras de HyD y HyS se determinó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Agilent. Para ello, se empleó el

coeficiente de extinción molar teórico de $42860 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para ambas proteínas. Se utilizó una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm de longitud.

6.5. Desplegamiento térmico de HyS y HyD por espectroscopía de fluorescencia.

La estabilidad térmica de la proteína se siguió por espectroscopía de fluorescencia en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II). Las sales empleadas como fuente de Cu(II) y Zn(II) en todos los experimentos fueron el CuSO_4 y ZnSO_4 respectivamente. Para todos los experimentos se emplearon concentraciones de 1.5 equivalentes (eq) para ambos metales. De igual manera, para todos los experimentos con HyD cristalina se utilizó la proteína disuelta en acetato de amonio 10 mM, NaCl 50 mM pH 7.2, a una concentración de $50 \mu\text{M}$. El rango de temperatura empleado fue de 37 a 98°C con un incremento de $3^\circ\text{C}/\text{min}$. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y una longitud de onda de emisión de 325 y 350 nm. Los experimentos fueron realizados en un fluorómetro Cary Eclipse (Agilent, EUA). Los datos se ajustaron a una sigmoide empleando la ecuación de Boltzmann (Ecuación 1) (Figura 7)

$$\text{Ecuación 1: } y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + e^{(X - X_0)/dx})$$

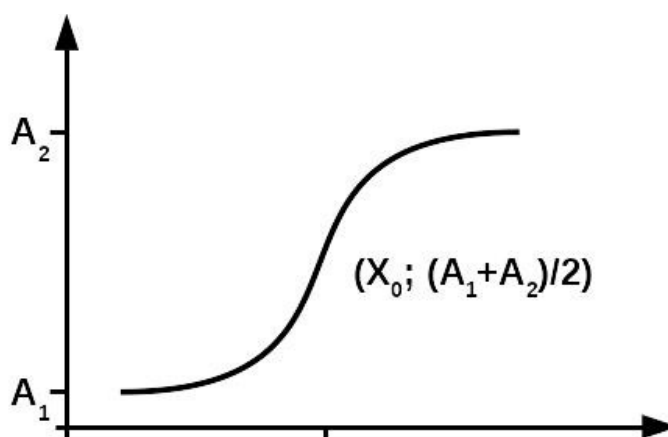


Figura 7: Esquema de una sigmoide. Se señalan las diferentes variables de la ecuación empleada para ajustar los datos de despliegamiento térmico por fluorescencia.

6.6. Cinética de agregación de HyS por turbidez.

Los ensayos de turbidimetría se realizaron con el empleo de un espectrofotómetro Agilent siguiendo el valor de la turbidez a 405 nm. Para todos los experimentos se empleó una solución de proteína de 50 μM y 1.5eq. de los iones metálicos. La temperatura empleada fue de 37°C y se colectaron los valores de absorción a cada minuto (HyD) o cada 30 segundos (HyS) durante 12 horas.

6.7. Cinética de agregación de HyD y HyS por dispersión dinámica de luz.

Para conocer el tamaño de los agregados se empleó la dispersión dinámica de luz (DLS). Se utilizó un Equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP spectrophotometer (EUA) y se empleó un ángulo de 173°. Se empleó una concentración de proteína de 50 μM disuelta en el tampón acetato de amonio 10 mM, 50 mM de NaCl pH 7.2. Todas las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 9000 rpm y filtradas a través de 0.22 μm . Las mediciones se realizaron en ausencia y presencia de 1.5 eq. de CuSO_4 o ZnSO_4 at 37° por 12h. Cada medición tuvo 3 corridas con 10 scans cada una, para un tiempo de duración de la medición de 1.6 minutos. Se obtuvo el coeficiente de difusión traslacional a través de la medición del coeficiente de correlación.

A partir del coeficiente de difusión y empleando la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 2) se obtuvo el radio hidrodinámico.

$$\text{Ecuación 2 } R_H = K_B T / 6\pi\eta D$$

K_B : Constante de Boltzmann, T: temperatura, η : viscosidad de la solución. Se empleó un valor de viscosidad 0.08872 poise a 25°C.

Los datos fueron analizados empleando el software SEDFIT (Schuck 2000) utilizando el modelo de distribución.

En los ensayos de DLS, a partir de la curva de correlación, se obtuvieron los datos de difusión y los radios hidrodinámicos. Dentro de los aspectos importantes a tener en consideración, ante una curva de correlación (Figura 8) está, el intercepto en el eje “y”, que debe ser lo más cercano a 1 posible y brinda información relacionada con la calidad de la medición. Además, el tiempo al cual comienza a disminuir

la correlación $G(\tau)$ y la presencia de una o más pendientes, que nos brindan información en relacionada con el tamaño de las moléculas presentes en la muestra y el grado de polidispersión respectivamente. Por otro lado, la presencia de ruido en la línea base es un indicativo de la presencia de partículas contaminantes.

Esta técnica es particularmente sensible a la presencia de partículas grandes y el tamaño obtenido va a depender de las partículas detectadas por el láser en cada medición. En este sentido, en función de la presencia en la muestra de moléculas con diferentes radios hidrodinámicos, podemos definir curvas de correlación típicas de muestras monodispersas (Figura 8B), caracterizadas por la presencia de una única pendiente en la curva de correlación y curvas de correlación de muestras polidispersas, cuya principal característica es la presencia de más de una pendiente en la curva (Figura 8C)

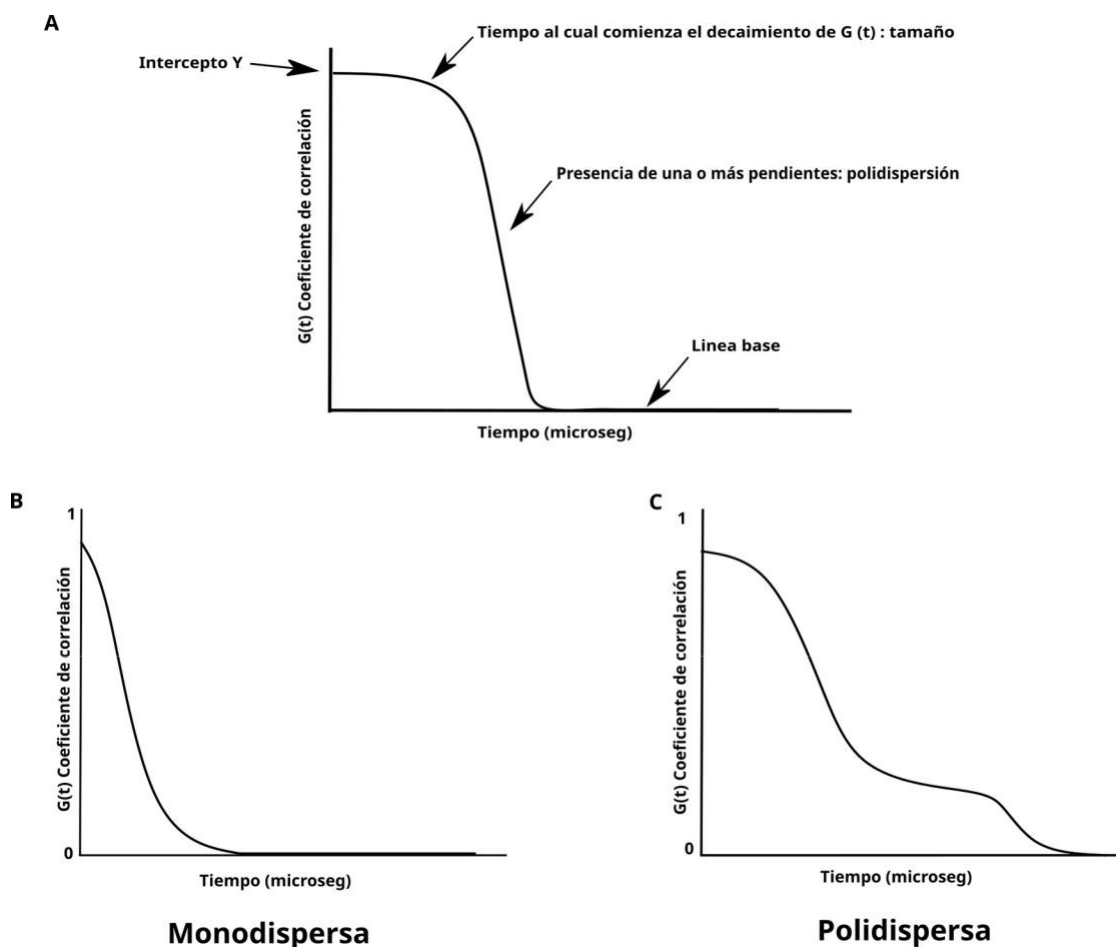


Figura 8: Curvas de correlación. A: Aspectos importantes de una curva de correlación, B: Curva de correlación de una muestra monodispersa, C: curva de correlación de una muestra polidispersa.

6.8. Estudio de cambios conformacionales por espectroscopía de fluorescencia.

Los cambios conformacionales sufridos en HyS y HyD producidos por la interacción con iones metálicos, así como por la radiación UV se evaluaron por espectroscopía de fluorescencia. Se colectaron espectros de las proteínas en ausencia y presencia de 1.5eq de Cu(II) y Zn(II) y luego de ser irradiadas por 120 min. Los espectros fueron tomados cada minuto durante 12 horas. Para todos los experimentos se empleó una concentración de proteína de 50 μ M.

Para las cristalinas los espectros de emisión de fluorescencia brindaron información valiosa en relación a la conformación de las proteínas. En este sentido el corrimiento del máximo de emisión así como las variaciones en la intensidad de fluorescencia proporcionan información relacionada con el estado de plegamiento de estas biomoléculas (Figura 9). De esta manera; está bien descrito que cuando la proteína está plegada tiene un máximo de emisión de fluorescencia en 325 nm (Figura 9A), este máximo se corre a 350 cuando la proteína se despliega completamente. Por su parte, cuando el máximo de emisión se encuentra entre 325 y 350 nm es un indicativo de que la proteína se encuentra parcialmente desplegada. Por otro lado, un aumento en la intensidad de fluorescencia puede ser indicativo de desplegamiento en la proteína. Sin embargo la disminución en la intensidad puede deberse a efectos de apagamiento de la fluorescencia o a precipitación.

6.9. Ensayos de radiación UV de la HyS cristalina.

Los ensayos de radiación se realizaron empleando una lámpara UV con longitud de onda de 302 nm con una intensidad de 1.3 W/m². Se empleó para todos los ensayos de radiación una concentración de proteína de 50 μ M disuelta en Tris-HCL 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8. Las muestras fueron irradiadas en celdas de metacrilato de paso óptico de 1 cm y se ubicaron a 30 cm de la lámpara. Se utilizó un tiempo de radiación de 2 horas. Posterior a la radiación, se realizaron cinéticas por fluorescencia, turbidez y dispersión dinámica de luz empleando las condiciones descritas en los epígrafes 6.6, 6.7 y 6.8 pero teniendo como factor inductor de la agregación a la luz ultravioleta.

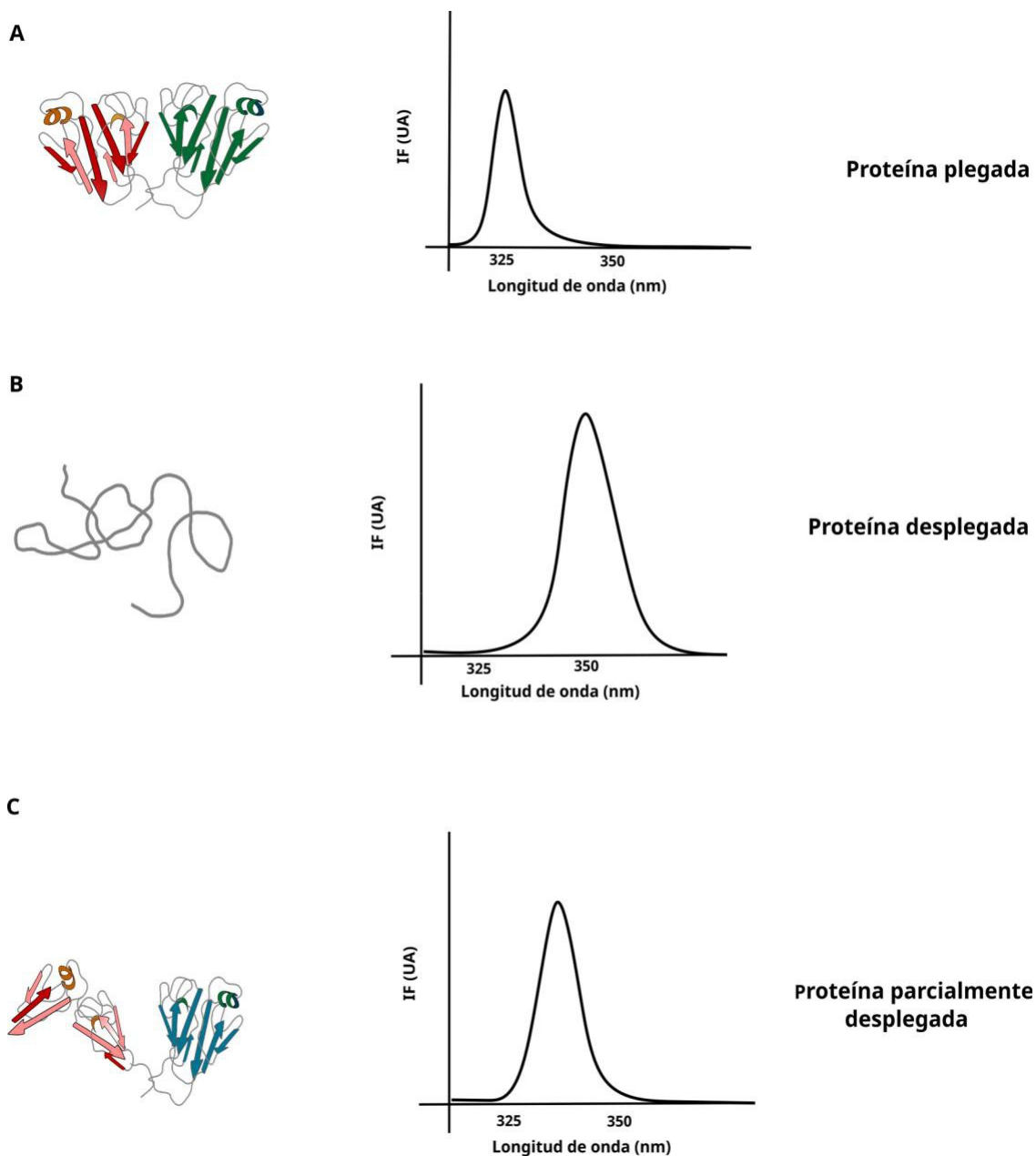


Figura 9: Relación entre el máximo de emisión de fluorescencia y el plegamiento de las gamma cristalinas. A: máximo de emisión en 325 corresponde a la proteína plegada, B: máximo de emisión en 350 nm corresponde con la proteína desplegada, C: máximo de emisión en un valor intermedio entre 325 y 350 nm se corresponde con la proteína parcialmente desplegada

7. Resultados.

7.1. Expresión y purificación de proteínas.

7.1.1. Purificación de la HyD cristalina humana.

Para la HyD cristalina se empleó un protocolo de dos etapas. La primera etapa fue una cromatografía de intercambio aniónico en matriz Q-sepharosa. Para la elución de las proteínas fijadas al intercambiador se empleó un gradiente por pasos de NaCl. La presencia de la proteína se corroboró por electroforesis SDS-PAGE al 14%. Como segunda etapa se empleó una cromatografía de exclusión molecular en matriz Sephadex 200. Como se observa en la figura 10 en esta cromatografía se obtuvo un único máximo de absorbancia a 280 nm. La presencia de la proteína se corroboró mediante electroforesis SDS-PAGE al 14%. En la figura 10 se observa la presencia de una banda predominante en los carriles 7 al 13, lo que demuestra que con el protocolo empleado se logró obtener un grado de pureza adecuado para los experimentos que se realizaron. Se obtuvieron entre 15-20 mg de proteína por litro de cultivo.

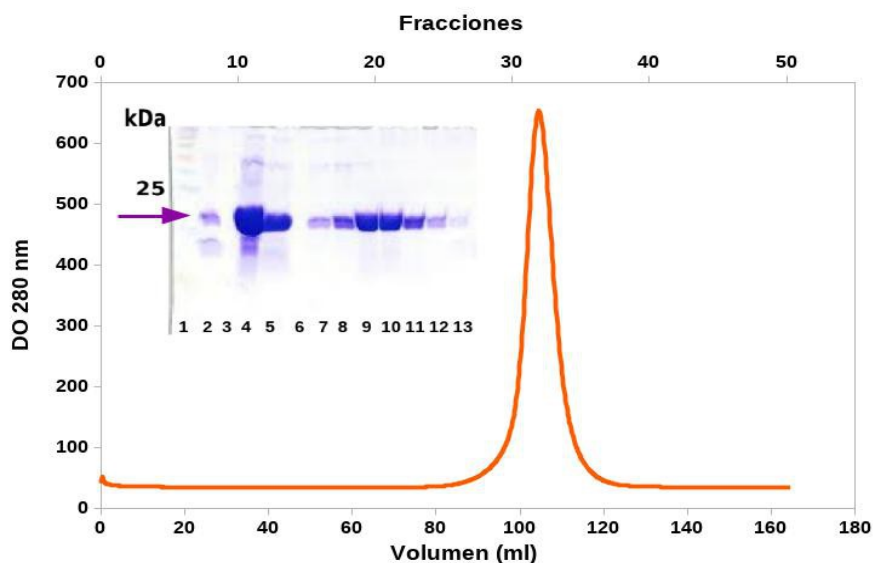


Figura 10: Cromatograma de la purificación por columna de exclusión molecular en matriz Sephadex 200. Se muestra un único máximo de absorbancia a 280 nm. Inserto: SDS-PAGE al 14%. En el carril 1: Patrón de peso molecular, carriles 2, 4 y 5: fracciones de la primera etapa, cromatografía de intercambio iónico y carriles del 7 al 13 fracciones de la cromatografía de exclusión molecular. Con la flecha morada se señala la banda correspondiente a la HyD cristalina.

7.1.2. Expresión de HyS cristalina en *E.coli*.

En la figura 11 se puede observar la electroforesis de la expresión de la proteína HyS. Se observa en los carriles 3 y 4 una banda alrededor de 35 kDa de peso molecular que se corresponde con el peso molecular de la proteína de interés más la etiqueta SUMO. Estos resultados demuestran que el protocolo seguido para la inducción funciona correctamente y con este se logra sobreexpresar en el cultivo la proteína de interés. El empleo del medio *superbroth* permitió aumentar las concentraciones de proteína obtenida a partir de un litro de cultivo obteniéndose 25 a 30 mg por litro de cultivo.

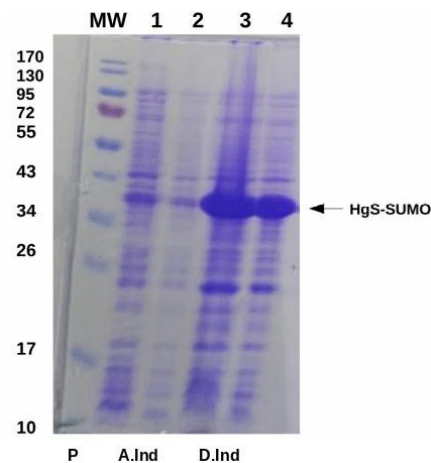


Figura 11: Electroforesis SDS-PAGE al 14% correspondiente a la expresión en *E. coli* cepa (BI21 RIL) de la HyS cristalina. P: patrón de peso molecular, A.Ind: antes de inducción con IPTG (carriles 1 y 2), D.Ind: Después de inducción con IPTG (carriles 3 y 4). En los carriles tres y cuatro se aplicaron distintas diluciones de la muestra después de la inducción con IPTG.

7.1.3. Purificación de la HyS cristalina.

La purificación de la HyS cristalina se realizó con un protocolo de 3 etapas. Las dos primeras fueron cromatografías de afinidad mientras que la última etapa fue una cromatografía de intercambio iónico.

7.1.3.1. Cromatografía de afinidad 1.

Posterior a la ruptura celular, el extracto total de proteínas (35 mL) fue aplicado a columna de afinidad HisTrap™ Sepharosa®. En la figura 12 se muestra el cromatograma correspondiente al primer paso de purificación. La muestra fue inyectada manualmente una vez equilibrada la columna con tres volúmenes del tampón A (Tris-HCl 50 mM, 10 mM de Imidazol pH 8). Para la elución de las proteínas fijadas a la matriz se empleó un gradiente lineal de imidazol de 0 a 100% de tampón B (tampón B: Tris-HCl 50 mM, 500 mM de Imidazol pH 8). Se puede observar la presencia de un pico mayoritario, el cual eluyó al 48% de tampón B (Figura 12). La presencia de la proteína se verificó por electroforesis (Figura 12 inserto). Se puede observar la presencia de una banda mayoritaria con el peso molecular esperado de 35 kDa. Asimismo, se observan otros contaminantes en la muestra de menor peso molecular. Luego de este primer paso, las fracciones donde se comprobó la presencia de la proteína se dializaron contra el tampón de corte de la proteasa (Tris-HCl 50 mM 100 mM NaCl pH 8). Posteriormente se incubó la proteína con la SUMO-proteasa por 12h a 25°C. La eficiencia del corte se comprobó mediante electroforesis como se puede ver en la figura 13. En el carril 3 que corresponde a la muestra después del corte (DC) se observan varias bandas, la banda que se encuentra alrededor de los 20 kDa se corresponde con la HyS sin la etiqueta SUMO; la banda alrededor de los 35 kDa se corresponde con el remanente de HyS que aún conserva la etiqueta, mientras que la banda que se encuentra por encima de los 17 kDa se corresponde con la etiqueta SUMO.

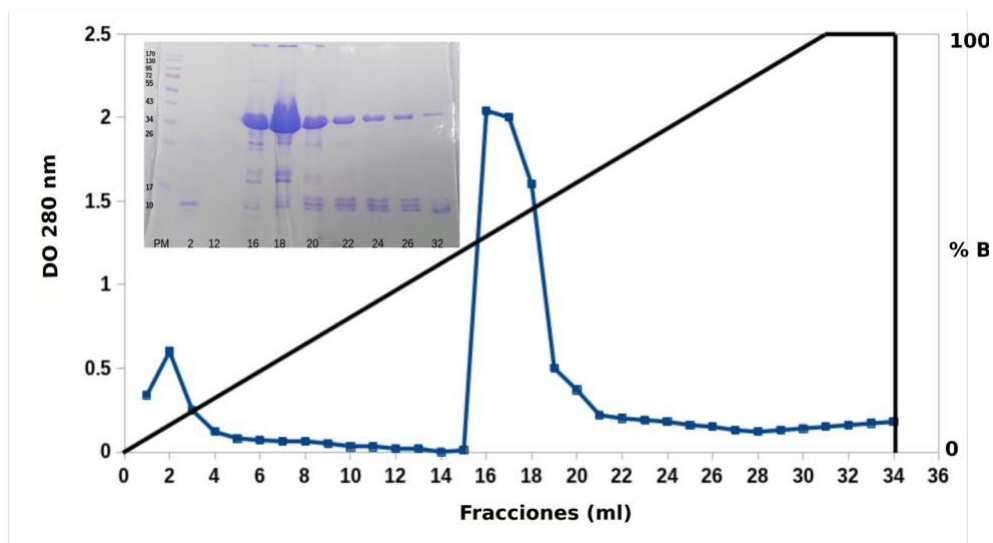


Figura 12: Cromatograma correspondiente a la primera etapa de purificación en columna de afinidad a quelatos metálicos en matriz de agarosa. La matriz se equilibró previamente con 3 Vc de tampón Tris-HCl 50 mM, Imidazol 10 mM pH 8 (Tampón A). Posteriormente se inyectó la muestra. Para la elución de las proteínas fijadas a la matriz, se empleó un gradiente lineal de 0 a 100% de tampón Tris-HCl 50 mM, Imidazol 500 mM pH 8(B). Se empleó un flujo de 1.0 ml/min. En el inserto se muestra el gel correspondiente a esta etapa de la purificación. En éste se aplicaron diferentes fracciones correspondientes a los picos obtenidos en el cromatograma. Con flecha morada se señala la banda correspondiente a la proteína HyS con la etiqueta SUMO.

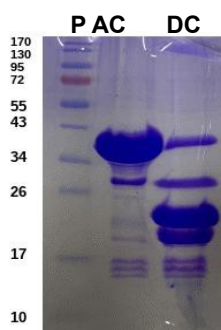


Figura 13: SDS-PAGE al 14% correspondiente al corte con la proteasa SUMO. P: Patón de peso molecular, AC: proteína HyS antes de incubar con la proteasa, DC: proteína HyS después de incubar con la proteasa.

7.1.3.2. Cromatografía de afinidad 2.

En la figura 14 se muestra el cromatograma correspondiente al segundo paso en la purificación de la HyS cristalina. Previo a la inyección de la muestra, la columna se equilibró con tres volúmenes de columna de tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 8). Una vez inyectada la proteína, se colectaron las

fracciones no fijadas a la matriz. Posteriormente se realizó un lavado con tres volúmenes de columna de tampón A para eliminar el remanente de proteínas no fijadas al intercambiador. Para la elución se empleó un gradiente por pasos con 3Vc de los tampones correspondientes. Se utilizaron diferentes concentraciones de imidazol (10, 100, y 200 mM). Como se observa en la figura 14, con 100 y 200 mM de imidazol, se obtuvo un pico a cada concentración. Para comprobar la presencia de la proteína, se realizaron electroforesis al 14% con fracciones intercaladas de cada máximo de absorbancia. En el inserto de la figura 13 se observa claramente la presencia de la HyS cristalina en la fracción no fijada y en el lavado con tampón sin imidazol, mientras que la etiqueta SUMO eluyó en los lavados con 100 y 200 mM de imidazol.

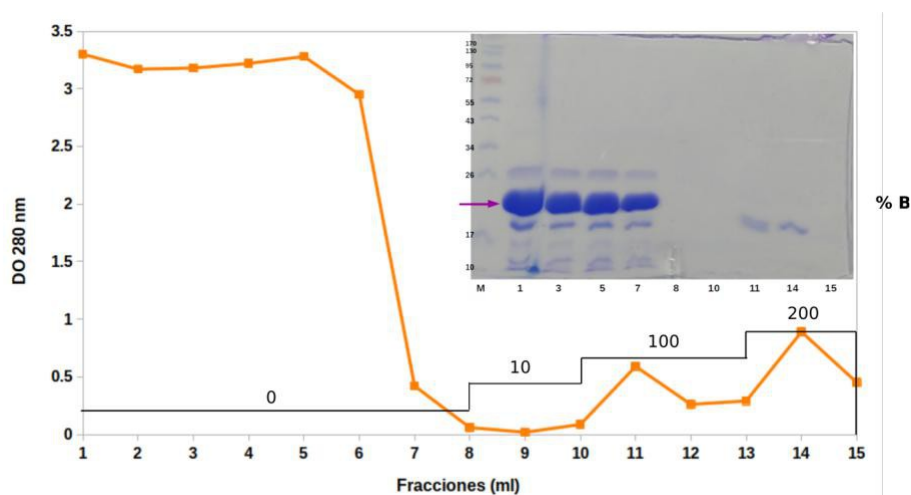


Figura 14: Cromatograma correspondiente a la segunda etapa de purificación en columna de afinidad a quelatos metálicos en columna HisTrap™ Sepharosa®. La matriz se equilibró previamente con 3 Vc de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 (A), posteriormente se inyectó la muestra. Para la elución de las proteínas fijadas a la matriz, se empleó un gradiente por pasos con 3Vc de tampón Tris-HCl 50 mM, 10, 100 y 200 mM de Imidazol pH 8 (B). Se empleó un flujo de 1.0 ml/min. En el inserto se muestra el gel correspondiente a esta etapa de la purificación. En este se aplicaron diferentes fracciones correspondientes a los picos obtenidos en el cromatograma. Con flecha roja se señala la banda correspondiente a la proteína HyS.

7.1.3.3. Cromatografía de intercambio aniónico.

Las fracciones del segundo paso donde se comprobó la presencia de la HyS cristalina, se concentraron con amicon de 5 kDa de corte antes de pasar al tercer paso del protocolo. La columna fue equilibrada con 2Vc de tampón A (Tris- HCl 50 mM 100 mM de NaCl pH 8). Posterior a la inyección de la muestra, se realizó un lavado con 2Vc del tampón A para eliminar las proteínas no fijadas al

intercambiador. Para la elución se empleó un gradiente lineal de fuerza iónica de NaCl (tampón B: Tris-HCl 50 mM 500 mM de NaCl pH 8). En la figura 15 se observa el cromatograma correspondiente con esta etapa de la purificación. Se pueden observar dos picos, las fracciones de ambos se aplicaron en electroforesis para corroborar la presencia de la HyS. En el inserto de la figura 15 se observa dicha electroforesis, y se puede ver claramente la presencia de la banda correspondiente con la HyS a la altura aproximada de los 20 kDa en las fracciones correspondientes con el primer pico del cromatograma mientras que otros contaminantes eluyen en el otro pico del cromatograma.

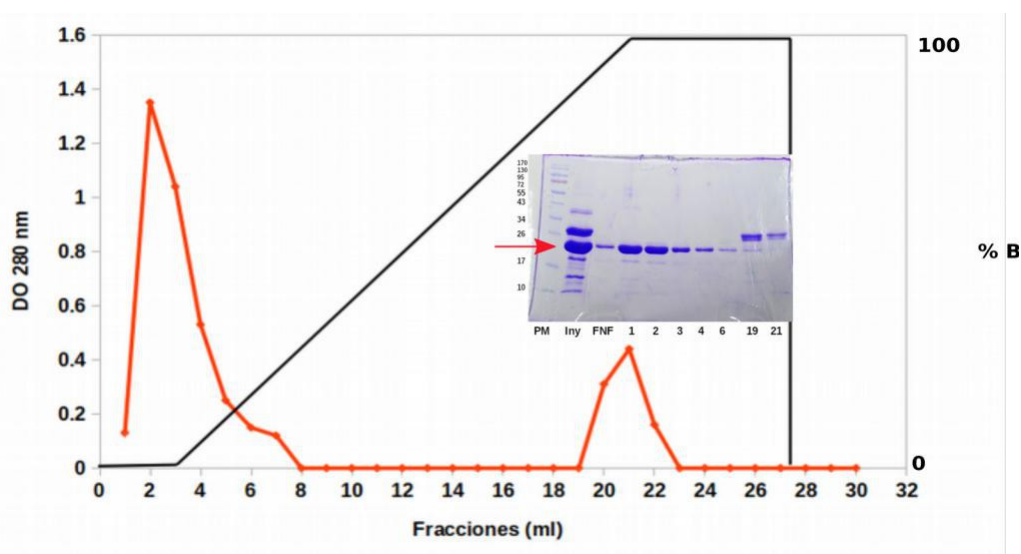


Figura 15: Cromatograma correspondiente a la tercera etapa de purificación en columna de intercambio aniónico en matriz Q-Sepharose. Se empleó una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. En el inserto se muestra el gel correspondiente a esta etapa de la purificación. En este se aplicaron diferentes fracciones correspondientes a los picos obtenidos en el cromatograma. Con flecha roja se señala la banda correspondiente a la proteína HyS. Los números en el gel indican el número de fracción del cromatograma, Iny: Muestra inyectada en la columna y FNF: Fracción no fijada a la matriz.

7.2. Desplegamiento térmico de la HyS y HyD cristalinas humanas.

Tanto la HyD como la HyS cristalina son proteínas muy estables. Para el caso de la HyD esta puede ser calentada hasta 75°C sin observar señales de desplegamiento mientras que la HyS puede ser calentada hasta los 60°C. En este trabajo, realizamos experimentos donde la temperatura fue aumentada en el rango de 37 a 98°C y se determinó la T_m de las proteínas en ambas condiciones. Este parámetro refleja la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de la proteína se encuentran plegadas. Para la HyD la T_m obtenida fue de $83.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ mientras que para la HyS, fue de $79.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Para ambas cristalinas

el máximo de emisión de fluorescencia es 325 nm cuando la proteína está plegada y este máximo se corre a 350 cuando la proteína se despliega completamente. Por esto, la relación $IF(350/325)$ es un parámetro ampliamente utilizado en estos sistemas para tener información de la fracción de proteína desplegada. En la figura 16 se muestran los gráficos que relacionan la intensidad de fluorescencia $IF(350/325)$ con respecto a la temperatura para ambas proteínas. Se puede observar claramente que no se detecta cambio durante un amplio rango de temperaturas (37-70°C) (Figura 16). Estos resultados confirman que ambas gammas cristalinas, al igual que otras proteínas de la familia, son proteínas con una alta estabilidad térmica.

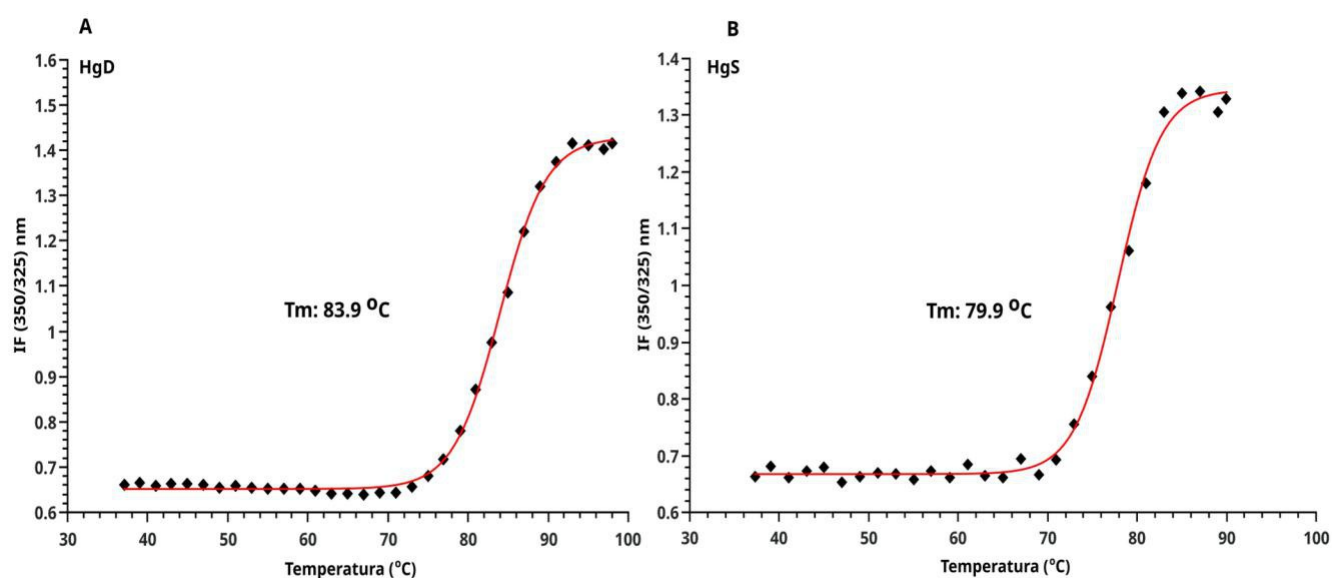


Figura 16: Despliegamiento térmico de gammas cristalinas humanas. A: HgD, B: HgS. En ambos casos se empleó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 325 y 350 nm y se calculó posteriormente la relación de $IF(350/325)$. Se aumentó a temperatura 3°C/min. de 37 a 98°C. Para el cálculo de la T_m se ajustaron los datos a una sigmoide.

7.3. Despliegamiento térmico de HgD y HgS cristalinas en presencia de Cu(II) y Zn(II).

En la figura 17 se muestra el despliegamiento térmico de ambas proteínas a una concentración de 50 μ M en ausencia y presencia de 1.5eq. de Cu(II) y Zn(II). El valor de T_m obtenido para ambas proteínas en ausencia de iones metálicos como se mencionó antes fue de 83.9°C para la HgD mientras que para la HgS fue de 79.9°C, lo que indica que estamos en presencia de proteínas muy estables. Por otro lado, en

presencia de iones metálicos los T_m variaron ligeramente. Para el caso del Cu(II) (azul) se observa claramente como la curva se corre hacia la izquierda en ambos gráficos y el valor de T_m obtenido es $77.26 \pm 0.1^\circ\text{C}$ para la HyD y $66.6 \pm 0.52^\circ\text{C}$ para la HyS. La T_m disminuye casi 7°C y 13°C para la HyD y la HyS, respectivamente.

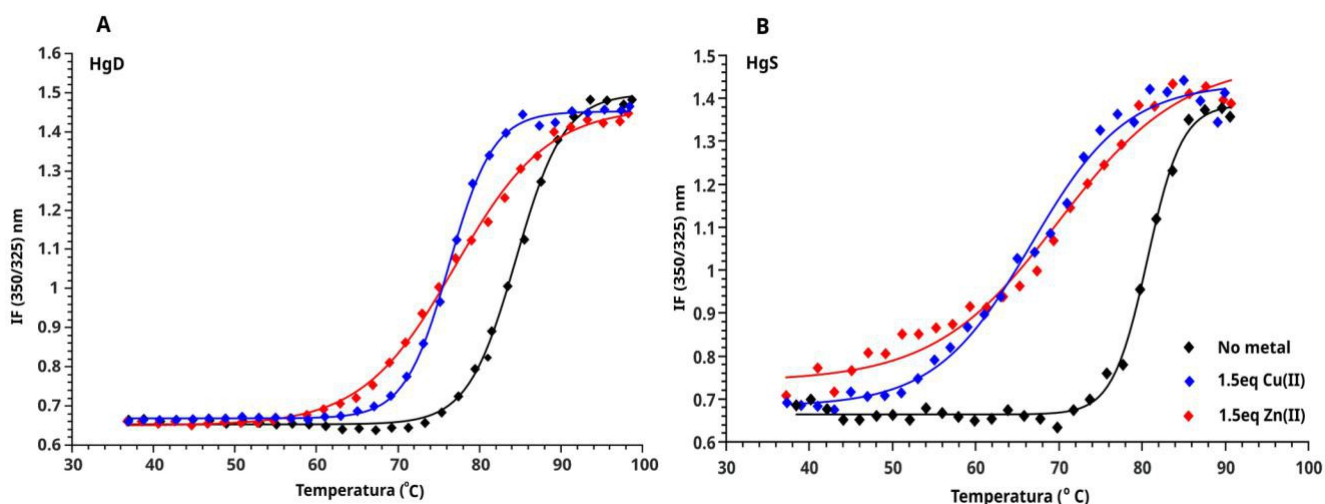


Figura 17: Despliegamiento térmico de gammas cristalina en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II). A: HyD en ausencia (negro) y en presencia de Cu(II) (azul) o Zn(II) (rojo), B: HyS en ausencia (negro) y en presencia de Cu(II) (azul) o Zn(II) (rojo). Para el cálculo de la T_m se ajustaron los datos a una sigmoide.

Estos resultados indican que el Cu(II) disminuye considerablemente la estabilidad térmica de ambas proteínas, sin embargo, tiene un mayor efecto en la HyS cristalina. Para el caso del Zn(II) (rojo) la disminución en el valor de T_m fue de 10°C para la HyS mientras que para la HyD fue de 7.5°C . Estos resultados son indicativos de que al igual que el Cu(II), el Zn(II) disminuye la estabilidad térmica de ambas proteínas, sin embargo, el efecto es mayor en la HyS cristalina. Los valores de T_m obtenidos se resumen en la tabla 4.

Por otro lado, este experimento nos permitió establecer que los valores de la relación IF(350/325) cuando la proteína está plegada, oscilan entre 0.6 y 0.7 para la HyS; por su parte fluctúan entre 0.60 y 0.65 para la HyD. Una vez que la proteína se despliega estos valores aumentan hasta aproximadamente

1.3-1.4. para ambas proteínas. Para corroborar que las proteínas se desplegaron completamente se tomaron espectros de estas al inicio y al final del experimento (Figura 18). En la figura 18 se observan los espectros de fluorescencia de ambas proteínas antes y después de finalizar el despliegamiento

térmico. En ambos casos se observa un corrimiento del máximo de emisión de fluorescencia a 350 nm en los espectros tomados posterior al desplegamiento térmico mientras que los espectros tomados antes del experimento muestran el máximo de emisión en 325 nm para ambas proteínas. Estos resultados son un indicativo de que la temperatura desplegó completamente a las gamma cristalinas.

Tabla 4: Valores de T_m obtenidos para gamma cristalinas humanas en ausencia y presencia de iones metálicos.

	HγD	HγS
No ión metálico	83.9±0.1	79.9±0.1
Cu(II)	77.26±0.1	66.6±0.52
Zn(II)	76.3±0.1	69.5±0.1

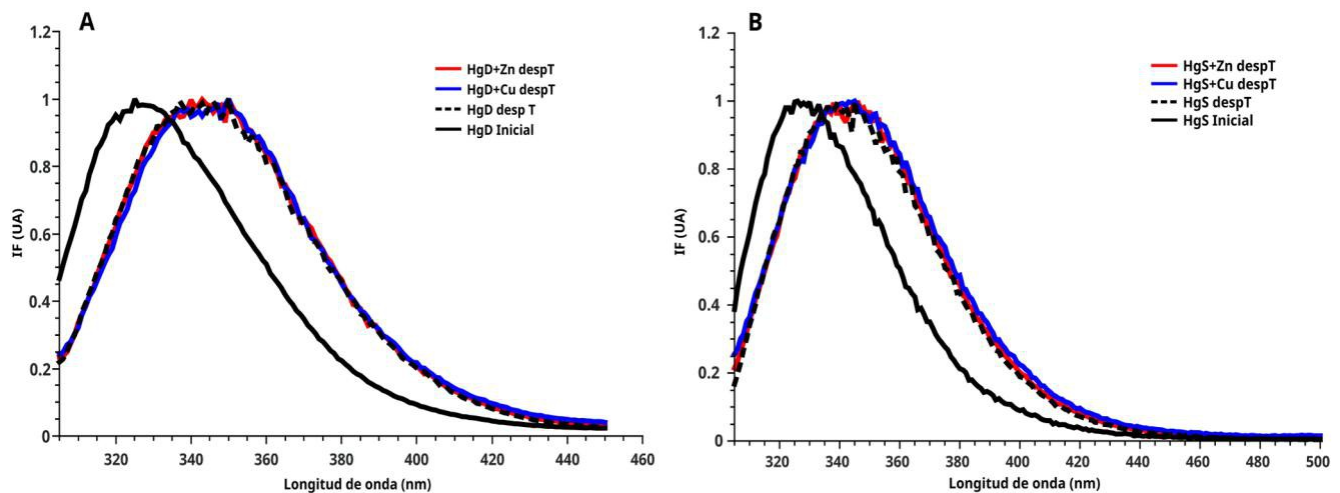


Figura 18: Espectros de fluorescencia de gammas cristalinas. A: HγD, B: HγS antes del desplegamiento térmico (negro) y después del mismo en ausencia (líneas discontinuas) y presencia de 1.5eq de Cu(II) (azul) y Zn(II) (rojo). Se empleó en ambos casos una longitud de onda de excitación de 295 nm y se colectaron los espectros entre 300 y 500 nm.

7.4. Efecto de iones metálicos Cu(II) y Zn(II) en el desplegamiento y agregación de gammas cristalinas humanas.

Durante el trabajo de maestría se observó que bajas concentraciones tanto de Cu(II) como de Zn(II) inducen la agregación de la HyD cristalina. Durante el doctorado continuamos re-analizando nuestros resultados, obteniendo nuevos hallazgos que se describirán a continuación.

7.4.1. Cinética de agregación de HyD cristalina por turbidimetría.

Con el objetivo de conocer el efecto de los iones metálicos en la agregación de la HyD cristalina se realizaron cinéticas de agregación por turbidimetría en ausencia y presencia de iones metálicos. En dichas cinéticas se siguió la absorbancia a 405 nm de una muestra de HyD cristalina a 37°C por 12 h.

En ausencia de iones metálicos, la proteína mostró valores cercanos a cero de turbidez durante toda la cinética, lo que indica que la proteína se mantiene soluble durante el tiempo del experimento.

Por su parte, tanto la presencia de 1.5 equivalentes de Zn(II) o de Cu(II) produjo un incremento de la turbidez, lo que indica la formación de agregados de la HyD cristalina en función del tiempo (Figura 19). La presencia de Cu(II) provocó un aumento de la turbidez pero esta presentó varias fases, la primera de ellas, una fase estacionaria durante los primeros 50 minutos seguida de una fase de rápido incremento de la turbidez con una velocidad de $13.7 \times 10^{-4} \pm 5.5 \times 10^{-5}$ por min que duró los siguientes 80 min de la cinética (Figura 19A). Posterior a los 130 min se observó una disminución en el crecimiento de la turbidez a 405 nm (Figura 19 B). Esto se debe a la precipitación de los agregados. Por otro lado, la adición de 1.5eq de Zn(II) provocó un incremento inmediato de la turbidez en la muestra durante los primeros 280 minutos con una velocidad de $11.67 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-5}$ min. Posterior a los 280 min se observó una disminución en la turbidez de la muestra (Figura 19 C y D). Al igual que en el Cu(II) esta disminución se debe a la precipitación de los agregados de proteína.

A pesar de que ambos metales provocaron un aumento de la turbidez de la proteína, la cinética agregación así como el estado final fueron diferentes. Esto es un indicativo de que ambos metales inducen la agregación de la HyD cristalina por mecanismos diferentes.

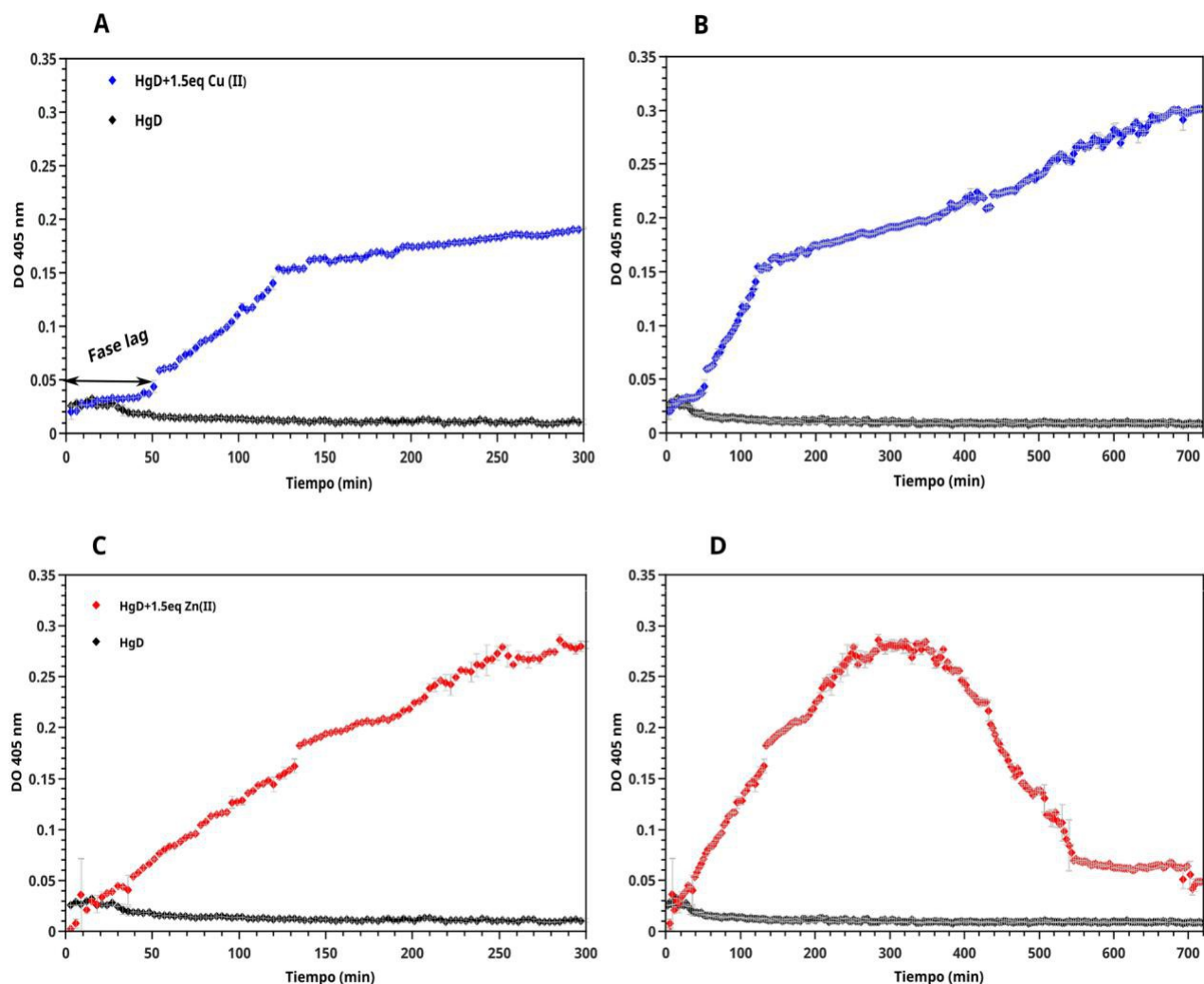


Figura 19: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HyD cristalina en ausencia (negro) y presencia de 1.5eq de Cu(II) (azul) y Zn(II) (rojo). La concentración de proteína fue de 50 μ M. A y C muestran los primeros 300 min de cinética para la proteína en presencia de Cu(II) y Zn(II) respectivamente. B y D muestran las 12 horas de cinética para la proteína en presencia de Cu(II) y Zn(II) respectivamente. La flecha negra señala la fase estacionaria observada en presencia de Cu(II).

7.4.2. Cinética de agregación de HyS cristalina por turbidimetría.

Con el objetivo de estudiar el efecto de ambos iones metálicos en la agregación de 50 μ M de HyS cristalina durante tiempos largos se realizaron ensayos de turbidimetría en ausencia y presencia de 1.5eq Cu(II) y Zn(II) por 12 horas. En el inserto de la figura 20 se muestra la cinética en ausencia y presencia de 1.5 eq. de Cu(II).

Para el caso del control de la HyS en ausencia de metal (Inserto, negro) se observa como la turbidez a 405 nm no aumentó a largo del experimento. Estos resultados sugieren que en este tiempo la proteína no forma agregados que impidan el paso del haz de luz. La inspección visual de la muestra mostró una solución completamente transparente al finalizar la cinética. En el caso de la cinética en presencia de 1.5eq Cu(II) (azul) se observa un aumento sigmoide de la turbidez en los primeros 50 min.

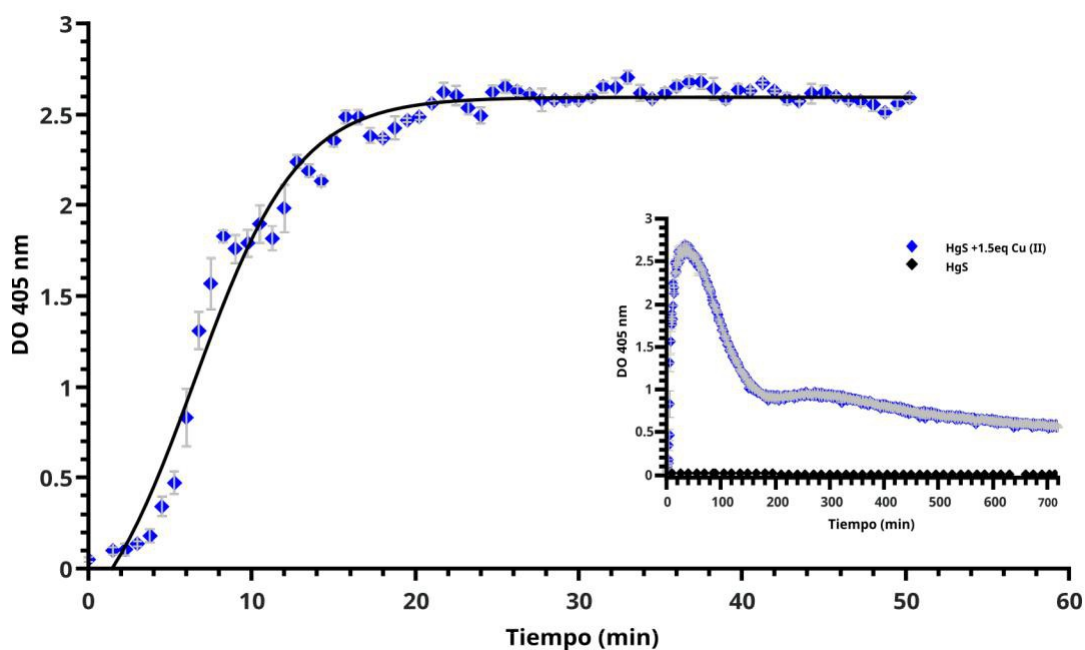


Figura 20: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HyS en ausencia presencia de 1.5eq de Cu(II) en sus primeros 50 minutos. Los datos se ajustaron a una seigmoide. La concentración de proteína fue de 1mg/mL. En el inserto se muestra la cinética completa en ausencia y presencia de 1.5eq de Cu(II) (azul).

Este aumento de la turbidez es indicativo de la formación de agregados de gran tamaño que dispersan la luz. Posterior a los 50 min se observa una disminución en la turbidez hasta valores de 1, esto puede deberse a la precipitación de los agregados de mayor tamaño. Sin embargo una turbidez de 1 es un valor bastante elevado, lo que indica que si bien parte de los agregados precipitan otros se mantienen en suspensión (Figura 20 inserto). La inspección visual de la muestra al final de la cinética permitió observar la presencia de agregados blancos en suspensión y precipitados en la muestra. Estos resultados indican que las concentración de Cu(II) empleada induce la agregación de la HyS.

Interesantemente, el análisis de los primeros 50 min. de la cinética (Figura 20), muestra la presencia de una fase estacionaria corta. La presencia de esta fase podría ser indicativo de que la primera etapa incluye cambios conformacionales en la proteína y formación de intermediarios a partir de los cuales comienza la agregación. El ajuste de los datos a una sigmoide reveló que el tiempo medio de formación de los agregados fue de 6.47 ± 0.5 min. Estos tiempos son menores que los obtenidos para la HyD cristalina humana, lo que indica que el proceso de formación de agregados para la HyS cristalina ocurre mucho más rápido. Para el caso de Zn(II), debido a problemas técnicos no contamos con la cinética completa, no obstante tenemos algunos datos que nos proporcionan información al respecto del proceso. En primer lugar el valor de turbidez en la muestra antes de adicionar los 1.5eq de Zn(II) fue de 1.1×10^{-3} . Este valor de turbidez es indicativo de que antes de la adición del metal la solución de proteína no presentaba agregados que impidieran el paso del haz de luz. Una vez añadidos los 1.5eq de Zn(II) y transcurrida la primera hora de cinética el valor de turbidez obtenido fue de 2.48. Estos altos valores de turbidez son indicativos de la formación de agregados de gran tamaño que aumentan la opacidad de la muestra. Estos resultados indican que el proceso de agregación inducido por el Zn(II) ocurre en menos de una hora. La inspección visual de la cubeta permitió observar una solución completamente turbia pero sin presencia de agregados precipitados. La carencia de precipitados en este caso puede ser por el tiempo de duración del experimento. No obstante, la formación de agregados de la HyS cristalina inducidos por Cu(II) y Zn(II) ocurre a mayor velocidad que para la HyD cristalina. Los resultados obtenidos por turbidimetría muestran que ambos iones metálicos inducen la formación de agregados de gran tamaño que se forman desde los primeros minutos de la cinética y aumentan la opacidad de la solución de proteína.

7.4.3. Cinética de agregación de HyD cristalina por dispersión dinámica de luz.

Con el objetivo de conocer el tamaño de los agregados de HyD inducidos por su interacción con iones metálicos se empleó DLS. Empleando el software HYDROPRO (Ortega et al. 2011) se calculó el radio hidrodinámico así como el coeficiente de difusión teóricos empleando las coordenadas cristalográficas (PDB: 1HK0). Los valores obtenidos para estos parámetros fueron $R_H = 2.19$ nm and $D = 1.122 \times 10^{-7}$ cm²/s para el monómero y $R_H = 3$ nm and $D = 0.81 \times 10^{-7}$ cm²/s para un dímero.

En las mediciones puntuales realizadas a la HyD, la curva de correlación obtenida es consistente con una muestra polidispersa, con dos especies fundamentales. La especie más abundante, con el 80% de la señal tiene un coeficiente de difusión de $D=1.06 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ el cual se corresponde con un radio hidrodinámico de 2.3 nm. La segunda especie presenta radio hidrodinámico de 75 nm y constituye el 16% de la señal. Una vez transcurridas las 12 h del experimento, se mantienen las dos especies detectadas al inicio pero con porcentajes diferentes; 57% para el monómero y 41.5% para el oligómero (Figura 21). A pesar de la presencia de oligómeros en un porcentaje considerable en la muestra, ésta permaneció completamente transparente todo el tiempo del experimento, aspecto que se pudo comprobar por turbidimetría. Los resultados obtenidos sugieren que en las condiciones utilizadas, la HyD se encuentra mayormente en forma monomérica, sin embargo puede formar oligómeros que también están presentes en la muestra desde el inicio del experimento. Todos los ensayos de DLS se realizaron con muestras donde la especie mayoritaria (~80%) es la forma monomérica de la HyD cristalina.

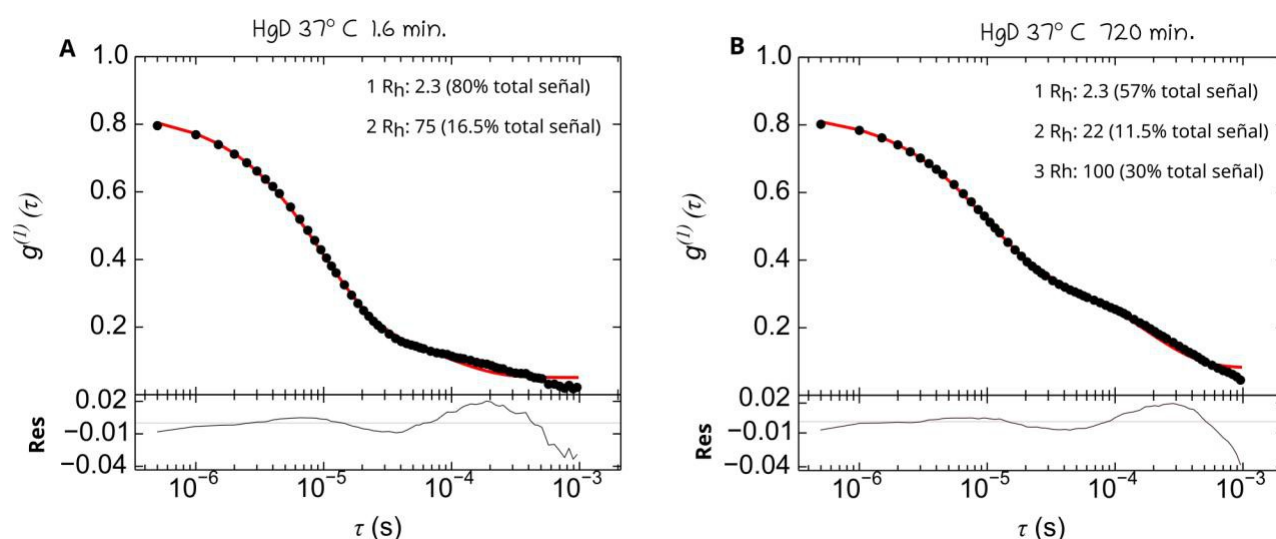


Figura 21: Curvas de correlación del punto inicial y final de la cinética de HyD cristalina en ausencia de iones metálicos. En rojo se muestra el ajuste de los datos a un modelo de distribución. En el panel inferior se muestra el residual entre los datos originales y el ajuste.

La curva de correlación de la cinética de agregación de HyD en presencia de 1.5 eq de Zn(II) (Figura 22A), muestra un corrimiento hacia la derecha, lo que es indicativo de un aumento en el radio hidrodinámico producto de la formación de oligómeros de gran tamaño. El porcentaje de la señal

correspondiente a la especie monomérica cambió drásticamente, de 84.7% a menos del 10% en la primera medición luego de la adición del del ión metálico. En correspondencia la señal del oligómero aumentó de 11.6% a más de 88%. El radio hidrodinámico de los oligómeros aumentó rápidamente, alcanzando valores de 800 nm antes de los primeros 70 min. del experimento, con una tasa de crecimiento de 12.4 ± 0.16 por minuto. Esta tasa concuerda con los resultados obtenidos por turbidez, lo que nos permite inferir que el aumento de la turbidez en la muestra se debe a la formación de oligómeros de gran tamaño. Posterior a los 80 min. los datos muestran un aumento de la dispersión; esto puede relacionarse con la precipitación de los agregados y al elevado grado de polidispersión de la muestra. El valor máximo de radio hidrodinámico de los agregados fue 1,650 nm mientras que el tamaño promedio fue de 650 nm.

El efecto del Cu(II) es un tanto diferente al del Zn(II); en la primera medición una vez añadido el metal (figura 22B), la curva de correlación es muy similar a la obtenida en ausencia de este. En las siguientes mediciones, se observa un ligero incremento del radio hidrodinámico de 2.2 a 2.7 nm, mientras que el porcentaje de la señal correspondiente al monómero muestra una disminución gradual hasta menos del 10% a los 100 min (Figura 22C). La señal correspondiente al oligómero mostró la tendencia opuesta, con un incremento gradual del porcentaje de la señal hasta más del 90% de la señal y un aumento del radio hidrodinámico hasta 500 nm durante los primeros 100 minutos. Posterior a los 300 minutos se observa un aumento considerable de la dispersión por la precipitación de agregados.

Todos los resultados anteriores confirman que ambos metales inducen la formación de agregados de gran tamaño que dispersan la luz visible. Sin embargo, la formación de estos agregados parece tener lugar por mecanismos diferentes.

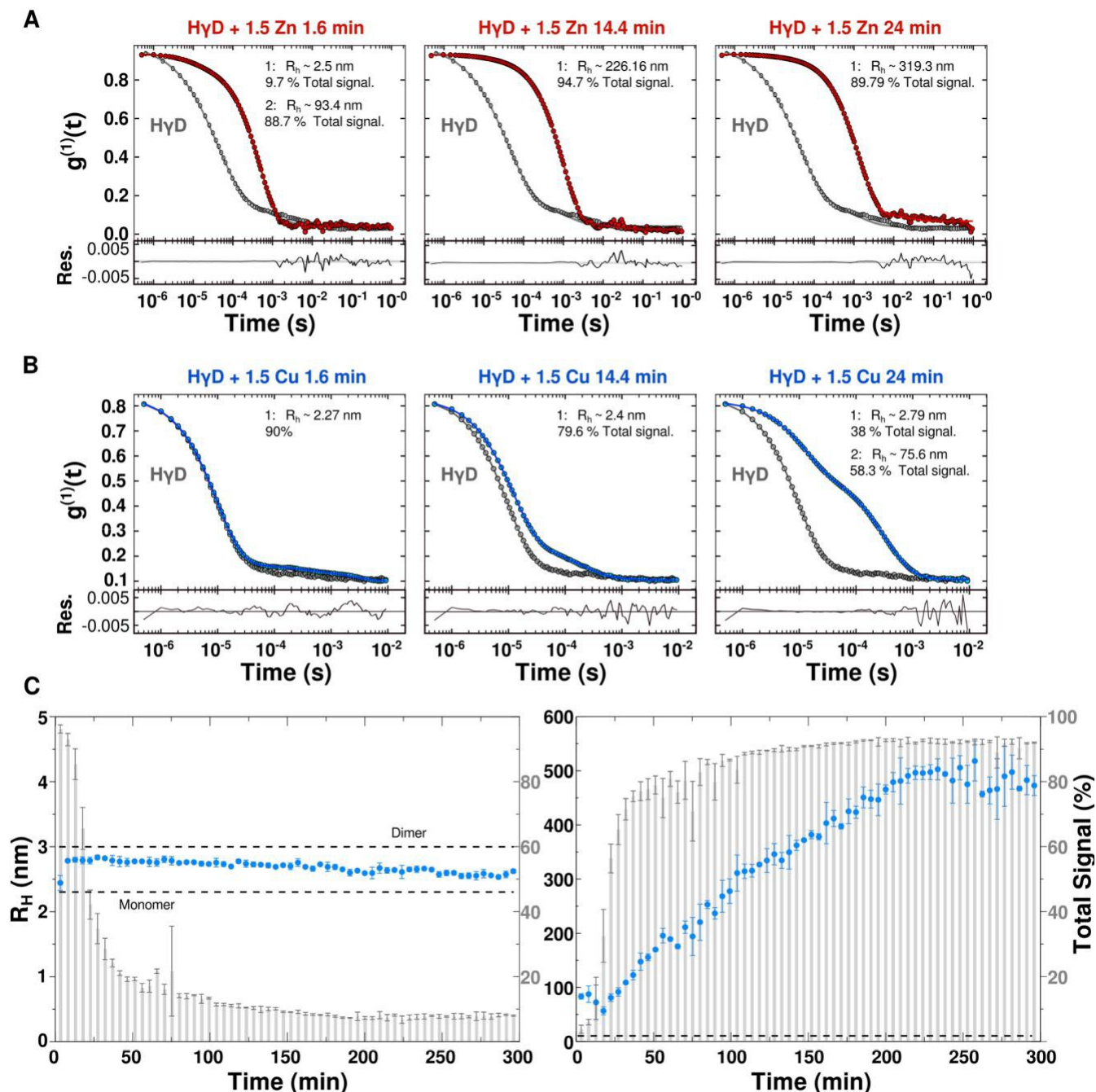


Figura 22: Curva de correlación de HyD cristalina en ausencia y presencia de Cu(II) y Zn(II) durante la cinética de agregación seguida por DLS. A: Curvas de correlación de la HyD en ausencia (gris) y presencia (rojo) de Zn(II) a diferentes tiempos. B: Curvas de correlación de la HyD en ausencia (gris) y presencia (azul) de Cu(II) a diferentes tiempos. C: R_h vs tiempo para las dos principales señales, monómero (izquierda) y oligómero (derecha) de HyD cristalina en presencia de Cu(II). Los puntos azules muestran el radio hidrodinámico y las barras representan el porcentaje de la señal que corresponde a dicho radio.

7.4.4. Cinética de agregación de HyS cristalina por dispersión dinámica de luz.

Con el objetivo de conocer el tamaño de los agregados de HyS inducidos por los iones metálicos realizamos cinéticas en las mismas condiciones de las cinéticas de turbidez perose siguieron por DLS. Al igual que para la HyD se calculó el radio hidrodinámico así como el coeficiente de difusión teóricos empleando el software HYDROPRO, con el uso de las coordenadas obtenidas por resonancia magnética nuclear (PDB: 2M3T). Los valores obtenidos para estos parámetros fueron $R_H = 2.43 \text{ nm}$ and $D = 1.005 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Esta técnica nos permite conocer la difusión de las moléculas presentes en una solución y a partir de esto se puede saber el radio hidrodinámico de dichas moléculas, en nuestro caso particular de las proteínas. En tal sentido primeramente realizamos mediciones puntuales de la HyS, para conocer el radio hidrodinámico en su forma monomérica. Las curvas de correlación obtenidas fueron las típicas de muestras polidispersas, con presencia de proteína en varios estados oligoméricos; el mayor porcentaje de la señal correspondió a un valor de radio hidrodinámico de 2.33 nm. Este valor de radio de corresponde con el radio esperado para una molécula con el peso molecular de la HyS cristalina. En la figura 23 se observa la curva de correlación obtenida en dicho ensayo. En esta curva se puede apreciar que la pérdida de la correlación ocurre rápidamente, lo que es un indicativo de la presencia de moléculas pequeñas, en este caso la forma monomérica de la proteína, mientras que el segundo hombro se debe a la presencia de oligómeros de mayor tamaño en la muestra. Por otro lado, por el tiempo en el cual la curva llega a valores de cero, podemos sugerir la presencia de oligómeros de mayor tamaño.

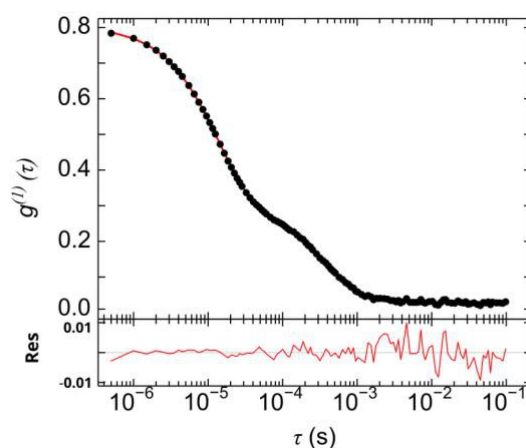


Figura 23: Curva de correlación de HYS cristalina. Los datos fueron ajustados a un modelo de distribución que asume la presencia de varias poblaciones de proteína. En el panel inferior se muestra el residual entre el ajuste realizado a los datos y los datos originales.

El análisis de la curva de correlación empleando un modelo de distribución, nos permitió discernir que el 79% de la señal corresponde a la forma monómerica de la HYS Rh: 2.33 nm mientras que el 20% corresponde a oligómeros con Rh: ~50 nm. Para el caso de las cinéticas, como experimento control realizamos una cinética de agregación por dispersión dinámica de luz en ausencia de iones metálicos. (Figura 24). En la figura se muestran las curvas de correlación correspondientes al punto inicial y final de la cinética. De manera similar a la medición puntual, el análisis de la correlación del punto inicial muestra la presencia de proteína en distintos estados, el 80% de la señal se corresponde con la forma monómerica de la proteína (Rh: 2.33 nm) mientras que el 20% restante se corresponde con un oligómero de aproximadamente 50 nm de radio (Tabla 5). A las 12 horas, se mantienen las mismas dos señales, pero con porcentajes diferentes. En este sentido el porcentaje de la señal que corresponde a la forma monomérica disminuyó al 49% mientras que la forma oligomérica además de aumentar su radio (135 nm) aumentó su porcentaje hasta 48.9% (Tabla 5). Estos resultados indican que la proteína HYS cristalina es capaz al igual que la HYD de formar oligómeros de gran tamaño, sin embargo, la ausencia de turbidez en la muestra es un indicativo de que estos agregados permanecen solubles durante el tiempo del experimento.

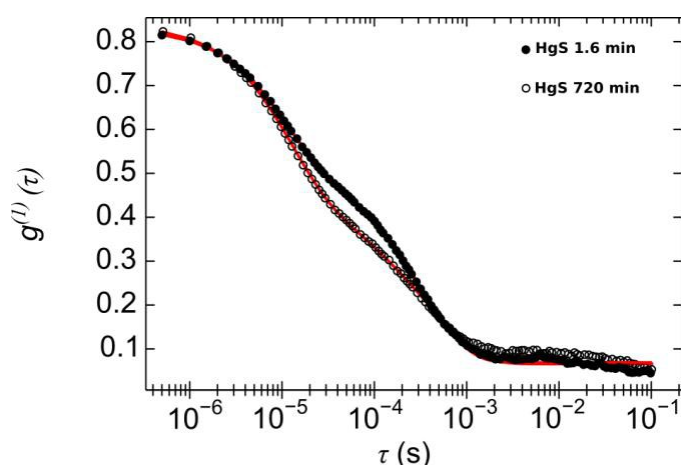


Tabla 5: Radio hidrodinámico de la H₂S cristalina en el punto inicial y final de la cinética de la proteína en ausencia de metales.

Proteína	1.6 min	720 min
H ₂ S	2.33 nm (80%)	2.33 nm (49%)
	49.3 nm (20%)	135 nm (48.9%)

Figura 24: Curva de correlación de H₂S en ausencia de iones metálicos en el punto inicial y final de la cinética de agregación por DLS. Con los círculos cerrados se muestra el punto inicial mientras que con los círculos abiertos se muestra el punto final. Las líneas rojas muestran el ajuste al modelo de distribución.

Por otra parte, en presencia de 1.5 eq. de Cu(II) desde la primera medición se obtuvieron valores de radio hidrodinámico muy grandes (Rh: 304 nm) (Figura 25), correspondientes con la presencia de agregados en la muestra. La curva de correlación de la medición correspondiente al minuto 1.6 (azul) de la cinética muestra un corrimiento hacia la derecha, lo que es un indicativo de la presencia de oligómeros de gran tamaño. Estos resultados indican que el Cu(II) induce la formación de agregados de gran tamaño desde los primeros minutos, en concordancia con los resultados obtenidos por turbidimetría. El análisis de la curva de correlación (Figura 25, azul) arrojó que aproximadamente 70% de la señal corresponde a agregados de 304 nm de radio hidrodinámico y el resto se corresponde con agregados de 600 nm (Tabla 6). La curva de correlación a las 12 h de cinética, que se muestra en rojo en la figura 25, también muestra un corrimiento considerable hacia la derecha. El ajuste a un modelo de distribución mostró que el 85% de la señal se corresponde con agregados de 980 nm de radio hidrodinámico (Tabla 6). Estos resultados confirman que el aumento de la turbidez en la muestra (Figura 20) se debe a la presencia de agregados de gran tamaño de la H₂S cristalina.

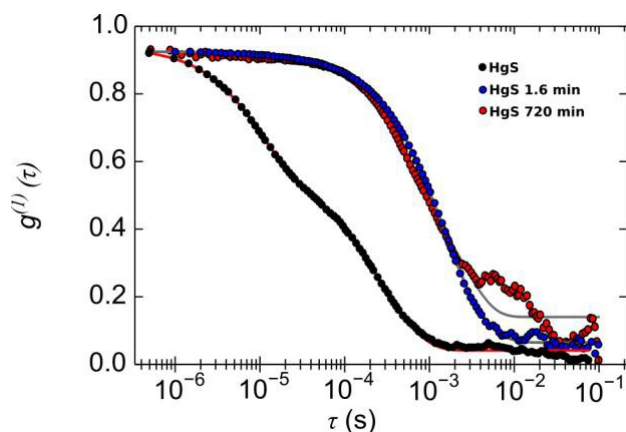


Tabla 6: Radio hidrodinámico de la HγS cristalina en el punto inicial y final de la cinética con 1.5eq Cu(II)

Proteína	1.6 min	720 min
HγS + 1.5eq Cu(II)	304 nm (71.3%) 635 nm (22.3%)	989 nm (94%)

Figura 25: Curva de correlación de HγS en ausencia de Cu(II) (negro) y presencia de 1.5eq Cu(II) a distintos tiempos de la cinética de agregación. En azul se muestra la curva de correlación al minuto 1.6 y en rojo al minuto 100.

Para el caso de los experimentos con 1.5eq Zn(II) se obtuvieron resultados muy similares. Desde la primera medición la curva de correlación es la típica de muestras polidispersas (Figura 26 azul). El análisis de esta curva de correlación mostró que 99% de la señal se corresponde con oligómeros de 435 nm de radio, mientras que el análisis de la curva de correlación del punto final de la cinética mostró que el 95% de la señal se corresponde con agregados de 1.6 micras de radio hidrodinámico (Tabla 7). Estos resultados muestran que la interacción de HγS con Zn(II) induce la formación de oligómeros que aumentan su tamaño con el paso del tiempo. Por otro lado, estos hallazgos corroboran que el aumento en la turbidimetría se debe a la formación de agregados de la HγS cristalina.

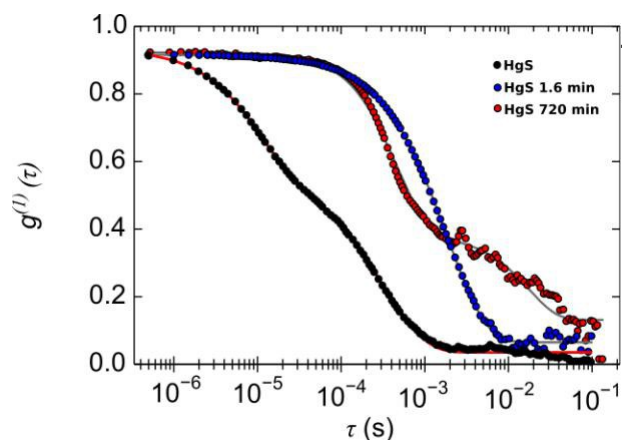


Tabla 7: Radio hidrodinámico de la HγS cristalina en el punto inicial y final de la cinética en presencia de 1.5eq Zn(II).

Proteína	1.6 min	720 min
HγS + 1.5eq Zn(II)	435 nm (99%)	1646 nm (95%)

Figura 26: Curva de correlación de HγS en ausencia de Zn(II) (negro) y presencia de Zn(II) a distintos tiempos de la cinética por dispersión dinámica de luz. En azul se muestra la curva de correlación en el punto inicial (1.6 min) y en rojo al minuto 720.

Los resultados obtenidos tanto por turbidez como por dispersión dinámica de luz indican que ambos iones metálicos inducen la agregación de la HyS cristalina. La formación de agregados ocurre bruscamente y se obtienen en ambos casos valores de turbidez y radios hidrodinámicos que indican la presencia de agregados de gran tamaño. En tal sentido, debido a la naturaleza de las mediciones de dispersión dinámica de luz, el cual es un experimento de baja resolución temporal, con las condiciones empleadas en nuestros ensayos podemos dar poca información de las primeras etapas del proceso.

7.4.5. Cambios conformacionales en la HyD inducidos por Cu(II) y Zn(II).

La espectroscopía de fluorescencia se empleó para detectar cambios en el ambiente local de los triptofanos. En este sentido el efecto de los iones metálicos en el grado de plegamiento de la HyD cristalina se siguió a través de la relación 350/325 nm durante las 12 horas del ensayo. La proteína en ausencia de iones metálicos mantuvo el máximo de emisión en 325 nm durante el tiempo del experimento. Además la relación 350/325 se mantuvo constante las 12 horas de ensayo. Estos resultados son un indicativo de que la proteína se mantiene plegada.

En presencia de 1.5 eq. de Zn(II) la relación IF(350/325) nm experimentó un pequeño aumento, variando de 0.63 a 0.68. Este cambio sugiere pequeñas variaciones en el ambiente químico de los triptofanos durante el proceso de formación de los agregados de proteína (Figura 27B).

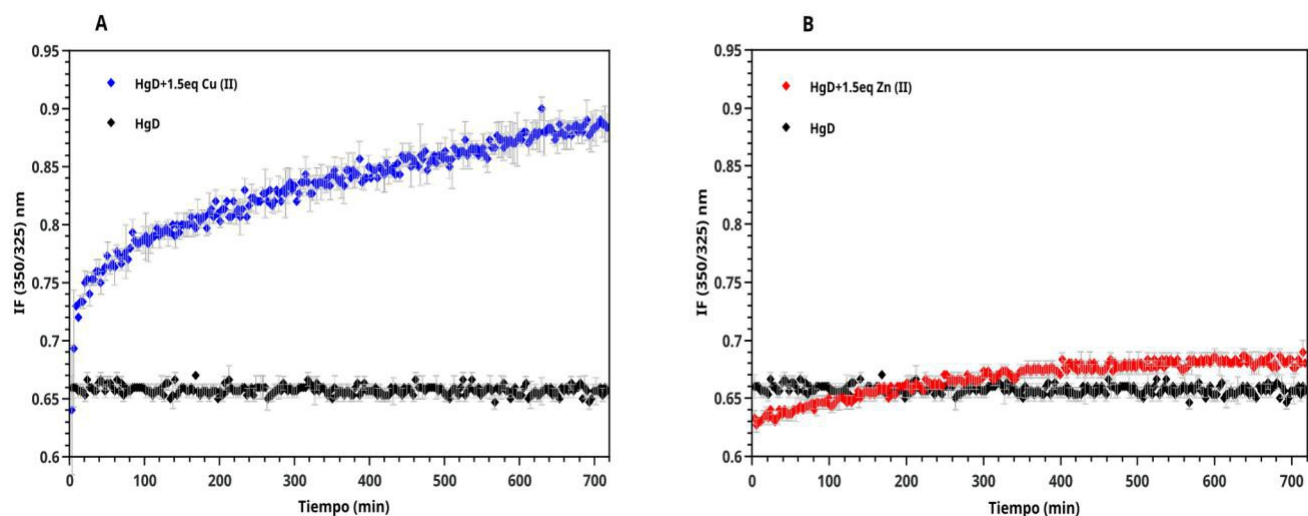


Figura 27: Relación de la intensidad de fluorescencia IF(350/325) nm de HyD con respecto al tiempo. En ausencia (negro) y presencia de 1.5 eq. de Cu(II) (azul) o 1.5 eq. de Zn(II) (rojo).

A diferencia del Zn(II), el Cu(II) provocó un corrimiento del máximo de emisión de fluorescencia de 325 nm a 330 nm, además la relación $IF(350/325)$ nm presentó un aumento de 0.65 hasta 0.89. Como se observa en la figura 27 el aumento en la relación tiene un comportamiento bi-fásico, una primera fase con un aumento inicial rápido seguida de una fase donde el aumento ocurrió más lentamente. Un aspecto interesante es el hecho de que la intersección entre ambas fases parecería coincidir con la fase estacionaria observada tanto por turbidimetría como por dispersión dinámica de luz. Los resultados obtenidos sugieren que el Cu(II) induce el desplegamiento parcial de la HyD cristalina.

7.4.6. Cambios conformacionales en la HyS cristalina inducidos por iones metálicos.

Con el objetivo de detectar cambios en el ambiente local de los triptofanos de la HyS cristalina, inducidos por los iones metálicos, empleamos la espectroscopia de fluorescencia ya que esta proteína al igual que HyD, presenta cuatro triptofanos conservados en las posiciones 47, 73, 137 y 163.

En este sentido se obtuvieron espectros de la proteína en ausencia y presencia de ambos iones metálicos durante 12 horas a 37°C. Para el caso de la proteína en ausencia de iones metálicos en la figura 28 se muestran los espectros a diferentes tiempos de la cinética, se observa en los paneles A y D que el máximo de emisión prácticamente no varió a lo largo de la cinética (325-326 nm). Además en la figura 29, se observa que el cociente $IF(350/325)$ no cambia durante las 12 horas del experimento. Estos resultados indican que el ambiente químico de los triptofanos no sufrió modificaciones durante el tiempo del experimento. Estos resultados sugieren que la proteína durante la cinética se mantiene plegada durante la cinética de agregación.

En presencia de 1.5 eq. de Zn(II) se observó un corrimiento del máximo de emisión de 325 a 332 nm durante los primeros 20 min de cinética. Estos resultados se pueden deber a que una pequeña población de proteína está desplegada completamente o a que una población de la proteína se encuentre parcialmente desplegada. Con las técnicas empleadas hasta el momento no podemos discernir ante cuál de estos escenarios nos encontramos. Por otro lado para el caso del Zn(II) se observó en el espectro de

los 4 min un aumento en la intensidad de fluorescencia (Figura 28 D); si tenemos en cuenta que en este momento de la cinética se observa un corrimiento del máximo a 330 nm, este aumento en la intensidad de fluorescencia puede deberse al desplegamiento parcial de la proteína. La figura 29 permite observar con más detalle este efecto, pues en tiempos cortos, el cociente aumenta hasta 0.85.

En presencia de 1.5 eq. de Cu(II) se obtuvieron algunas diferencias (Figura 28 E y F). En la figura se observa que a los 100 min. el espectro muestra un corrimiento en el máximo de emisión a 332 nm. Esto indica que el ambiente químico de los triptofanos cambió y se puede inferir que la proteína experimentó algún grado de desplegamiento. Este corrimiento en el máximo se mantuvo durante el resto de la cinética variando entre 332 y 335 nm. Estos resultados sugieren que el Cu(II) induce desplegamiento parcial de la HyS cristalina.

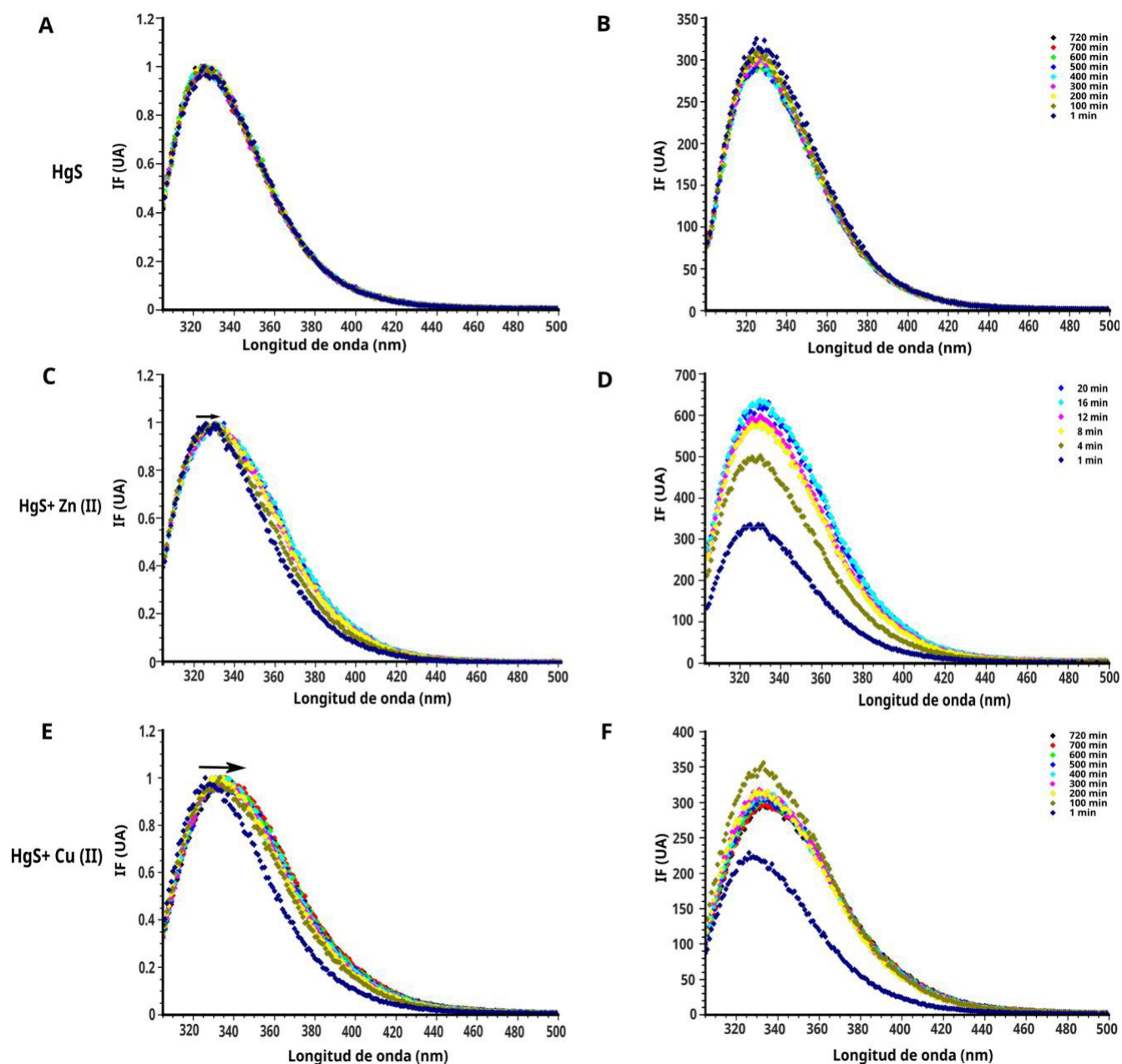


Figura 28: Espectro de fluorescencia de HyS cristalina a 37°C por 12 horas. Se representan los espectros cada 100 min. En la parte superior (A, B, C) se muestran los espectros normalizados y en la parte inferior los espectros no normalizados (D, E, F). A y D se corresponden con la proteína en ausencia de metal, B y E muestran la proteína en presencia de 1.5eq de Zn(II) mientras que C y F muestran los espectros de la proteína en presencia de 1.5eq de Cu(II).

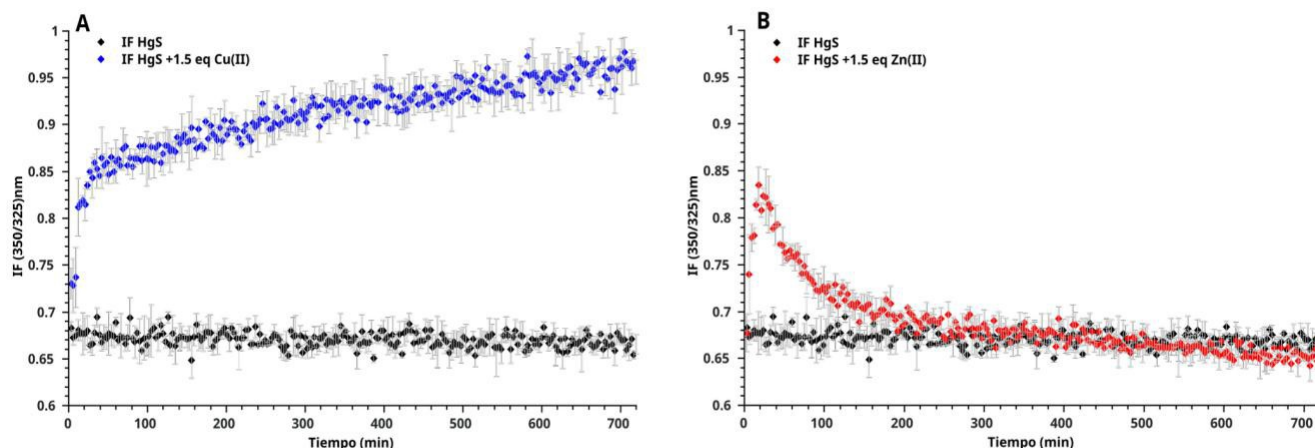


Figura 29: Relación de la intensidad de fluorescencia (350/325) nm con respecto al tiempo de HgS cristalina en ausencia (negro) y presencia de 1.5 eq de Cu(II) (azul) o 1.5 eq de Zn(II) (rojo).

Para las cristalinas, está muy bien descrito que la relación de intensidad de fluorescencia $IF(350/325)$ es un indicador de la fracción de proteína desplegada presente en la muestra (Kossinki *et al.* 2003; Flaugh *et al.*, 2005). En la figura 29 se observa el cociente para la HgS cristalina (negro) en ausencia de metal, puede observarse como esta relación se mantiene entre 0.6 y 0.7 durante las 12 horas del experimento. Esto sugiere que la proteína se mantiene plegada durante todo el tiempo de la cinética. En presencia de Cu(II) (Figura 29A) se observa un aumento de esta relación entre 0.73 y 0.98. Si tomamos en consideración que el valor de la relación $IF(350/325)$ cuando la proteína está completamente desplegada es 1.3 (Figura 18), podemos sugerir que el Cu(II) induce el desplegamiento parcial de la proteína. Un aspecto importante, como se ha mencionado antes, es la velocidad del proceso; como se puede observar en la figura 29, durante los primeros 20 min de la cinética el valor de la relación $IF(350/325)$ aumentó hasta 0.87, lo que sugiere que los primeros eventos de desplegamiento inducidos por el Cu(II) ocurren prácticamente de manera inmediata.

8. Discusión de resultados del efecto de iones metálicos en el desplegamiento y agregación de gamma cristalinas humanas.

Los daños que sufren las cristalinas por diferentes factores a lo largo de la vida de una persona, se van acumulando lentamente en el lente ocular; hasta que superan los mecanismos con que cuenta esta estructura para contener con proteínas dañadas. A partir de este punto se comienzan a desarrollar las cataratas. Entre los factores de riesgo que se han asociado con el desarrollo de esta patología se encuentran los iones metálicos. En trabajos anteriores ya se ha informado que tanto el Cu(II) como el Zn(II) inducen la agregación de la HyD cristalina con un efecto dependiente de la concentración. Con el objetivo de tener información de la agregación inducida por los metales, seguimos el proceso durante tiempos largos y con la menor concentración de metal que afectara la proteína. Para esto empleamos varias técnicas espectroscópicas como la fluorescencia y la dispersión dinámica de luz.

Para la HyD los resultados obtenidos por turbidimetría indican que 1.5eq de ambos iones metálicos inducen la turbidez de la proteína, mientras que en ausencia de estos la solución permaneció transparente durante todo el tiempo del experimento (12 horas). Por otro lado, los resultados de DLS mostraron la formación de agregados de proteína de gran tamaño en presencia de ambos iones metálicos. Un aspecto interesante en este sentido, es que la velocidad de agregación obtenida por ambas técnicas se correlacionan muy bien, lo que es un indicativo de que la turbidez obtenida es producto de la formación de agregados de la HyD cristalina. Con el paso del tiempo se observó una disminución tanto en la turbidez como en el radio hidrodinámico, debido a la precipitación de los agregados.

El análisis de los resultados de DLS indica que ambos metales inducen la formación de grandes agregados (Figura 22). Estos agregados con el paso del tiempo aumentan tanto en tamaño como en porcentaje de la señal de DLS, mientras que la señal correspondiente al monómero de forma contraria va disminuyendo durante la cinética llegando a ser menos del 10%.

Si bien ambos metales inducen la agregación de la HyD cristalina, los resultados indican que el mecanismo es diferente. En la primera medición posterior a la adición de Zn(II), el radio hidrodinámico indica la presencia de oligómeros de HyD (Figura 22A). Estos resultados indican que el Zn(II) induce la rápida formación de oligómeros solubles, y que estos van aumentando de tamaño llegando a los 400 nm en los primeros 80 min. Posterior a este tiempo, se observa un aumento considerable en la dispersión debido a la presencia de precipitados. Los cambios conformacionales sufridos por la proteína durante el proceso de agregación fueron detectados por fluorescencia. Esta técnica, a diferencia de la dispersión dinámica de luz, es independiente del tamaño de las moléculas presentes en la muestra. En este caso, la señal de fluorescencia depende únicamente del ambiente químico que rodee a los fluoróforos, triptofanos en este caso. El seguimiento de la relación $IF(350/325)$ en función del tiempo en presencia de Zn(II) mostró un ligero aumento que nos permite sugerir que durante el tiempo del experimento ocurren re-arreglos conformacionales en la proteína para la formación de los agregados. Estos resultados pueden corroborarse con los resultados obtenidos por el Dr. Carlos Amero y Dra. Lina Rivillas con resonancia magnética nuclear. Con el empleo de esta técnica se observó que durante las 12 h no aparecieron señales en la región desplegada del espectro de HSQC de la proteína. Por otro lado los cambios de intensidad en las señales no estuvieron circunscritas a una zona particular de la proteína sino que se distribuyeron a lo largo de los dos dominios (Fernández-Silva *et al.* 2020).

Estos resultados nos permiten proponer que la formación de los agregados de HyD cristalina en presencia de Zn(II) no involucra eventos de desplegamiento, más bien ocurren cambios conformacionales pequeños que involucran a los triptofanos y a partir de la proteína plegada se forman los agregados. El hecho de que la proteína no necesite desplegarse para formar los agregados hace que el proceso de agregación sea más rápido como ya observamos por DLS y turbidimetría. Por otro lado otros autores han propuesto que la agregación de la proteína en presencia de Zn(II) tiene lugar a través de la formación de puentes metálicos debido a que la agregación es suprimida por agentes quelantes como el EDTA (Domínguez-Calva *et al.* 2018a).

Para el caso de la cinética en presencia de Cu(II) la primera medición de DLS mostró una curva de correlación muy similar a la de la proteína en ausencia del metal. El análisis de esta curva mostró que la forma monomérica de la proteína constituía el mayor porcentaje de la señal. Las siguientes mediciones

mostraron un aumento ligero del radio hidrodinámico de 2.4 a 2.7 nm. Teniendo en consideración que el radio teórico obtenido para el monómero de la proteína fue de 2.19 nm y para un posible dímero de 3 nm (Figura 22C), este aumento del radio hidrodinámico puede corresponderse con la formación de intermediarios parcialmente desplegados. Posterior a los 80 min esta población representa menos del 10% de la señal y solo se observan los agregados. Los resultados obtenidos por turbidimetría muestran un comportamiento sigmoide con una fase lag de 50 min lo que sugiere la ocurrencia de dos procesos durante la agregación (Figura 19 A). Por otro lado la relación $IF(350/325)$ en presencia de Cu(II) mostró un aumento en el tiempo que corrobora la hipótesis de la presencia de intermediarios parcialmente desplegados (Figura 29A).

Los resultados obtenidos por todas las técnicas demuestran que a pesar de que ambos metales inducen la agregación de la HyD cristalina en el tiempo, el mecanismo empleado es diferente. En tal sentido, a partir de los resultados obtenidos podemos proponer un modelo de agregación para ambos iones metálicos (Figura 30). En el caso del Zn(II), este promueve modificaciones en los triptofanos que pudieran ser necesarias para la formación de los agregados, sin embargo estos se forman a partir de proteína plegada. La formación de estos agregados provoca el aumento de la opacidad de la solución de proteína en el tiempo. Por su parte, el Cu(II), primeramente induce el desplegamiento parcial de la HyD cristalina y a partir de estos intermediarios parcialmente desplegados se forman oligómeros y posteriormente agregados de gran tamaño que aumentan la opacidad de la solución de proteína (Figura 30 parte inferior).

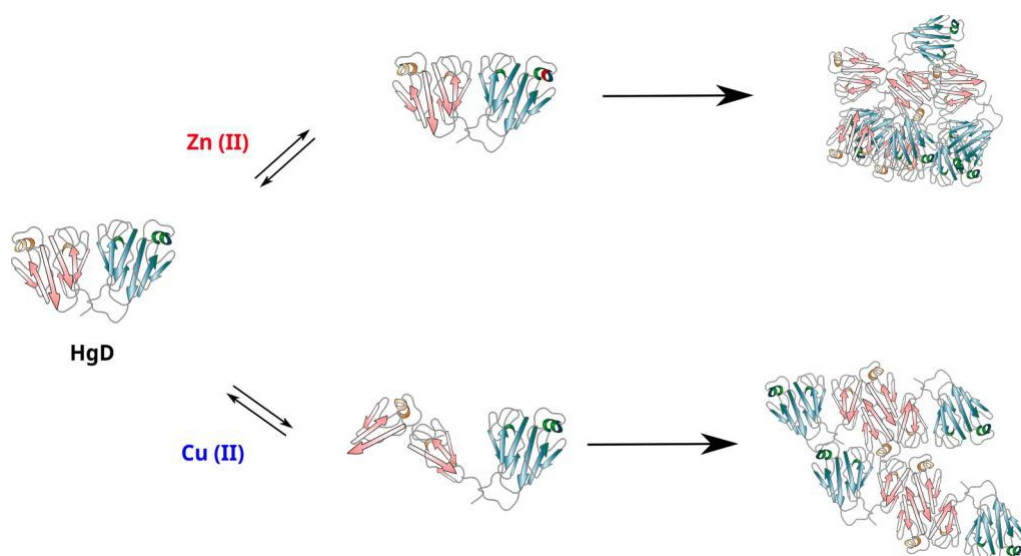


Figura 30: Modelos de agregación de la HyD cristalina inducidos por Cu(II) y Zn(II).

Para el caso de la HyS cristalina los resultados obtenidos presentaron algunas diferencias. Los resultados obtenidos por turbidimetría demostraron que ambos metales inducen la agregación de la proteína y que el proceso de inducción de la agregación tiene lugar súbitamente (Figura 20), mostrando valores de turbidez a 405 nm superiores a 1 en los primeros 20 minutos de la cinética. Para el caso de la HyD sin embargo, empleando las mismas condiciones en los ensayos no se obtuvieron valores de turbidez superiores a 0.3. Esto es un indicativo de que tanto el Cu(II), como el Zn(II) inducen la formación de especies que dispersan la luz en mayor cuantía para la HyS cristalina que para la HyD. En ese mismo sentido la disminución de la turbidez asociado a la precipitación de agregados se observó en ambas proteínas en presencia de los iones metálicos. Sin embargo para la HyS, debido a que el proceso es mucho más rápido este comportamiento comenzó a partir de los 20 min mientras que para la HyD solo después de los 300 min. El análisis más detallado de los primeros 50 minutos de la cinética de la HyS cristalina en presencia de Cu(II) mostró la presencia de una fase estacionaria corta, seguida por un aumento rápido de la turbidez, con un tiempo medio de formación de agregados de 6.5 min. Esta fase estacionaria también se describió para el caso de la HyD, sin embargo, su duración fue mucho mayor.

Esto pudiera ser indicativo de que las primeras modificaciones inducidas por el Cu(II) en ambas proteínas son similares, aunque como ya se ha mencionado anteriormente la velocidad del proceso es mayor para HyS cristalina.

Por otro lado, con el objetivo de corroborar el efecto la concentración de metal en la agregación de la proteína, realizamos ensayos con 15eq de ambos iones metálicos. Los resultados obtenidos por turbidimetría con estas concentraciones, en el caso del Cu(II) mostraron un comportamiento muy similar en la tendencia de los datos (Figura 6, anexo 1) a los resultados obtenidos con 1.5eq, obteniendo sin embargo mayores valores de turbidez. Además el ajuste de los primeros 20 min de la cinética nos permitió obtener el tiempo medio de formación de los agregados y este disminuyó a la mitad (3.5 min). Estos resultados corroboran que tal como se ha informado antes (Quintanar *et al.* 2015), el efecto del metal es dependiente de la concentración empleada. Sin embargo resulta muy interesante que con una diferencia tan grande en concentración de metal el comportamiento descrito por turbidez sea tan similar. Asumiendo que el Cu(II) presenta diferentes sitios de unión en la proteína, estos resultados indicarían que la única diferencia entre ambas concentraciones de metales es la velocidad a la cual estos diferentes sitios de unión se saturan. Es decir, el aumento de la concentración de Cu(II) provoca la rápida saturación de los sitios de unión que tienen un papel importante en la inducción de la agregación.

Para el caso los experimentos con 15eq de Zn(II), se obtuvo una tendencia similar a la obtenida para el Cu(II), con un aumento casi inmediato de la turbidez obteniendo valores de tres durante los primeros 30 min de cinética seguido de una disminución debido a la precipitación de un por ciento de los agregados. El tiempo medio de formación de los agregados fue aproximadamente 7 min, tiempo mayor al obtenido con 15eq Cu(II), lo que nos permite sugerir que la agregación con Zn(II) ocurre más lentamente.

Los resultados de dispersión dinámica de luz en presencia de 1.5eq de iones metálicos corroboraron los resultados obtenidos por turbidimetría. En presencia de Cu(II) la primera medición mostró una curva de

correlación que revela la presencia de agregados de radios hidrodinámicos superiores a los 304 nm, mientras que para la HyD estos tamaños de agregados se observaron luego de los 35 min de cinética. A diferencia de los resultados obtenidos en la HyD, en las condiciones utilizadas, no se pudo identificar por DLS la presencia de intermediarios parcialmente plegados para la HyS cristalina. Esto puede deberse a que la velocidad de formación de agregados para esta última es muy superior y con las condiciones empleadas no logramos tener información de los primeros seis minutos del proceso. Tomando en consideración que el tiempo medio de formación de los agregados obtenido por turbidez es de 6.47 min (Figura 20), al realizar la primera medición por dispersión dinámica de luz ya estamos en la fase de crecimiento de la turbidez y en consecuencia detectamos mayormente la presencia de agregados de gran tamaño. El aumento de las concentraciones de Cu (15eq) provocó la formación de agregados de 545 nm desde la primera medición. Por otro lado durante los primeros 100 min de la cinética se observó un aumento del radio hidrodinámico de los agregados, obteniendo radios de 1782 nm. A partir de este tiempo la precipitación de los agregados presentes en la muestra provocó que las curvas de correlación mostraran un nivel importante de ruido, lo que imposibilita su análisis así como el ajuste de los datos a cualquier modelo. Para la HyD sin embargo a pesar de la presencia de agregados, el hecho de que estos se mantuvieran en suspensión durante toda la cinética permitió conocer el tamaño de los agregados durante todo el tiempo del experimento (12 horas).

Para el caso de la adición de 1.5eq Zn(II), igual que para el caso del Cu(II) desde la primera medición de DLS se obtuvieron agregados de gran tamaño (400 nm), valores mayores que los obtenidos para la HyD cristalina en tiempos similares del experimento. Con el paso del tiempo el radio hidrodinámico siguió aumentando hasta valores de 1.6 micras a los 720 minutos. El aumento de las concentraciones de Zn(II) permitió obtener valores de radio hidrodinámico mayores a dos micras luego de las 12h de cinética. A diferencia del Cu(II), las curvas de correlación no mostraron tanto nivel de ruido hasta tiempos posteriores a las 11 h de cinética. Esto puede deberse a que, en este caso, la precipitación de los agregados haya tenido lugar más lentamente. Estos resultados reafirman que el efecto de los iones metálicos es dependiente de la concentración. Por otro lado también indican que los valores de turbidez obtenidos se deben a la formación de agregados de la HyS cristalina.

Los resultados obtenidos por turbidimetría y dispersión dinámica de luz nos permiten concluir que la presencia de 1.5eq Cu(II) en la solución de HyS cristalina induce la formación de agregados de gran tamaño, incluso mayores a los agregados reportados para la HyD. Por otro lado, los primeros eventos inducidos por este metal para provocar la agregación parecen ser similares en ambas proteínas y pudieran involucrar eventos de desplegamiento, sin embargo la diferencia fundamental radica en la velocidad del proceso. Ambas técnicas tienen la peculiaridad de que su sensibilidad está dirigida mayormente a partículas de gran tamaño; en el caso de la turbidez, esta solo aumenta cuando se forman agregados lo suficientemente grandes como para impedir el paso de la luz. La DLS sin embargo, es capaz de detectar la presencia de la proteína desde su forma monomérica y soluble; no obstante, el hecho de que las partículas más grandes dispersen más la luz provoca que estas sean siempre las más visibles. De esta forma con estas técnicas solo podemos tener información de los agregados inducidos por iones metálicos pero no de la conformación de la proteína en estos agregados.

La espectroscopía de fluorescencia, por su parte, nos permite tener información de las variaciones que tienen lugar en la vecindad de los residuos de triptofanos durante la cinética en ausencia y presencia de iones metálicos. A partir de esta información podemos inferir el estado de plegamiento de la proteína y aportar nueva información en función de cómo se forman los agregados. En este sentido, para las cristalinas la relación $IF(350/325)$ es una relación ampliamente empleada para tener información de la fracción de proteína desplegada. En el caso particular de la HyS cristalina, los experimentos de desplegamiento térmico mostraron que la relación $IF(350/325)$ oscila entre 0.6-0.7 cuando la proteína está plegada y esta relación aumenta a 1.3-1.4 cuando la proteína se despliega. La proteína en ausencia de metal mostró valores de $IF(350/325)$ entre 0.65-0.7 durante todo el tiempo del experimento, lo que indica que el ambiente químico de los triptofanos no cambió durante la cinética. La presencia de 1.5eq Cu(II) provocó un aumento de esta relación hasta 0.95 durante los primeros 20 minutos del experimento. Estos resultados son indicativos de que el ambiente químico de los triptofanos sufre un cambio por la presencia del Cu(II). Tomando en cuenta que el valor de esta relación cuando la proteína está completamente desplegada es 1.4, los valores obtenidos con Cu(II) indican que la HyS cristalina se encuentra parcialmente desplegada. Para el caso de la HyD cristalina los valores de esta relación en presencia de Cu(II) aumentaron hasta 0.88 y por RMN se comprobó que el dominio N-terminal se

desplegaba parcialmente (Fernández-Silva *et al.* 2020). Teniendo esto como antecedente y con nuestros resultados pudiéramos especular que el Cu(II) induce desplegamiento parcial o total del dominio N-terminal de la HγS cristalina. Por otro lado, la presencia de una pequeña fase lag en turbidimetría, reafirma la hipótesis del desplegamiento parcial de la proteína. De esta forma podemos proponer como modelo de agregación (Figura 31) que la unión de Cu(II) a la HγS cristalina promueve el desplegamiento parcial de esta en los primeros seis min y a partir de este intermediario parcialmente desplegado comienzan a formarse agregados de gran tamaño (20 min) que aumentan la turbidez u opacidad de la solución de proteína. Los agregados más grandes comienzan a precipitar mientras que otros se quedan en suspensión en la solución.

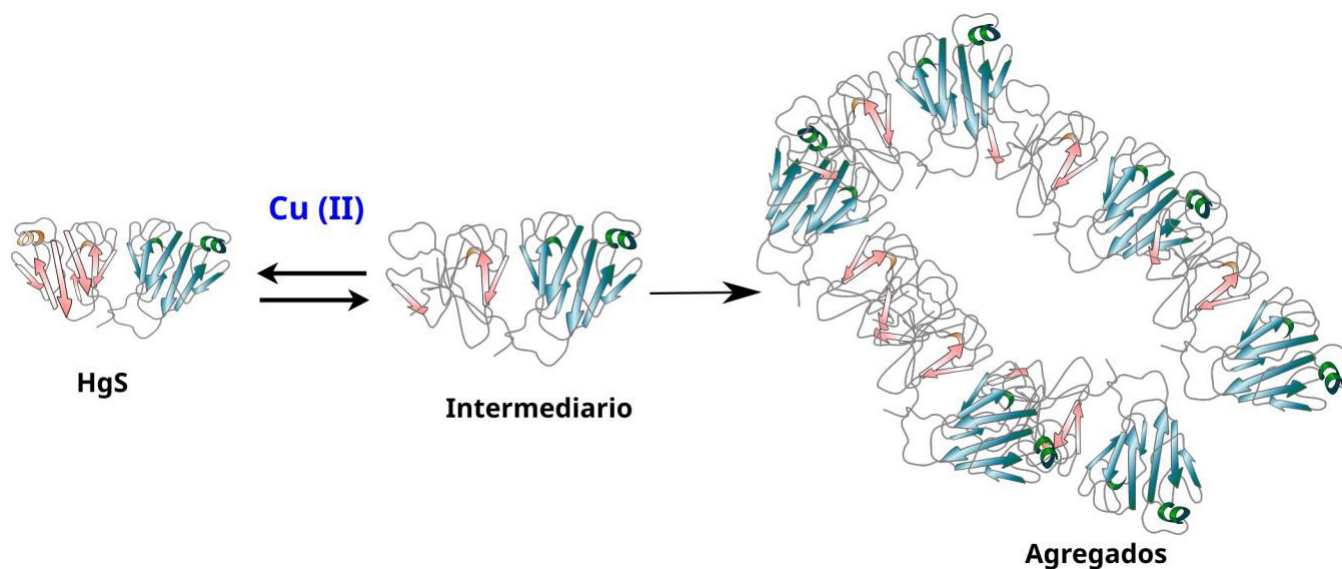


Figura 31: Modelo de agregación de la HγS cristalina inducido por Cu(II)

En el caso del Zn(II) los valores que IF(350/325) nm mostraron un aumento entre 0.67-0.84 durante los primeros 15 min de cinética. Esto es un indicativo de que el ambiente químico de los triptofanos cambió y puede deberse al desplegamiento parcial de la proteína. A partir de los 15 minutos se observó una disminución en esta relación hasta valores correspondientes con la proteína plegada. Esta disminución podría deberse a que durante la formación de agregados los triptofanos queden en un ambiente químico similar al que presentan en la proteína plegada. De esta forma según los resultados obtenidos podemos especular que el Zn(II) induce el desplegamiento parcial de uno de los dominios de

la HyS cristalina. Para el caso de la HyD cristalina se comprobó que la relación IF(350/325) nm en presencia de Zn(II) mostró poca variación y por RMN se observaron cambios pequeños en el ambiente químico de los triptofanos, sin obtenerse evidencias de desplegamiento de la proteína (Fernández-Silva *et al* 2020). Con el aumento de la concentración de Zn (15eq) se obtuvo un comportamiento similar al obtenido con 1.5eq (Figura 7, Anexo 1). Primeramente se vió un aumento de la relación IF(350/325) hasta valores de 0.93 durante los primeros 15 min, seguido por la disminución de dicha relación hasta valores de 0.83. Posterior a los 200 min se observó un incremento ligero de dicha relación hasta el final de la cinética. Este último aumento de la relación IF(350/325), pudiera explicarse como ya se dijo antes por la conformación de los agregados y es importante acotar que no se observó con 1.5eq Zn(II). Tomando en consideración los antecedentes que tenemos para la HyD cristalina y los resultados obtenidos para la HyS cristalina podemos proponer el siguiente modelo de agregación inducido por Zn(II) (Figura 32)

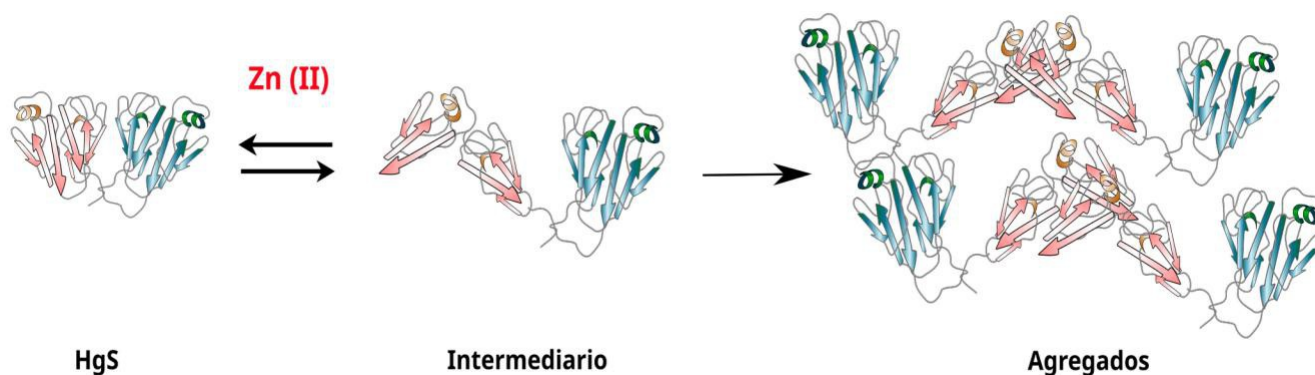


Figura 32: Modelo de agregación de la HyS cristalina inducido por Zn(II)

El Zn(II) induce el desplegamiento parcial de uno de los dominios de la HyS cristalina (5 min), a partir de este intermediario parcialmente desplegado se forman agregados de gran tamaño que producen un aumento brusco de la turbidez de la solución (20 min). Los agregados más grandes precipitan en la solución mientras que otros se mantienen en suspensión. Una vez formados los agregados, los triptofanos que se encuentran en el dominio parcialmente desplegado pueden quedar o no en un ambiente hidrofóbico similar al que tienen en el contexto de la proteína plegada.

En la literatura existen informes que muestran que 1 eq de Cu(II) y Zn(II) no inducen la agregación de la HyD cristalina (Quintanar *et al.* 2015), sin embargo, en estos trabajos no se siguen los experimentos por más de 120 min, además la concentración de proteína empleada es 10 veces menor a la empleada en nuestro trabajo. Por otro lado, asumiendo la presencia de múltiples sitios de unión al metal en la proteína, el aumento de 0.5 eq utilizado en nuestro trabajo puede estar favoreciendo la unión a un sitio particularmente importante para el desarrollo de la turbidez.

Para el caso de la HyS existe un informe que muestra que 2 eq de Cu(II) inducen el aumento de turbidez en la HyS cristalina (Roskamp *et al.* 2019), sin embargo los valores de turbidez obtenidos en este trabajo (DO 405 nm: 0,3) son muy inferiores a los obtenidos en nuestro trabajo. Estas diferencias pueden deberse a que en nuestro trabajo empleamos una concentración de proteína 10 veces superior a la empleada en este informe. Para el caso del Zn(II), no existe un consenso entre los resultados informados anteriormente. En 2018 el grupo de la Dra Liliana Quintanar informó que el Zn(II) no induce agregación de la HyS cristalina. Solamente cuando se sustituye una cisteína de la posición 25 por una histidina, se observa aumento de la turbidez de la HyS en presencia de Zn(II) y este efecto es dependiente de la concentración (Domínguez-Calva *et al.* 2018a). Por otro lado en 2019 el grupo de Roskamp y colaboradores mostraron resultados muy diferentes; en este caso plantearon que el Zn(II) a partir de 5 eq induce la formación de agregados de la HyS cristalina, obteniendo valores de turbidez a 400 nm de 0.7 (Roskamp *et al.* 2019). Con concentraciones menores de Zn(II) en este trabajo no se observa efecto en la turbidez de la proteína. Estas diferencias pueden ser debidas a la diferencia en la concentración de proteína ya antes mencionada. Por otro lado, la tendencia descrita por los datos de turbidez en este trabajo es similar a la obtenida en nuestro trabajo, con un aumento de la turbidez en los primeros minutos del experimento.

Las diferencias tanto en el grado de agregación observado así como en la velocidad de formación de estos entre la HyD y HyS cristalinas puede tener su origen en las diferencias estructurales entre ambas proteínas. En este sentido, es importante acotar que los átomos de las proteínas que con mayor

probabilidad pueden interaccionar con iones metálicos son los nitrógenos de las histidinas y los átomos de azufre de las metioninas y cisteínas (Quintanar y Rivillas-Acevedo 2013; Butkus *et al.* 2016). En el caso de la HyS cristalina presenta 7 cisteínas libres mientras que la HyD cuenta con 6. Algunos de residuos de cisteínas en la HyS cristalina se encuentran mucho más expuestos al solvente que en la HyD (Tabla 7). En ese caso se encuentran las cisteínas 25 y 27 del dominio amino, que se ha demostrado antes, es el más inestable (Lee *et al.* 2010). Para el caso de las histidinas ambas proteínas presentan dos histidinas expuestas al solvente y en el caso de las metioninas la HyS presenta 1 metionina expuesta al solvente (Met 119) muy cercana a una de las histidinas expuestas (His 123), sin embargo la HyD no presenta metioninas expuestas al solvente (Figura 33).

Tabla 8: Área accesible al solvente (SASA) de los principales residuos capaces de interaccionar con iones metálicos en ambas gamma cristalinas humanas. Para la obtención de los valores de área accesible al solvente se empleó el software VADAR (<http://vadar.wishartlab.com>) (Willard *et al.* 2003)

Cys (Residuo)	23	25	27	37	83	115	130
HyS (ASA)	0.21	0.77	0.4	0.02	0.01	0.01	0.01
Cys (Residuo)	18	32	41	78	109	111	
HyD (ASA)	0.1	0	0.05	0	0.08	0.26	
His (Residuo)	31	87	123	18			
HyS (ASA)	0.42	0.65	0.75	0.28			
His (Residuo)	15	22	65	83	88	122	
HyD (ASA)	0.55	0.2	0.13	0.8	0.02	0.29	
Met (Residuo)	59	108	119	124			
HyS (ASA)	0.23	0.35	0.54	0.02			
Met (Residuo)	43	69	102	147			
HyD (ASA)	0	0.36	0.28	0.29			

El hecho de que la HyS cristalina presente más residuos de los que pudieran interaccionar con iones metálicos, más expuestos al solvente pudiera estar provocando que el efecto en la agregación sea más rápido que en la HyD cristalina. Por otro lado una vez que se comienzan a formar agregados de proteína estos pueden servir como precursores para la formación de otros agregados y esto puede ser la causa los niveles de agregación obtenidos sean mayores en la HyS cristalina. En otros trabajos se ha

observado que las mutantes que carecen de las cisteínas expuestas al solvente muestran un menor grado de agregación inducida por Zn(II) (Roskamp *et al.* 2019).

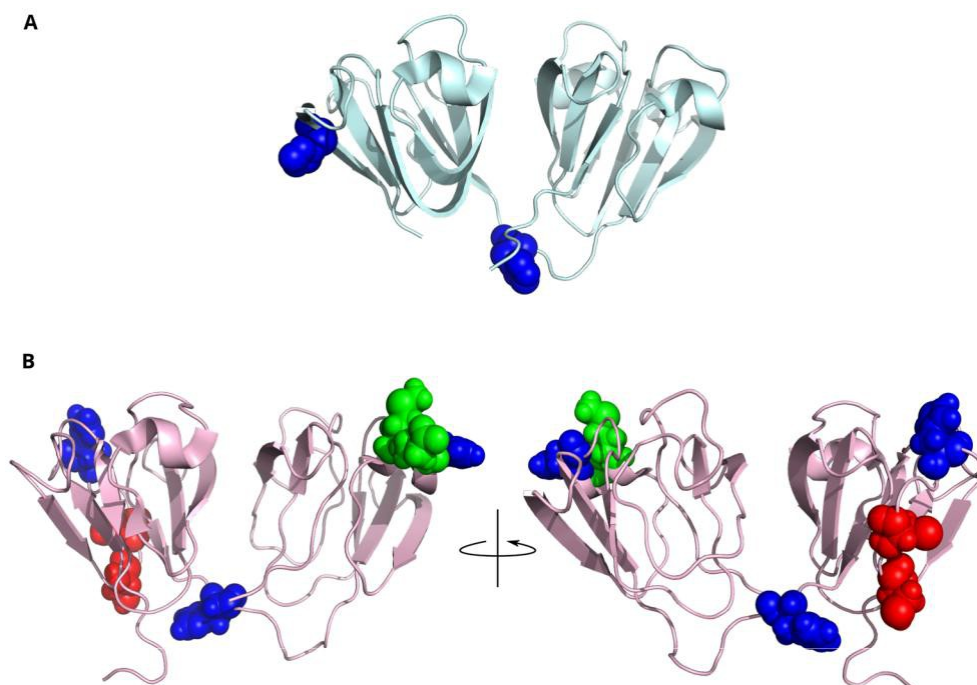


Figura 33: Mapeo en la estructura tridimensional de: A) HyD (PDB: 1HKO) y B) HyS (PDB: 2M3T) de los residuos de Cys (rojo), His (Azul) y metionina (verde) expuestos al solvente segun su valores de ASA obtenidos en la tabla 8.

9. Efecto de la radiación UV en la agregación de la HyS cristalina.

9.1. Desplegamiento térmico de la HyS cristalina irradiada.

En la figura 34 se muestra el despliegamiento térmico de la HyS cristalina irradiada y sin irradiar. Como se mencionó anteriormente, las muestras fueron irradiadas con luz UV de 302 nm, por 2 horas. Una vez irradiadas se realizaron los experimentos de despliegamiento térmico y las cinéticas de agregación. La T_m de la proteína irradiada fue de $70.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$, 9°C menos que la proteína sin irradiar. Estos resultados indican que la radiación UV disminuye la estabilidad térmica de la proteína. Un aspecto interesante es el hecho de que la relación IF(350/325) para la proteína irradiada a 37°C es mayor que para el caso de la proteína no irradiada (Figura 34, flecha naranja). Este aumento puede deberse a que la radiación provocó alguna modificación en los triptofanos. En el punto final del despliegamiento térmico, se colectaron espectros de fluorescencia de la proteína y se observó el corrimiento del máximo de emisión de 325 a 350 nm, lo que es indicativo de que la proteína se desplegó completamente (Figura 34B).

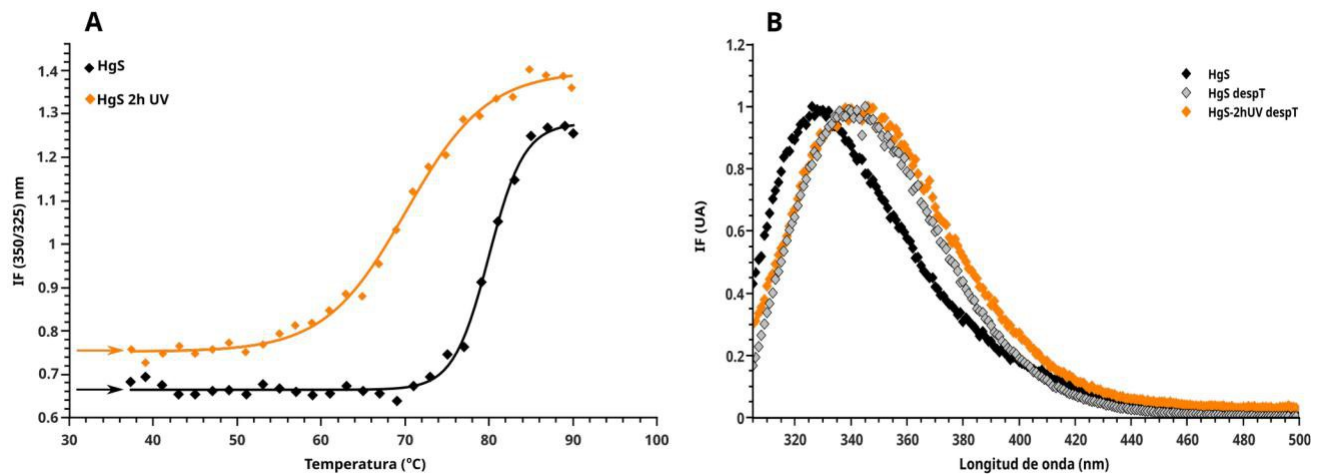


Figura 34: A: Desplegamiento térmico de HyS cristalina irradiada con luz UVB. Para el cálculo de la T_m se ajustaron los datos a una sigmoide. B: Espectros de la HyS cristalina antes y después del despliegamiento térmico.

9.2. Cinética de agregación de HyS cristalina irradiada con luz UV seguida por turbidez.

Con el objetivo de conocer el efecto de la radiación UV en la agregación de la HyS cristalina, realizamos ensayos turbidimétricos a 405 nm de la proteína no irradiada e irradiada. En la figura 35 (negro) se muestran la cinética de agregación de la proteína no irradiada. Se observa claramente como la turbidez de la solución de proteína no aumenta a lo largo de todo el experimento. Esto es un indicativo de la carencia de agregados que impidan el paso del haz de luz durante el tiempo del experimento. De esta manera, cualquier cambio en la turbidez de la proteína es responsabilidad del agente inductor de la agregación que en este caso es la radiación UV. En el caso de la proteína irradiada por 2 h se ve un aumento de la turbidez durante las 12 horas del experimento; este aumento muestra varias fases, con diferentes velocidades. La primera (80 min) es una fase estacionaria en la cual no hay un aumento sustancial de la turbidez de la solución, la segunda fase (80-160 min) se caracteriza por un aumento de la turbidez hasta 0.15 con una velocidad mucho mayor y la tercera fase es nuevamente una fase estacionaria que dura aproximadamente 100 minutos.

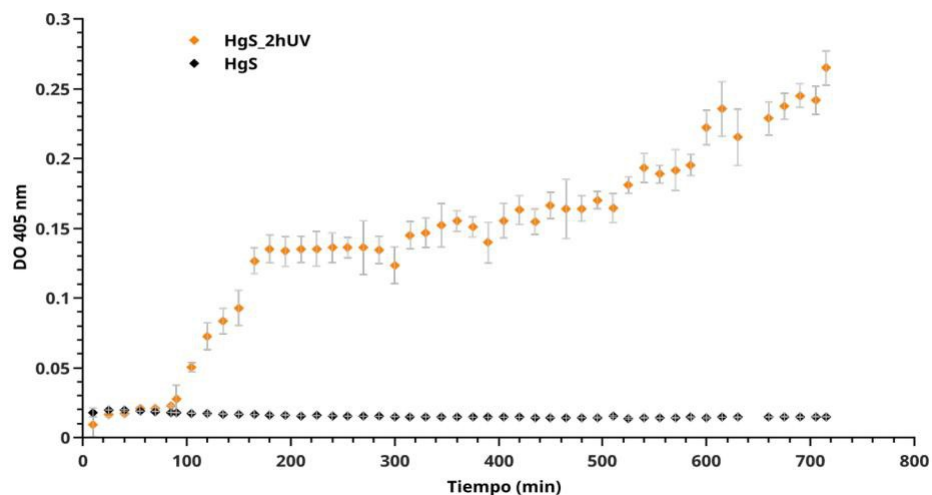


Figura 35: Cinética de agregación de la HyS cristalina no irradiada (negro) e irradiada por 2h (naranja). seguida por turbidimetría. La concentración de proteína fue de 1mg/mL.

Estas tres fases se ajustaron muy bien a una ecuación sigmoideal mostrando presencia de dos estados bien definidos y con un tiempo medio de formación de los agregados de 126 min. En la última fase se observa un aumento de la turbidez pero a menor velocidad que la fase 2. Estos resultados indican que la

radiación UV favorece la formación de agregados de HyS cristalina opacos a la luz. Por su parte, la presencia de varias fases en la cinética, sugiere que la formación de estos agregados tiene lugar de forma paulatina, e indica que se necesitan modificaciones estructurales en la proteína para llegar a la conformación a partir de la cual se desprende el crecimiento de los agregados.

9.3. Cinética de agregación de HyS cristalina irradiada por dispersión dinámica de luz.

Para conocer el tamaño de los agregados seguimos la cinética de agregación por dispersión dinámica de luz. Primeramente realizamos una medición puntual para conocer el radio hidrodinámico estimado de nuestra proteína en estado monomérico (Figura 17). Como ya se mencionó antes se puede observar que el mayor porcentaje de la señal (80%) presenta un radio hidrodinámico estimado de 2.33 nm que se corresponde aproximadamente con el radio hidrodinámico esperado para una proteína con el peso molecular de la HyS-cristalina, y además se observó otra señal minoritaria correspondiente con un oligómero de la proteína de 50 nm de radio. La cinética de agregación de la proteína no irradiada muestra la presencia de varias poblaciones desde la primera medición. Esto es un indicativo que la proteína monomérica y soluble puede formar oligómeros. Sin embargo a pesar de la presencia de estos oligómeros en la muestra, ésta se mantuvo transparente durante todo el tiempo de la cinética y no mostró indicios de aumento en la turbidez (Figura 35 negro).

En el caso de la cinética de agregación de la proteína irradiada por dos horas (Figura 36), en la primera medición se obtuvieron mayormente dos poblaciones, una que se corresponde con la HyS cristalina en forma monomérica (Rh: 2.33 nm) y una segunda población que se corresponde con un oligómero (Rh: 6.5 nm). (Figura 34). El monómero representaba el 80% de la población mientras que el oligómero representaba el 20%. Con el paso del tiempo, se observaron varios cambios importantes, en primer lugar, se observó un aumento paulatino del radio hidrodinámico de los oligómeros hasta valores de 47 nm. Si bien desde la primera medición posterior a la radiación se observó la presencia de oligómeros, éstos representaban un porcentaje pequeño del total de la señal (~25%). Sin embargo, como se observa en la figura 36 (rojo) este porcentaje fue aumentando hasta valores superiores al 80% a las 12h. Estos resultados sugieren que la radiación UV induce la formación de agregados en el tiempo.

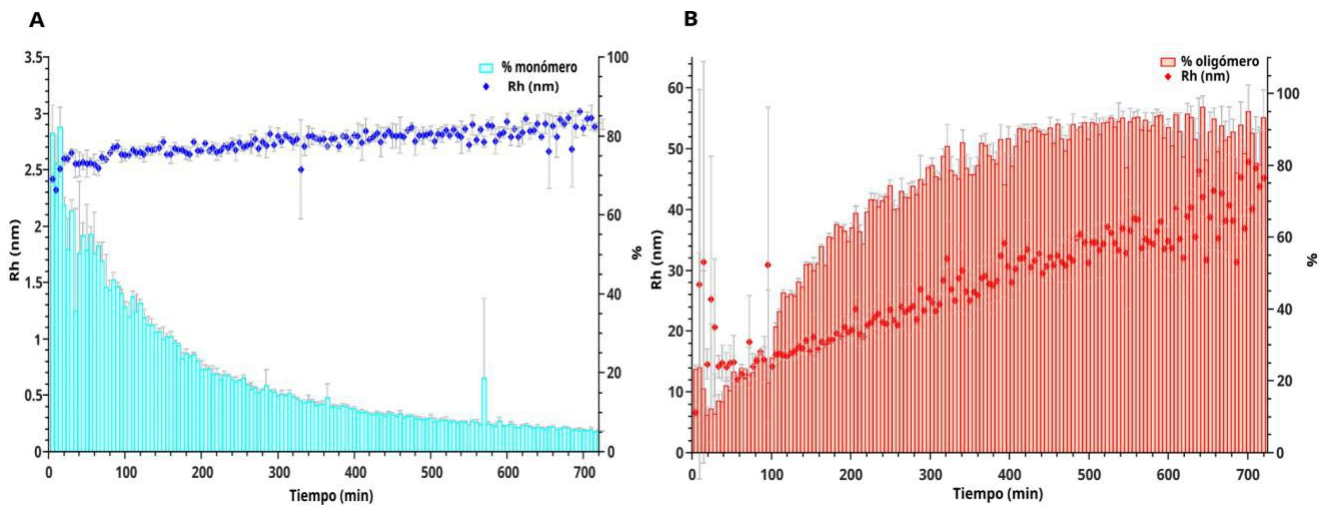


Figura 36: Cinética de agregación de HyS cristalina irradiada con UVB seguida por dispersión dinámica de luz. En el gráfico se observa el radio hidrodinámico de la población oligomérica de HyS cristalina irradiada por 2 horas en función del tiempo. A: Los puntos azules muestran el radio hidrodinámico del monómero y las barras muestran el porcentaje de la señal correspondiente este. B: Los puntos rojos muestran el radio hidrodinámico de los oligómeros y las barras muestran el porcentaje de la señal correspondiente este.

En el caso del monómero se observó un aumento de 2.3 a 2.9 nm con el paso del tiempo, este aumento puede estar relacionado con la formación de dímeros o puede deberse a la formación de intermediarios parcialmente plegado. Esta población mostró una disminución considerable en su porcentaje pasando de 80% en la primera medición hasta menos del 10% en las últimas mediciones. Estos resultados indican que la radiación UV induce la formación de oligómeros de gran tamaño y que éstos posiblemente se forman a partir de un intermediario parcialmente plegado o de la forma dimérica de la HyS cristalina.

9.4. Estudio de cambios conformacionales en la HyS cristalina por espectroscopía de fluorescencia.

La relación $IF(350/325)$ es un indicativo de la fracción de proteína desplegada. A partir de todos los espectros obtuvimos esta relación, la cual graficamos en función del tiempo como se muestra en la figura 37. Para el caso de la proteína no irradiada los valores de la fracción de proteína desplegada

IF(350/325) se mantienen constantes alrededor de 0.7 durante las 12 horas del experimento. Estos resultados indican que la proteína no sufre desplegamiento durante este tiempo. Para el caso de la proteína irradiada por 2h los valores de IF(350/325) nm experimentaron un ligero aumento entre 0.72 y 0.8 (Figura 37). Si tomamos en consideración que cuando la proteína se encuentra completamente desplegada muestra valores IF(350/325) de 1.4, los valores obtenidos sugieren que la proteína irradiada pudiera estar sufriendo un cambio conformacional durante el tiempo que dura el experimento. Este cambio conformacional puede estar relacionado con modificaciones en el ambiente químico de los triptofanos debido a que la región entre los dos dominios este cambiado (aumento de la distancia entre ambos dominios). Estos resultados sugieren que el tiempo de radiación UV empleado induce la formación de agregados que se refleja tanto en el aumento de la turbidez como el radio hidrodinámico de la proteína. Los resultados de fluorescencia indican por su parte, que los agregados pudieran estar formados por una HyS cristalina que se encuentra en una conformación diferente a la nativa.

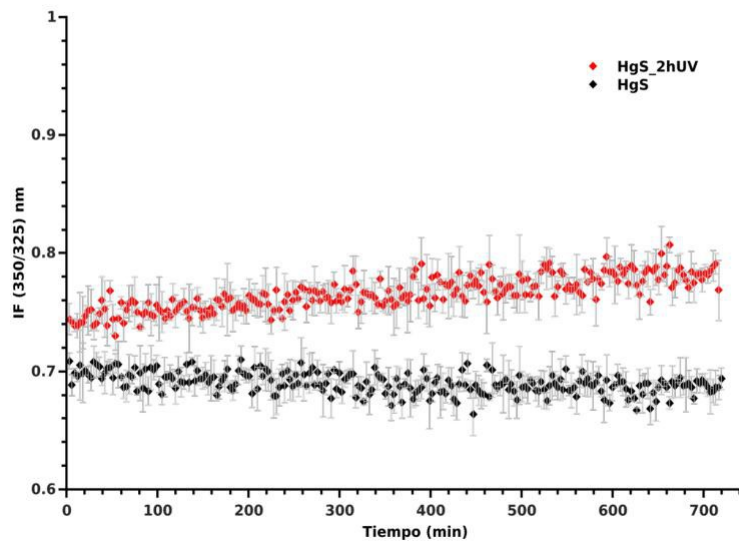


Figura 37: Relación de la intensidad de fluorescencia (350/325) nm de HyS cristalina con respecto al tiempo. HyS sin irradiar (negro) e irradiada por 2h (rojo).

10. Discusión de resultados del efecto de la radiación en el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina.

Entre los factores de riesgo externos asociados con el desarrollo de las cataratas se encuentra la radiación UV. Este factor es por mucho el factor externo más relevante, toda vez que todos estamos expuestos a él en mayor o menor medida. La radiación UV se divide en tres tipos. La radiación UVA, UVB y UVC. La radiación UVC incluye el rango de 100 a 290 nm. Esta radiación es la más dañina para los seres humanos, sin embargo el oxígeno de la estratosfera filtra completamente este tipo de radiación. La radiación UVB comprende el rango entre los 290 y los 315 nm, este tipo de radiación es filtrada por la capa de ozono, pero los recientes daños provocados en esta capa, han mostrado un aumento en los problemas provocados por esta radiación. Por último la radiación UVA comprende las longitudes de onda entre los 315 y los 400 nm y es la menos dañina. El lente ocular es capaz de filtrar las longitudes de onda más altas de la UVB y la UVA.

En este trabajo estudiamos el efecto de la radiación UV (UVB a 302 nm) en el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina en función del tiempo. Una vez que se probaron diferentes tiempos de radiación, 15, 30, 60, 90, 120, 180 min, se seleccionó el tiempo de exposición de 2h de radiación como el tiempo que utilizaríamos en nuestro trabajo. Este tiempo fue escogido tomando en consideración que el efecto de la radiación fuera perceptible en el tiempo de duración de la cinética.

Los resultados obtenidos por turbidimetría nos indican que la radiación UV induce la formación de agregados de la proteína y que este proceso ocurre en varias etapas. El ajuste de los primeros 300 minutos de cinética nos permitió obtener un tiempo medio de formación de los agregados de 126 min. Estos resultados indican que el efecto de la radiación es un efecto paulatino, y que las primeras etapas del proceso incluye cambios conformacionales en la proteína necesarios para la formación de agregados.

En los experimentos realizados a la proteína sin irradiar se observaron dos poblaciones; la población correspondiente al monómero, que representaba el 80% del total de la señal y la señal correspondiente

a oligómeros de 50 nm de radio hidrodinámico. El hecho de que la proteína sea capaz de formar oligómeros por sí sola sin que estos provoquen el aumento de la opacidad, resulta un aspecto muy interesante y que hasta el momento no ha sido explorado. A pesar de que existen informes donde se observa claramente la presencia de oligómeros en otras gamma cristalinas (Moran *et al.* 2013), este hecho no ha sido investigado a profundidad. Tomando en consideración las elevadas concentraciones a las que se encuentran estas proteínas en su contexto fisiológico y la transparencia necesaria en el lente; tiene sentido pensar que se agrupen u organicen de una forma particular. En este sentido, otros autores han sugerido que el grado de organización que pueden presentar las cristalinas en el lente ocular es elevado (Takemoto y Sorensen 2008). En el caso de la proteína sometida a radiación, los resultados obtenidos muestran que el tiempo de radiación empleada induce la formación de agregados de la HyS cristalina. El aumento del radio hidrodinámico del monómero durante los primeros 100 min, así como el hecho de que la turbidez se mantenga constante en este tiempo, nos permite sugerir que para la formación de agregados se hace necesario un cambio conformacional en la proteína. Posterior a los 100 min de la cinética, la turbidez siguió aumentando alcanzando valores cercanos 0.3 a las 12 h. Este aumento se ve reflejado igualmente por dispersión dinámica de luz con un aumento del radio hidrodinámico de los oligómeros así como su porcentaje. De esta manera, con ambas técnicas se obtuvieron resultados complementarios que permiten asegurar que la radiación UV empleada induce la formación de oligómeros que finalmente darán lugar a agregados que aumentan la opacidad de la muestra en el tiempo.

La espectroscopía de fluorescencia mostró un aumento de la relación $IF(350/325)$ nm hasta 0.78 para el caso de la proteína sometida a radiación, lo que puede ser indicativo de que la radiación induce un cambio conformacional en la proteína. Este hallazgo, en concordancia con el aumento del radio hidrodinámico del monómero que se observó por DLS pudiera sugerir la formación de un intermediario estructuralmente diferente a la proteína nativa. Tomando en consideración los resultados obtenidos en otros trabajos, el cambio conformacional es pequeño; pudiera ser un intermediario, en el cual los dominios N y C terminal de la proteína se encuentran más separados (o sea que la estructura esté más abierta) que en la estructura nativa sin necesidad de un deplegamiento de alguno de los dominios. Sin embargo, hasta el momento con los resultados obtenidos no podemos asegurarlo. Seguir el proceso empleando otras técnicas como la resonancia magnética nuclear podría brindar información relevante

de la conformación de la proteína irradiada durante la cinética.

La información proporcionada por cada una de las técnicas utilizadas nos permiten proponer un modelo de agregación en el cual, la radiación UV induce en primer lugar un cambio conformacional de la H_γS cristalina. Posteriormente a partir de estos intermediarios comienzan a formarse oligómeros y estos comienzan a crecer hasta que el tamaño de los agregados aumenta la opacidad o turbidez de la muestra (Figura 38). Todo este proceso ocurre de forma paulatina y los eventos tienen lugar lentamente.

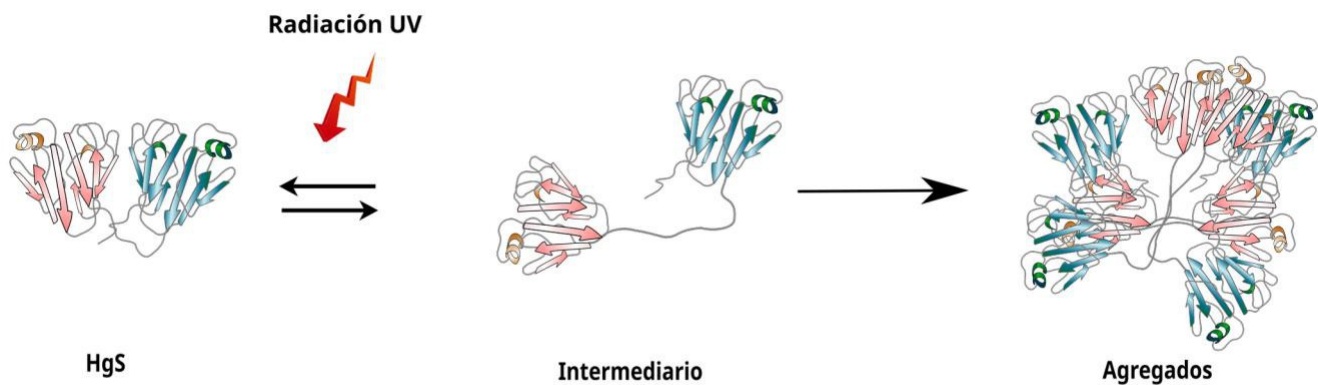


Figura 38: Modelo del mecanismo de agregación de la H_γS cristalina inducido por radiación UV.

Hasta el momento existen pocos informes del efecto de la radiación en la agregación de la H_γS cristalina, sin embargo, existen algunos reportes para la H_γD cristalina. Tal es el caso del trabajo reportado por Moran y colaboradores en 2013, donde demostraron que la radiación UVB induce desplegamiento del dominio N-terminal y el mecanismo incluye ruptura de la cadena principal en dicho dominio. Estas diferencias con nuestros resultados pueden deberse al tiempo de radiación utilizado, que en este trabajo fue de 6h y la potencia de la lámpara empleada fue de 35 W/m² mucho mayor a la potencia de la lámpara UV que utilizamos en nuestro trabajo de 1.3 W/m². Por otro lado para otras cristalinas como la beta B2 cristalina se ha informado que la radiación induce la agregación de éstas. Tal es el caso del trabajo de Zhang y colaboradores del 2019, trabajo en el que demostraron que el cambio de una isoleucina por una asparagina en el dominio N-terminal de la proteína provoca aumento de la susceptibilidad ante la radiación UVB (Zhang et al. 2019). De igual manera, en el trabajo de Zhao

y colaboradores del año 2017 mostraron que la ausencia de dos residuos de triptofanos en la H β B2 cristalina la hace más susceptible al daño por radiación (Zhao et al. 2017). En ambos trabajos se empleó un tiempo de radiación de 4 horas, mayor al empleado en nuestro trabajo, sin embargo, no se profundizó en el mecanismo de agregación inducido por la radiación ni hacen referencia a la potencia de la lámpara empleada.

El análisis comparativo del efecto de la radiación y de los iones metálicos en el desplegamiento y la agregación de la HyS cristalina permite establecer diferencias muy claras. En primer lugar los iones metálicos provocaron un efecto en la agregación de la proteína mucho mayor que la radiación, visto desde el grado de turbidez generado así como el efecto en el desplegamiento de la HyS cristalina. Por otro lado, si comparamos el tiempo medio de formación de los agregados para ambos metales estuvo en el rango de los siete minutos mientras que para la radiación fue mayor a los 120 minutos en la condiciones empleadas. Todo esto nos permite suponer que el efecto de la radiación es un efecto mucho más paulatino que el efecto de los metales. Además el tamaño de los agregados inducidos por radiación UV es mucho menor (45 nm) que los generados por los iones metálicos (400 nm). En el caso de la radiación, la velocidad a la que ocurre el proceso nos permitió seguir la formación de estos agregados, mientras que para del Cu(II) y el Zn(II) desde la primera medición ya se obtuvieron radios hidrodinámicos correspondientes con agregados de gran tamaño. En el caso de los resultados de espectroscopía de fluorescencia también se encontraron diferencias sustanciales. Los metales inducen el desplegamiento parcial de la proteína, según nuestros resultados para el caso del Cu(II) pudiéramos estar en presencia de la proteína con uno de los dominios parcialmente desplegado o completamente desplegados mientras que para el Zn(II) sugerimos el desplegamiento parcial de uno de los dominios. Sin embargo, para el caso de la radiación nuestros resultados nos permiten sugerir que la radiación solo genera un cambio conformacional que no implica desplegamiento de ninguno de los dominios de la proteína. En este caso sugerimos que el cambio conformacional solo involucra separación entre los dominios.

11. Conclusiones.

La formación de las cataratas es un proceso lento, donde las cristalinas presentes en el lente ocular, dañadas por diversos factores, se van acumulando hasta que el número de cristalinas dañadas superan los sistemas de contención presentes en el lente y se comienzan a formar los agregados que en última instancia darán lugar a las cataratas. Hasta el momento no se conoce con exactitud el mecanismo de agregación de las cristalinas frente a diferentes factores que se han definido como factores de riesgo externos. En este trabajo se estudió el efecto de bajas dosis de Cu(II) y Zn(II) así como tiempo cortos de exposición a radiación UV en el desplegamiento y agregación de dos gamma cristalinas humanas. El estudio se siguió por 12 horas a 37°C. El análisis de los resultados obtenidos nos permitió arribar a las siguientes conclusiones.

1. Bajas concentraciones de Cu(II) y Zn(II) inducen la agregación de la HyD cristalina en función del tiempo por mecanismos diferentes. El Cu(II) provoca el desplegamiento parcial de la proteína mientras que los agregados inducidos por Zn(II) se forman a partir de proteína plegada.
2. Bajas concentraciones de Cu(II) y Zn(II) inducen la agregación de la HyS cristalina en función del tiempo. El mecanismo de agregación en ambos metales incluye la formación de intermediarios parcialmente plegados, sin embargo, para el Cu(II) el grado de desplegamiento es mayor que para el Zn(II).
3. Dos horas de radiación UVB inducen la agregación de la HyS cristalina. El mecanismo de agregación incluye cambios conformacionales en la proteína.
4. Los iones metálicos así como la radiación UV inducen la agregación de las cristalinas por diferentes mecanismos. Además entre los dos metales se encontraron diferencias en el mecanismo de agregación. Estas diferencias corroboran que el proceso de formación de las cataratas es un proceso complejo en el cual intervienen diferentes factores. Los resultados obtenidos aportan nuevo conocimiento para futuros

estudios de inhibición de la agregación de estas proteínas así como para entender el mecanismo de agregación de otras proteínas.

12. Recomendaciones.

1. Continuar la caracterización del efecto de iones metálicos en la agregación empleando otras técnicas como la microscopía electrónica y la resonancia magnética nuclear.
2. Emplear técnicas como RMN y microscopía electrónica para continuar la caracterización del efecto de la radiación UV en el desplegamiento y agregación de la HyS cristalina.
3. Continuar con el estudio de los inhibidores de la agregación empleando técnicas como la calorimetría de titulación isotérmica, RMN y microscopía electrónica.

13. Referencias bibliográficas.

- Agbas A (2018) Trends of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. In: Neurochemical Basis of Brain Function and Dysfunction. pp 1–19
- Andley UP (2007) Crystallins in the eye: Function and pathology. Progress in retinal and eye research 26:78–98. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.10.003>
- Andley UP (2006) Crystallins and hereditary cataracts: molecular mechanisms and potential for therapy. Expert reviews in molecular medicine 8:1–19. <https://doi.org/10.1017/S1462399406000111>
- Bam NB, Cleland JL, Randolph TW (1996) Molten Globule Intermediate of Recombinant Human Growth Hormone: Stabilization with Surfactants. Biotechnology Progress 12:801–809. <https://doi.org/10.1021/bp960068b>
- Bari KJ, Sharma S, Chary KVR (2019) Structure of G57W mutant of human γ S-crystallin and its involvement in cataract formation. Journal of Structural Biology 205:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.02.003>
- Basak A, Bateman O, Slingsby C, *et al*(2003) High-resolution X-ray Crystal Structures of Human γ D Crystallin (1.25Å) and the R58H Mutant (1.15Å) Associated with Aculeiform Cataract. Journal of Molecular Biology 328:1137–1147. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00375-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00375-9)
- Bassnett S (2002) Lens organelle degradation. Experimental eye research 74:1–6. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1111>
- Bateman O a, Sarra R, van Genesen ST, *et al*(2003) The stability of human acidic β -crystallin oligomers and hetero-oligomers. Experimental Eye Research 77:409–422. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00173-8)
- Bharat SV, Shekhtman A, Pande J (2014) The Cataract-associated V41M1 mutant of human γ S-crystallin shows specific structural changes that directly enhance local surface hydrophobicity². Published in final edited form as: Biochem Biophys Res Commun 443:110–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.073>.
- Biswas A, Das KP (2008) Zn²⁺ Enhances the Molecular Chaperone Function and Stability of R-Crystallin†. Biochemistry 47:804–816. <https://doi.org/10.1021/bi7011965>
- Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, *et al*(2004) Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Progress in biophysics and molecular biology 86:407–85. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012>

- Boatz JC, Whitley MJ, Li M, *et al*(2017) Cataract-associated P23T γ 3D-crystallin retains a native-like fold in amorphous-looking aggregates formed at physiological pH. *Nature Communications* 8:1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15137>
- Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, *et al*(2017) Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* 5:e888–e897. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30293-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30293-0)
- Bron AJ, Vrensen GFJM (2000) The Ageing Lens. *Ophthalmologica* 214:86–104
- Brown GC, Brown MM, Busbee BG, Rapuano SB (2019) A Cost-benefit Analysis of 2018 Cataract Surgery in the United States
- Buell AK (2017) The Nucleation of Protein Aggregates - From Crystals to Amyloid Fibrils. *Int Rev Cell Mol Biol* 329:187–226. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.08.014>
- Butkus JM, O'Riley S, Chohan BS, Basu S (2016) Interaction of Small Zinc Complexes with Globular Proteins and Free Tryptophan. In: *International Journal of Spectroscopy*. <https://www.hindawi.com/journals/ijs/2016/1378680/>. Accessed 20 Apr 2020
- Carter T, Spurgeon A (2018) The Diseases of Occupations. *Occupational Medicine* 68:218–219. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqx171>
- Cekic O (1998) Effect of cigarette smoking on copper, lead, and cadmium accumulation in human lens. *The British journal of ophthalmology* 82:186–188
- Chen J, Callis PR, King J (2009) Mechanism of the Very Efficient Quenching of Tryptophan Fluorescence in Human γ D- and γ S-Crystallins: The γ -Crystallin Fold May Have Evolved To Protect Tryptophan Residues from Ultraviolet Photodamage †. 3708–3716
- Chen J, Topygin D, Brand L, King JA (2008) Mechanism of the Efficient Tryptophan Fluorescence Quenching in Human. 10705–10721
- Chuang E, Hori AM, Hesketh CD, Shorter J (2018) Amyloid assembly and disassembly. *J Cell Sci* 131:. <https://doi.org/10.1242/jcs.189928>
- Darrington RT, Anderson BD (1995) Evidence for a common intermediate in insulin deamidation and covalent dimer formation: Effects of pH and aniline trapping in dilute acidic solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84:275–282. <https://doi.org/10.1002/jps.2600840303>
- Das P, King J a, Zhou R (2011) Aggregation of γ -crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal β -strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:10514–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019152108>

- Dawczynski J, Blum M, Winnefeld K, Strobel J (2002) Increased content of zinc and iron in human cataractous lenses. *Biological trace element research* 90:15–23. <https://doi.org/10.1385/BTER:90:1-3:15>
- Delcourt C, Carriere I, Ponton-Sanchez A, *et al*(2000) Light exposure and the risk of cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the Pathologies Oculaires Liees a l'Age (POLA) study. *Arch Ophthalmol* 118:385–392. <https://doi.org/10.1001/archoph.118.3.385>
- Derham BK, Harding JJ (1999) Alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Progress in retinal and eye research* 18:463–509. <https://doi.org/S1350946298000305> [pii]
- Diemer H, Atmanene C, Sanglier S, *et al*(2009) Detection and structural features of the β B2-B3-crystallin heterodimer by radical probe mass spectrometry (RP-MS). *Journal of Mass Spectrometry* 44:803–812. <https://doi.org/10.1002/jms.1560>
- Dolinska MB, Sergeev YV, Chan MP, *et al*(2009) N-terminal extension of β B1-crystallin: Identification of a critical region that modulates protein interaction with β A3-crystallin. *Biochemistry* 48:9684–9695. <https://doi.org/10.1021/bi9013984>
- Domínguez-Calva JA, Haase-Pettingell C, Serebryany E, *et al*(2018a) A Histidine Switch for Zn-Induced Aggregation of γ -Crystallins Reveals a Metal-Bridging Mechanism That Is Relevant to Cataract Disease. *Biochemistry* 57:4959–4962. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00436>
- Domínguez-Calva JA, Pérez-Vázquez ML, Serebryany E, *et al*(2018b) Mercury-induced aggregation of human lens γ -crystallins reveals a potential role in cataract disease. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1607-z>
- Dongn X, Ayala M, Lo S (2003) Ultraviolet Radiation – Induced Cataract: Age and Maximum Acceptable Dose AND. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44:1150–1154. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0541>
- D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T (2013) UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences* 14:12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Downard KM, Kokabu Y, Ikeguchi M, Akashi S (2011) Homology-modelled structure of the β B2B3-crystallin heterodimer studied by ion mobility and radical probe MS. *FEBS Journal* 278:4044–4054. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08309.x>
- Eichner T, Radford SE (2011) Understanding the complex mechanisms of β 2-microglobulin amyloid assembly. *The FEBS Journal* 278:3868–3883. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08186.x>
- Ergen I, Turgut B, Ilhan N (2017) Comparison of the impact of epigallocatechin gallate and ellagic acid in an experimental cataract model induced by sodium selenite. *Int J Ophthalmol* 10:499–506. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.04.01>

- Ertekin MV, Koçer I, Karslıog I, Taysi S (2004) Effects of Oral Ginkgo biloba Supplementation on Cataract Formation and Oxidative Stress Occurring in Lenses of Rats Exposed to Total. *Journal Ophthalmologic* 48:499–502. <https://doi.org/10.1007/s10384-004-0101-z>
- Fang W, Ye Q, Yao Y, *et al*(2019) Protective Effects of Trimetazidine in Retarding Selenite-Induced Lens Opacification. *Current Eye Research* 44:1325–1336. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1633359>
- Fernandez Silva A (2015) Caracterización del desplegamiento de la HyD cristalina humana en presencia de Cu(II) y Zn(II). Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Fink a L (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding & design* 3:R9-23. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00002-9)
- Flaugh SL, Kosinski-Collins MS, King J (2005) Contributions of hydrophobic domain interface interactions to the folding and stability of human gammaD-crystallin. *Protein science: a publication of the Protein Society* 14:569–81. <https://doi.org/10.1110/ps.041111405>
- Forsythe HM, Vetter CJ, Jara KA, *et al*(2019) Altered Protein Dynamics and Increased Aggregation of Human γ S-Crystallin Due to Cataract-Associated Deamidations. *Biochemistry* 58:4112–4124. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00593>
- Friberg G, Pande J, Ogun O, Benedek GB (1996) Pantethine inhibits the formation of high-Tc protein aggregates in gamma B crystallin solutions. *Current eye research* 15:1182–1190
- Fu L, Liang JJ (2001) Spectroscopic analysis of lens recombinant betaB2- and gammaC-crystallin. *Molecular vision* 7:178–83
- Gacche RN, Dhole N a (2011) Profile of aldose reductase inhibition, anti-cataract and free radical scavenging activity of selected medicinal plants: an attempt to standardize the botanicals for amelioration of diabetes complications. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 49:1806–13. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.032>
- Gakamsky A, Duncan RR, Howarth NM, *et al*/Tryptophan and Non-Tryptophan Fluorescence of the Eye Lens Proteins Provides Diagnostics of Cataract at the Molecular Level. *Scientific Reports* 7:1–15. <https://doi.org/10.1038/srep40375>
- Gawad A (2015) Dynamics of β B2-Crystallin Motion Based on Principal Component Analysis and Normal Mode Analysis. *Computational Biology and Bioinformatics* 3:31. <https://doi.org/10.11648/j.cbb.20150302.12>
- Ghosh P, Vaidya A, Kumar A, Rangachari V (2016) Determination of critical nucleation number for a single nucleation amyloid- β aggregation model. *Math Biosci* 273:70–79. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2015.12.004>

- Giorgetti S, Raimondi S, Pagano K, *et al*(2011) Effect of Tetracyclines on the Dynamics of Formation and Deconstruction of β 2-Microglobulin Amyloid Fibrils. *J Biol Chem* 286:2121– 2131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178376>
- Glynn RJ, Rosner B, Christen WG (2009) Evaluation of risk factors for cataract types in a competing risks framework. *Ophthalmic Epidemiol* 16:98–106. <https://doi.org/10.1080/09286580902737532>
- Gong B, Zhang L, Lam DS, *et al*(2010) Sodium 4-phenylbutyrate ameliorates the effects of cataract- causing mutant gammaD-crystallin in cultured cells. *Molecular Vision* 16:997–1003
- González-Iglesias, H, Petrash, C, Rodríguez-Menéndez, S,*et al*/Quantitative distribution of Zn, Fe and Cu in the human lens and study of the Zn–metallothionein redox system in cultured lens epithelial cells by elemental MS†‡. *J Anal At Spectrom* 32:1746–1756. <https://doi.org/10.1039/c6ja00431h>
- Goulet DR, Knee KM, King JA (2009) Inhibition of unfolding and aggregation of lens protein human gamma D crystallin by sodium citrate. 93:371–381. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.04.011>
- Goulet DR, Knee KM, King JA (2011) Inhibition of unfolding and aggregation of lens protein human gamma D crystallin by sodium citrate. *Experimental Eye Research* 93:371–381. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.04.011>
- Grainger RM (1992) Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. Elsevier Science Publishers 8:
- Graw J (2009) Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Experimental eye research* 88:173– 89. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.10.011>
- Gunasingh MJ, Philip JE, Ashok BS, *et al*(2008) Melatonin prevents amyloid protofibrillar induced oxidative imbalance and biogenic amine catabolism. *Life Sciences* 83:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.05.011>
- Halder N, Joshi S, Gupta SK (2003) Lens aldose reductase inhibiting potential of some indigenous plants. 86:113–116. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00052-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00052-7)
- Hammarström P, Persson M, Freskgård P-O, *et al*(1999) Structural Mapping of an Aggregation Nucleation Site in a Molten Globule Intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 274:32897– 32903. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32897>
- Hancock SM, Finkelstein DI, Adlard PA (2014) Glia and zinc in ageing and Alzheimer's disease: a mechanism for cognitive decline? *Frontiers in Aging Neuroscience* 6:137. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00137>

- Hanson SR, Hasan a, Smith DL, Smith JB (2000) The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage. *Experimental eye research* 71:195–207. <https://doi.org/10.1006/exer.2000.0868>
- Hanson SR, Smith DL, Smith JB (1998a) Deamidation and disulfide bonding in human lens gamma-crystallins. *Experimental eye research* 67:301–312. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0530>
- Hanson SR, Smith DL, Smith JB (1998b) Deamidation and disulfide bonding in human lens gamma-crystallins. *Experimental eye research* 67:301–12. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0530>
- Horwitz J (2003) Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research* 76:145–153. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(02\)00278-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00278-6)
- Ishimori N, Oguchi J, Nakazawa Y, *et al*(2017) Roasting Enhances the Anti-Cataract Effect of Coffee Beans: Ameliorating Selenite-Induced Cataracts in Rats. *Current Eye Research* 42:864– 870. <https://doi.org/10.1080/02713683.2016.1262877>
- Jarrett JT, Lansbury PT (1992) Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* 31:12345–12352. <https://doi.org/10.1021/bi00164a008>
- Ji F, Jung J, Gronenborn AM (2012) Structural and biochemical characterization of the childhood cataract-associated R76S mutant of human γ D-crystallin. *Biochemistry* 51:2588–96. <https://doi.org/10.1021/bi300199d>
- Ji Y, Cai L, Zheng T, *et al*(2015) The mechanism of UVB irradiation induced-apoptosis in cataract. *Mol Cell Biochem* 401:87–95. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2294-x>
- John M. Finke, Melinda Roy, Bruno H. Zimm, and Patricia A. Jennings* (2000) Aggregation Events Occur Prior to Stable Intermediate Formation during Refolding of Interleukin 1 β . *Biochemistry* 39:575–583. <https://doi.org/10.1021/bi991518m>
- Kantorow M, Hawse JR, Cowell TL, *et al*(2004) Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:9654–9659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403532101>
- Karri S, Kasetti RB, Vendra VPR, *et al*(2013) Structural analysis of the mutant protein D26G of human γ S-crystallin, associated with Coppock cataract. *Molecular vision* 19:1231–7
- Khago D, Wong EK, Kingsley CN, *et al*(2016) Increased hydrophobic surface exposure in the cataract-related G18V variant of human γ S-crystallin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1860:325–332. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.022>

- Kingsley CN, Brubaker WD, Markovic S, *et al*(2013) Preferential and specific binding of human α -crystallin to a cataract-related variant of γ -crystallin. *Structure* 21:2221–2227. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.09.017>
- Klein BEK, Klein R, Lee KE, Meuer SM (2003) Socioeconomic and lifestyle factors and the 10-year incidence of age-related cataracts. *Am J Ophthalmol* 136:506–512. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(03)00290-3)
- Kong F, King J (2011a) Contributions of aromatic pairs to the folding and stability of long-lived human α -crystallin. *PROTEIN SCIENCE* 20:513–528. [https://doi.org/Received 22 October DOI: 10.1002/pro.583](https://doi.org/Received%2022%20October%20DOI%3A10.1002/pro.583)
- Kong F, King J (2011b) Contributions of aromatic pairs to the folding and stability of long-lived human γ -crystallin. *Protein Science* 20:513–518. <https://doi.org/10.1002/pro.583>
- Kong F, King J (2011c) Contributions of aromatic pairs to the folding and stability of long-lived human γ -crystallin. *Protein science : a publication of the Protein Society* 20:513–28. <https://doi.org/10.1002/pro.583>
- Kosinski-collins MS (2003) In vitro unfolding , refolding , and polymerization of human α -crystallin , a protein involved in cataract formation. *Protein Science* 12:480–490. [https://doi.org/ 10.1110/ps.0225503.obstructs](https://doi.org/10.1110/ps.0225503.obstructs)
- Kosinski-collins MS, Flaugh SL (2004) Probing folding and fluorescence quenching inKosinski-collins, M. S., & Flaugh, S. L. (2004). Probing folding and fluorescence quenching in human α -crystallin Greek key domains using triple tryptophan mutant proteins, 2223–2235. doi: 10.1110/ps.04627004. 2223–2235. <https://doi.org/10.1110/ps.04627004.the>
- Kosinski-Collins MS, Flaugh SL, King J (2004) Probing folding and fluorescence quenching in human α -crystallin Greek key domains using triple tryptophan mutant proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13:2223–35. <https://doi.org/10.1110/ps.04627004>
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lam DS, Rao SK, Ratra V, Liu Y (2015) Cataract. *Nature Reviews Disease Primers* 1:1–15
- Lampi KJ, Ma Z, Shih M, *et al*(1997) Sequence analysis of β A3, β B3, and β A4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens. *The Journal of biological chemistry* 272:2268–2275. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2268>
- Lampi KJ, Wilmarth P a, Murray MR, David LL (2014) Lens β -crystallins: the role of deamidation and related modifications in aging and cataract. *Progress in biophysics and molecular biology* 115:21–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.004>
- Langford-Smith A, Tilakaratna Viranga, Lythgoe PR, *et al*(2016) Age and Smoking Related

Changes in Metal Ion Levels in Human Lens: Implications for Cataract Formation. 11:1–16. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0147576>

- Lapko VN, Smith DL, Smith JB (2003) Methylation and carbamylation of human gamma crystallins. *Protein Science* 12:1762–1774. <https://doi.org/10.1110/ps.0305403.resulting>
- Lee S, Mahler B, Toward J, *et al*(2010) A single destabilizing mutation (F9S) promotes concerted unfolding of an entire globular domain in γ S-crystallin. *Journal of Molecular Biology* 399:320–330. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.003>
- Li J, Zhu M, Rajamani S, *et al*(2004) Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem Biol* 11:1513–1521. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.025>
- Liao J, Lin I, Huang K, *et al*(2014) Carnosine Ameliorates lens protein turbidity formations by inhibiting Calpain Proteolysis and Ultraviolet C-Induced Degradation. *Journal of Agricultural and food chemistry* 62:5932–5938
- Liu Y-C, Wilkins M, Kim T, *et al*(2017a) Cataracts. *The Lancet* 390:600–612. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30544-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30544-5)
- Liu Y-C, Wilkins M, Kim T, *et al*(2017b) Cataracts. *The Lancet* 390:. <http://dx.doi.org/10.1016/>
- Löfgren S (2017) Solar ultraviolet radiation cataract. *Experimental Eye Research* 156:112–116. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.05.026>
- Ma Z, Yao W, Chan C-C, *et al*(2016) Human β A3/A1-crystallin splicing mutation causes cataracts by activating the unfolded protein response and inducing apoptosis in differentiating lens fiber cells. *Biochim Biophys Acta* 1862:1214–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.02.003>
- MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, *et al*(2002) Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7900–7905. <https://doi.org/10.1073/pnas.122231399>
- Martinez R, Paloma G-R, Amero C (2014) Solution Structure of 6aJL2 and 6aJL2-R24G Amyloidogenic Light Chain Proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 456:. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.044>
- Maya-Martinez R, French-Pacheco L, Valdés-García G, *et al*(2019) Different Dynamics in 6aJL2 Proteins Associated with AL Amyloidosis, a Conformational Disease. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/ijms20174078>
- Mehrnaz Khossravi ‡ §, Steven J. Shire §, and Ronald T. Borchardt* ‡ (2000) Evidence for the Involvement of Histidine A(12) in the Aggregation and Precipitation of Human Relaxin Induced

- by Metal-Catalyzed Oxidation†. *Biochemistry* 39:5876–5885.
<https://doi.org/10.1021/bi9924720>
- Meng F, Abedini A, Plesner A, *et al*(2010) The Flavanol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate Inhibits Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide, Disaggregates Amyloid Fibrils and Protects Cultured Cells Against IAPP Induced Toxicity. *Biochemistry* 49:8127–8133. <https://doi.org/10.1021/bi100939a>
 - Mitchell P, umming,an, RGC, Attebo, K, Panchapakesan, J (1997) Prevalence of Cataract in Australia. *Ophthalmology* 104:581–588
 - Moran SD, Zhang TO, Decatur SM, Zanni MT (2013) Amyloid Fiber Formation in Human γ D-Crystallin Induced by UV – B Photodamage
 - Moreau KL, King JA (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends in Molecular Medicine* 18:273–282. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.005>
 - Nagai R, Nagai M, Shimasaki S, *et al*(2010) Citric acid inhibits development of cataracts, proteinuria and ketosis in streptozotocin (type 1) diabetic rats. *Biochemical and biophysical research communications* 393:118–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.095>
 - Nartey A (2017) The Pathophysiology of Cataract and Major Interventions to Retarding Its Progression : A Mini Review. 6:4–7. <https://doi.org/10.15406/aovs.2017.06.00178>
 - Ortega A, Amorós D, García De La Torre J (2011) Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophysical Journal* 101:892–898. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.046>
 - Pande A, Ghosh KS, Banerjee PR, Pande J (2010) Increase in Surface Hydrophobicity of the Cataract-Associated, P23T Mutant of Human GammaD-Crystallin is Responsible for Its Dramatically Lower, Retrograde Solubility. *NIH Public access* 17:148–159. <https://doi.org/10.1007/s10461-012-0143-z.Provider-patient>
 - Pande A, Mokhor N, Pande J (2015) Deamidation of Human γ s-Crystallin Increases Attractive Protein Interactions: Implications for Cataract. *Biochemistry* 54:4890–4899. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00185>
 - Pascolini D, Mariotti SP (2012) Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 96:614–618. <https://doi.org/doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300539>
 - Patel P, Jivani N, Malaviya S, *et al*(2012) Cataract : A major secondary diabetic complication. 1:180–185
 - Pelaez-Aguilar AE, Rivillas-Acevedo L, French-Pacheco L, *et al*(2015) Inhibition of Light Chain 6aJL2-R24G Amyloid Fiber Formation Associated with Light Chain Amyloidosis.

- Biochemistry 54:4978–86. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00288>
- Pollreisz A, Schmidt-Erfurth U (2010) Diabetic Cataract—Pathogenesis, Epidemiology and Treatment. In: Journal of Ophthalmology. <https://www.hindawi.com/journals/joph/2010/608751/>. Accessed 4 May 2020
 - Pulla V, Vendra R, Agarwal G, *et al*(2013) Structural Integrity of the Greek Key Motif in bc - Crystallins Is Vital for Central Eye Lens Transparency. 4–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070336>
 - Quintanar L, Domínguez-Calva JA, Serebryany E, *et al*(2015) Copper and Zinc Ions Specifically Promote Nonamyloid Aggregation of the Highly Stable Human γ -D Crystallin. ACS Chemical Biology 11:263–272. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00919>
 - Quintanar L, Rivillas-Acevedo L (2013) Studying metal ion-protein interactions: electronic absorption, circular dichroism, and electron paramagnetic resonance. Methods Mol Biol 1008:267–297. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_10
 - Randazzo J, Zhang P, Makita J, *et al*(2011) Orally active multi-functional antioxidants delay cataract formation in streptozotocin (type 1) diabetic and gamma-irradiated rats. PLoS ONE 6:e18980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018980>
 - Rivillas-Acevedo L, Fernández-silva A, Amero C (2015) Function, Structure and Stability of Human Gamma D Crystallins: A review. In: Olivares-Quiroz L (Autonomous U of MC), Jardón-Valadez (Autonomous Metropolitan University MC, Guzmán-López Orlando (Autonomous Metropolitan University MC (eds) Physical Biology of Proteins and peptides, Springer I. Mexico City, pp 81–98
 - Rivillas-acevedo L, Fernández-silva A, Amero C (2015) Function , Structure and Stability of Human Gamma D Crystallins : A Review. 1–26
 - Roberts JE (2001a) Ocular phototoxicity. J Photochem Photobiol B 64:136–143. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00196-8)
 - Roberts JE (2001b) Ocular phototoxicity. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 64:136–143. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00196-8)
 - Rooban BN, Lija Y, Biju PG, *et al*(2006) Vitex negundo attenuates calpain activation and cataractogenesis in selenite models. Experimental Eye Research 88:575–582. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.11.020>
 - Roskamp KW, Kozlyuk N, Sengupta S, *et al*(2019) Divalent Cations and the Divergence of $\beta\gamma$ -Crystallin Function. Biochemistry 58:4505–4518. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00507>

- Sai Varsha MKN, Raman T, Manikandan R (2014) Inhibition of diabetic-cataract by vitamin K1 involves modulation of hyperglycemia-induced alterations to lens calcium homeostasis. *Experimental eye research* 128:73–82. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.007>
- Sakthivel M, Elanchezhian R, Ramesh E, *et al*(2008) Prevention of selenite-induced cataractogenesis in Wistar rats by the polyphenol, ellagic acid. 86:251–259. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.10.016>
- Schafheimer N, Wang Z, Schey K, King J (2014) Tyrosine/Cysteine Cluster Sensitizing Human γ D-Crystallin to Ultraviolet Radiation-Induced Photoaggregation in Vitro
- Schuck P (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 78:1606–1619. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76713-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76713-0)
- Schwendeman SP, Costantino HR, Gupta RK, *et al*(1995) Stabilization of tetanus and diphtheria toxoids against moisture-induced aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11234–11238. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11234>
- Searle BC, Dasari S, Wilmarth P a., *et al*(2005) Identification of protein modifications using MS/MS de novo sequencing and the OpenSea alignment algorithm. *Journal of Proteome Research* 4:546–554. <https://doi.org/10.1021/pr049781j>
- Serebryany E, King J a (2014) The $\beta\gamma$ -crystallins: native state stability and pathways to aggregation. *Progress in biophysics and molecular biology* 115:32–41. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.05.002>
- Serebryany E, King J a (2015) Wild-type human γ D-crystallin promotes aggregation of its oxidation-mimicking, misfolding-prone W42Q mutant. *The Journal of biological chemistry* 290:11491–503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.621581>
- Serebryany E, Woodard JC, Adkar BV, *et al*(2016) An internal disulfide locks a misfolded aggregation-prone intermediate in cataract-linked mutants of human γ D-crystallin. *Journal of Biological Chemistry* 291:19172–19183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.735977>
- Shamsi TN, Athar T, Parveen R, Fatima S (2017) A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments. *Int J Biol Macromol* 105:993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.116>
- Sharma KK, Santhoshkumar P (2009) Lens aging: effects of crystallins. *Biochimica et biophysica acta* 1790:1095–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.008>
- Shin KH, Lim SS, Kim DK (1998) Effect of byakangelicin, an aldose reductase inhibitor, on galactosemic cataracts, the polyol contents and Na(+), K(+)ATPase activity in sciatic nerves of

- strepto-zotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 5:121–7. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80008-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80008-1)
- Sieving P, Lambrou G, Gichuhi S, *et al*(2017) Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* 5:e1221–e1234. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(17\)30393-5](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(17)30393-5)
 - Singh D, Tangirala R, Bakthisaran R, Chintalagiri MR (2009) Synergistic effects of metal ion and the pre-senile cataract-causing G98R α A-crystallin : self-aggregation propensities and chaperone activity. *Molecular vision* 15:2050–2060
 - Singh Grewal A, Bhardwaj S, Pandita D, *et al*(2016) Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 16:120–162
 - Sliney DH (2001) Photoprotection of the eye – UV radiation and sunglasses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 64:166–175. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00229-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00229-9)
 - Slingsby C, Wistow GJ (2014) Functions of crystallins in and out of lens: roles in elongated and post-mitotic cells. *Progress in biophysics and molecular biology* 115:52–67. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.006>
 - Slingsby C, Wistow GJ, Clark AR (2013) Evolution of crystallins for a role in the vertebrate eye lens. *Protein science : a publication of the Protein Society* 22:367–80. <https://doi.org/10.1002/pro.2229>
 - Song E, Sun H, Xu Y, *et al*(2014) Age-Related Cataract, Cataract Surgery and Subsequent Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112054>
 - Sperduto RD, Milton RC, Lindblad AS, Klein BEK (2001) Risk factors associated with age-related nuclear and cortical cataract : a case-control study in the Age-Related Eye Disease Study, AREDS Report No. 5. *Ophthalmology* 108:1400–1408. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(01\)00626-1](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(01)00626-1)
 - Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A (2005) Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine reviews* 26:380–92. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0028>
 - Srivastava VK, Varshney N, Pandey DC (1992) Role of trace elements in senile cataract. *Acta ophthalmologica* 70:839–841
 - Stacy R.A H, David L. S, Smith JB (1998) Deamidation and Disulfide Bonding in Human Lens γ -Crystallins. *Exp Eye Res* 67:301–312

- Strickley RG, Anderson BD (1997) Solid-state stability of human insulin. II. Effect of water on reactive intermediate partitioning in lyophiles from pH 2-5 solutions: stabilization against covalent dimer formation. *Journal of Pharmaceutical Science* 86:645–53. <https://doi.org/10.1021/js9700311>
- Sun H, Ma Z, Li Y, *et al*(2005) Gamma-S crystallin gene (CRYGS) mutation causes dominant progressive cortical cataract in humans. 42:706–710. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028274>
- Takemoto L, Sorensen CM (2008) Protein-protein interactions and lens transparency. *Experimental eye research* 87:496–501. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.08.018>
- Thorn DC, Grosas AB, Mabbitt PD, *et al*(2018) The structure and stability of the disulfide-linked γ S-crystallin dimer provide insight into oxidation products associated with lens cataract formation. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.005>
- Toichi K, Yamanaka K, Furukawa Y (2013) Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 288:4970–4980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.414235>
- Truscott RJW (2005) Age-related nuclear cataract - Oxidation is the key. *Experimental Eye Research* 80:709–725. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.12.007>
- Van Montfort RLM, Bateman O a, Lubsen NH, Slingsby C (2003) Crystal structure of truncated human betaB1-crystallin. *Protein science: a publication of the Protein Society* 12:2606–2612. <https://doi.org/10.1110/ps.03265903.The>
- Varma SD, Hegde KR, Kovtun S (2010a) Inhibition of selenite-induced cataract by caffeine. *Acta Ophthalmologica* 88:245–249. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2010.02014.x>
- Varma SD, Hegde KR, Kovtun S (2010b) Inhibition of selenite-induced cataract by caffeine. *Acta ophthalmologica* 88:e245-9. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2010.02014.x>
- Vendra VPR, Chandani S, Balasubramanian D (2012) The Mutation V42M Distorts the Compact Packing of the Human Gamma-S-Crystallin Molecule, Resulting in Congenital Cataract. *PLoS ONE* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051401>
- Vit P, Jacob TJ (2008) Putative Anticataract Properties of Honey Studied by the Action of Flavonoids on a Lens Culture Model. *Journal of Health Science* 54:196–202. <https://doi.org/10.1248/jhs.54.196>
- Wang W (2005a) Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International journal of pharmaceutics* 289:1–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>
- Wang W (2005b) Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International journal of pharmaceutics* 289:1–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>

- Wang Y, Lomakin A, McManus JJ, *et al*(2010a) Phase behavior of mixtures of human lens proteins Gamma D and Beta B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:13282–13287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008353107>
- Wang Y, Petty S, Trojanowski A, *et al*(2010b) Formation of amyloid fibrils in vitro from partially unfolded intermediates of Human γ -crystallin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51:672–678. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3987>
- Whitley MJ, Xi Z, Bartko JC, *et al*(2017) A Combined NMR and SAXS Analysis of the Partially Folded Cataract-Associated V75D γ D-Crystallin. *Biophysical Journal* 112:1135–1146. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.02.010>
- Willard L, Ranjan A, Zhang H, *et al*(2003) VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res* 31:3316–3319
- Wu JW, Chen M-E, Wen W-S, *et al*(2014) Comparative analysis of human γ D-crystallin aggregation under physiological and low pH conditions. *PloS one* 9:e112309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112309>
- Xi Z, Whitley MJ, Gronenborn AM (2017) Human β B2-Crystallin Forms a Face-en-Face Dimer in Solution: An Integrated NMR and SAXS Study. *Structure* 25:496–505. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.02.001>
- Xia Z, Yang Z, Huynh T, *et al*(2013) UV-radiation induced disruption of dry-cavities in human γ D-crystallin results in decreased stability and faster unfolding. *Scientific reports* 3:1560. <https://doi.org/10.1038/srep01560>
- Yang F, Lim GP, Begum AN, *et al*(2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280:5892–5901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404751200>
- Young AR (2006) Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Progress in biophysics and molecular biology* 92:80–5. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.005>
- Zhang J, Liu XY (2003) Effect of protein–protein interactions on protein aggregation kinetics. *The Journal of Chemical Physics* 119:10972. <https://doi.org/10.1063/1.1622380>
- Zhang K, Zhao WJ, Yao K, Yan YB (2019) Dissimilarity in the Contributions of the N-Terminal Domain Hydrophobic Core to the Structural Stability of Lens β/γ -Crystallins. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01164>
- Zhao H, Brown PH, Schuck P (2011) On the distribution of protein refractive index increments. *Biophys J* 100:2309–2317. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.004>
- Zhao L, Chen X-J, Zhu J, *et al*(2015) Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature* 523:607–611. <https://doi.org/10.1038/nature14650>

- Zhao W-J, Xu J, Chen Xiang-Jun, *et al*(2017) Effects of cataract-causing mutations W59C and W151C on γ B2-crystallin structure, stability and folding. *International Journal of Biological Macromolecules* 1 103:764–770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.109>
- Zhou G, Zhou N, Hu S, *et al*(2010) A missense mutation in CRYBA4 associated with congenital cataract and microcornea. *Mol Vis* 16:1019–1024

Anexo 1: Efecto de 15eq de Cu(II) y Zn(II) en el desplegamiento y agregación de la HγS cristalina.

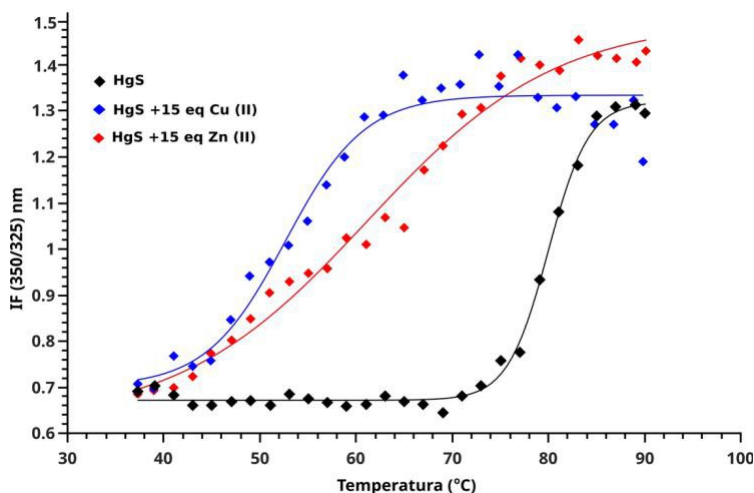


Figura 1: Desplegamiento térmico HγS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Cu(II) y Zn(II). Se empleó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 325 y 350 nm y se calculó posteriormente la relación de IF(350/325). Se aumentó a temperatura 3°C/min. de 37 a 98°C. Para el cálculo de la Tm se ajustaron los datos a una sigmoide.

Tabla 1: Valores de Tm de la HγS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Cu(II) y Zn(II). Los datos se obtuvieron a partir del ajuste a una ecuación sigmoideal.

Proteína	Tm (°C)
HγS	79.9±0.84
HγS+15eq Cu(II)	52.7±1.02
HγS+15eq Zn(II)	61.2±1.05

Se realizaron experimentos con 15eq de iones metálicos con el fin de corroborar el efecto de la concentración en la inducción de la agregación (Figura 2). Los resultados obtenidos para el caso del Cu(II) son muy similares a los ya descritos con 1.5eq, obteniéndose valores de turbidez de 4 durante los primeros 50 min. Sin embargo el tiempo medio de formación de los agregados disminuyó a la mitad (2.95 ± 0.5 min). Estos resultados indican que el mecanismo de inducción de la agregación es el mismo independientemente de la concentración de metal empleada, solo cambia la velocidad del proceso

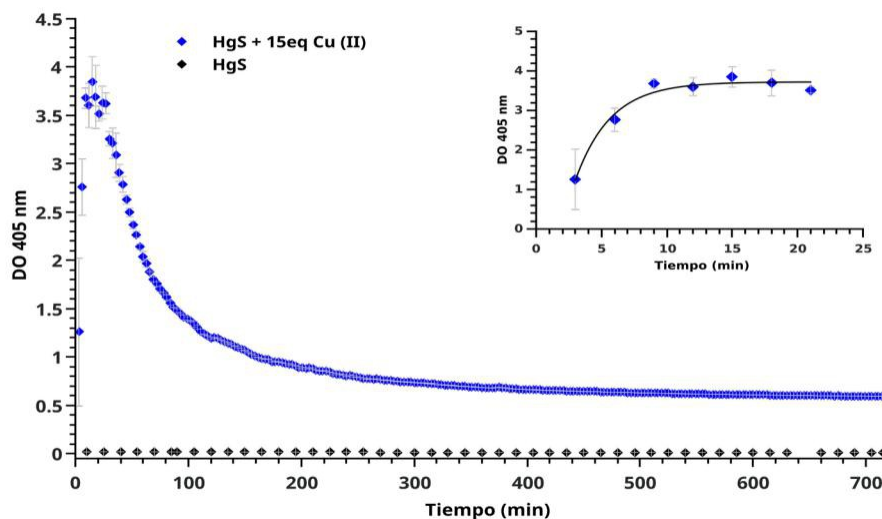


Figura 2: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HγS en ausencia (negro) y presencia de 15eq de Cu(II) (azul). La concentración de proteína fue de 1mg/mL. En el inserto se muestran los primeros 20 minutos de la cinética. La línea negra indica el ajuste de los datos a una ecuación exponencial.

Al igual que para el Cu(II), con el Zn(II) se realizaron experimentos en presencia de 15eq. Como se observa en la figura 3, una vez añadido el Zn(II), tiene lugar un aumento brusco de la turbidez hasta valores superiores a 3 durante los primeros 30 min de la cinética. Estos resultados son indicativos de la formación prácticamente instantánea de agregados insolubles de la proteína. Posterior a los 30 minutos, se observa una disminución en la turbidez, alcanzando valores de 1 a los 100 minutos. Esta disminución, como ya se mencionó anteriormente, se debe a la precipitación de una parte de los agregados que se forman. A los 220 min se observa una ligera disminución de la turbidez hasta valores de 0.8, manteniéndose prácticamente constantes durante el resto de la cinética (Figura 3). La inspección visual de la cubeta permitió observar la presencia de agregados blancos precipitados en la muestra. Los primeros 20 minutos de la cinética fueron ajustados a una ecuación sigmoideal y se obtuvo velocidad de formación de los agregados de 7.31 ± 0.25 min. Este tiempo resulta un poco mayor que el obtenido para el Cu(II); esto sugiere que la formación de agregados inducidos por Zn(II) ocurre más lentamente que para el caso del Cu(II).

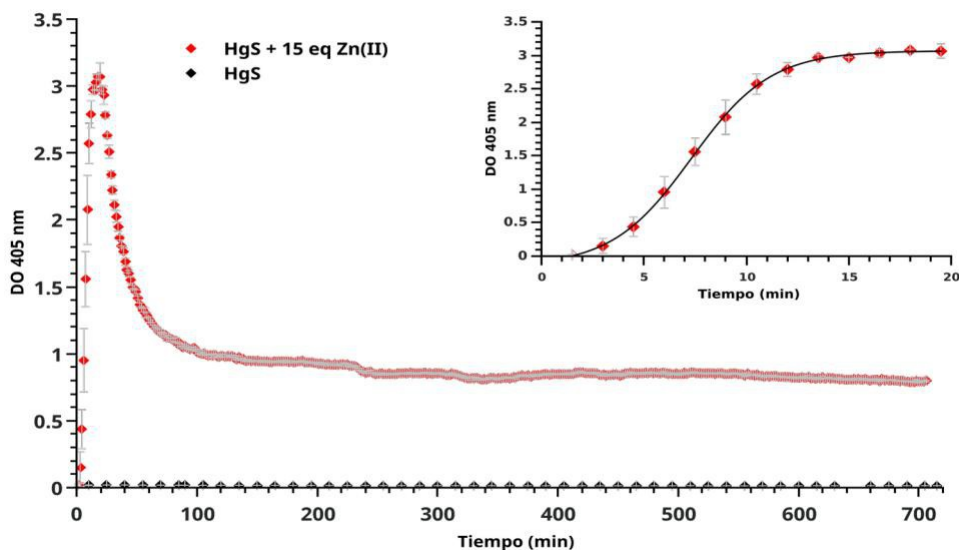


Figura 3: Cinética de agregación por turbidimetría a 405 nm de la HγS en ausencia (negro) y presencia de 15eq de Zn(II) (rojo). La concentración de proteína fue de 1mg/mL. En el inserto se muestran los primeros 20 minutos de la cinética. La línea negra indica el ajuste de los datos a una ecuación sigmoideal.

El aumento de la concentración de Cu(II) (15eq) provocó la formación de agregados de mayor tamaño (545 nm) desde el primer minuto de la cinética (Figura 4). Con el paso del tiempo se comprobó el aumento del radio hidrodinámico de los oligómeros, llegando a valores aproximadamente de 1.78 micras a los 100 min (Tabla 2). Por otro lado, la presencia de precipitados en la muestra disminuyó considerablemente la calidad de las curvas de correlación a partir del minuto 100 de la cinética. La inspección visual de la cubeta al finalizar el experimento nos permitió distinguir la presencia en la muestra de agregados de gran tamaño de color blanco. Estos resultados en concordancia, con los obtenidos por turbidimetría, indican que el Cu(II) induce la formación de agregados y este proceso es dependiente de la concentración de iones metálicos que se empleó.

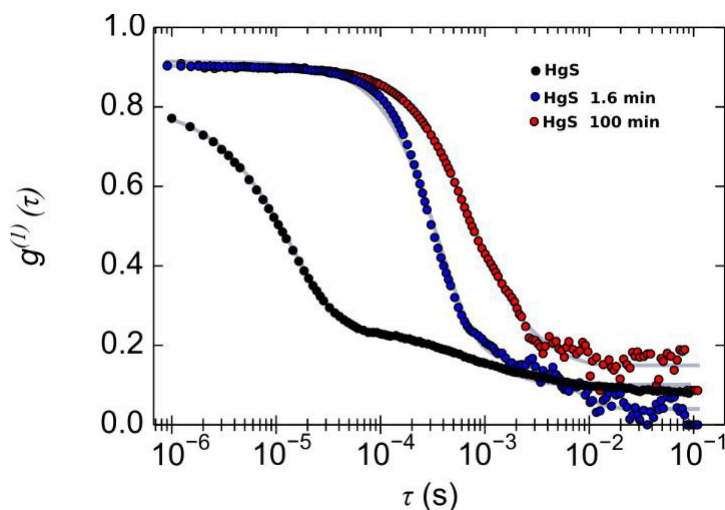


Figura 4: Curva de correlación de H₂S cristalina en ausencia (negro) y presencia de 15eq Cu(II) a diferentes tiempos de la cinética por dispersión dinámica de luz. En azul se muestra la curva de correlación al minuto 1.6 y en rojo al minuto 100.

Tabla 2: Radio hidrodinámico de H₂S cristalina en la medición inicial y final de la cinética con 15eq Cu(II).

Rh (nm)	1.6 min	100 min
H ₂ S +Cu(II)	545 (98%)	1782 (85%)

El aumento de la concentración de Zn(II) (15eq), por su parte, provocó la formación de agregados desde la primera medición (317 nm), sin embargo, estos fueron menores que los encontrados con 1.5eq (Figura 5). El análisis de la curva de correlación a los 700 minutos de la cinética mostró que el 85% de la señal se corresponde con agregados de 2.1 micras de radio (Tabla 3). Si bien al inicio se observaron agregados de menor tamaño, durante la cinética, el Zn(II) indujo la formación de agregados de mayor tamaño que los encontrados en presencia de Cu(II). Estos resultados pudieran sugerir que si bien ambos iones metálicos inducen la formación de agregados, estos pudieran ser diferentes. Otra diferencia para el caso del Zn(II), fue el hecho de que las curvas de correlación mantuvieron la calidad adecuada hasta tiempos posteriores a las 10 h de cinética. Esto pudiera deberse a que a pesar de que el Zn(II) parece inducir la formación de agregados más grandes, el proceso de precipitación de estos ocurre más lentamente.

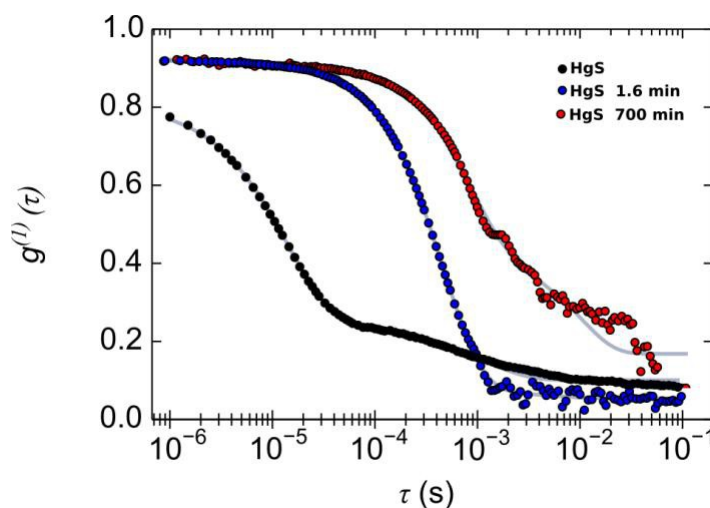


Figura 5: Curva de correlación de HyS cristalina en ausencia (negro) y presencia de Zn(II) a diferentes tiempos de la cinética por dispersión dinámica de luz. En azul se muestra la curva de correlación al minuto 1.6 y en rojo al minuto 700. En la tabla de la derecha se muestran los radios hidrodinámicos obtenidos para cada medición a los diferentes tiempos.

Tabla 3: Radio hidrodinámico de HyS cristalina en la medición inicial y final de la cinética con 15eq Zn(II).

Proteína	1.6 min	720 min
HyS + 15eq Zn(II)	317 (97%)	2165 (95%)

El aumento de la concentración de metal (15eq) provocó un aumento en la relación IF(350/325) hasta valores de 1.45, (Figura 6) comparables con los valores obtenidos para esta relación cuando la proteína se encuentra completamente desplegada. Estos resultados sugieren que el aumento de la concentración de Cu(II) provoca el desplegamiento total de la HyS cristalina en el tiempo.

Por su parte, en presencia de Zn(II) se observó un aumento de esta relación durante los primeros 20 min de la cinética hasta valores de 0.84 (Figura 29B). Este aumento es un indicativo como se mencionó anteriormente, de que el Zn(II) induce desplegamiento parcial o que una pequeña población de proteína se encuentra completamente desplegada. Posterior a este tiempo se observó una disminución de la relación IF(350/325) nm, alcanzando valores menores a 0.7 posterior a los 200 min de cinética. Esta disminución puede deberse a que durante la formación de los agregados, los triptofanos queden

nuevamente en un ambiente hidrofóbico y esto provoque la disminución de dicha relación. Los resultados obtenidos indican que el Zn(II) induce desplegamiento parcial de la HγS cristalina en el tiempo. El aumento de la concentración de Zn(II) produjo efectos similares (Figura 7): un aumento en la relación IF(350/325) durante los primeros 25 min (0.95) seguido de una disminución. Sin embargo posterior al minuto 200, se observa nuevamente un aumento ligero de la relación IF(350/325) nm hasta valores de 0.9. Estos resultados indican que el aumento de la concentración induce igualmente el desplegamiento parcial de la HγS cristalina en función del tiempo. Los resultados obtenidos por fluorescencia permiten sugerir que si bien ambos metales inducen desplegamiento parcial el mecanismo de agregación pudiera ser diferente.

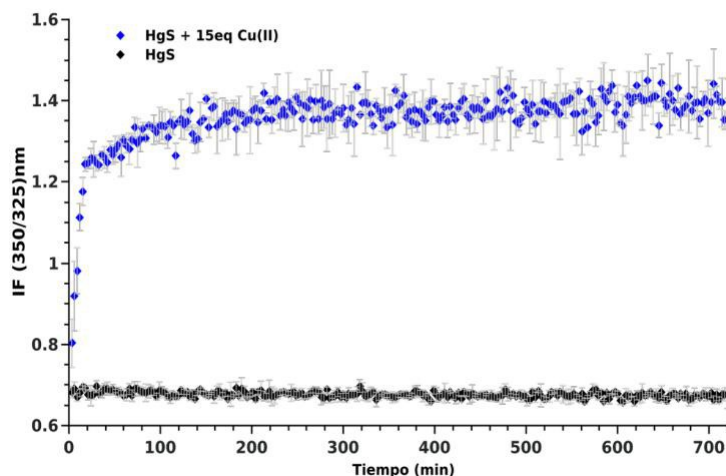


Figura 6: Relación de la intensidad de fluorescencia (350/325) nm con respecto al tiempo de HγS cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Cu(II). Se observa un aumento para el caso del Cu(II) mientras que para la HγS cristalina en ausencia de metales los valores de la relación se mantienen en valores correspondientes con el estado plegado de la proteína.

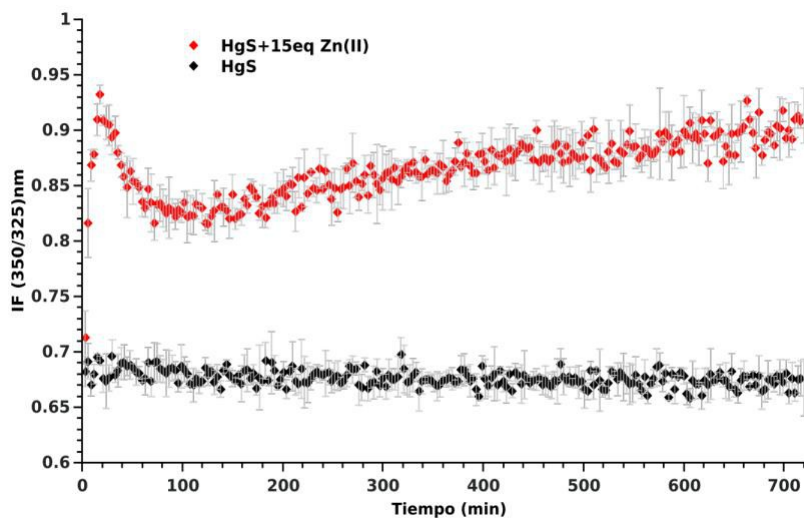


Figura 7: Relación de la intensidad de fluorescencia (350/325) nm con respecto al tiempo de H₂S cristalina en ausencia y presencia de 15eq de Zn(II). Se observa un aumento para el caso del Cu(II) y el Zn(II) mientras que para la H₂S cristalina en ausencia de metales los valores de la relación se mantiene en valores correspondientes con el estado plegado de la proteína.

Anexo 2: Búsqueda de inhibidores de la agregación de la HyS cristalina.

1. Introducción.

Las cataratas constituyen la primera causa de ceguera en el mundo (Pascolini y Mariotti 2012; Song *et al.* 2014; Liu *et al.* 2017a; Sieving *et al.* 2017) y hasta el momento el único tratamiento efectivo es la remoción quirúrgica del lente ocular. Este tipo de intervención no siempre es del todo satisfactoria además de que no está disponible para todas las personas por sus costos. Esto determina que la búsqueda de tratamientos preventivos para esta patología siga siendo un campo muy importante en las investigaciones relacionadas con esta enfermedad.

Diferentes compuestos han sido estudiados con el fin de evaluar su capacidad anti-cataratogénica. Varias moléculas pequeñas han sido estudiadas como agentes externos capaces de prevenir el desarrollo de cataratas. En este caso encontramos a la cafeína, la cual ha sido reportada como un compuesto efectivo para prevenir el daño en los lentes provocado por la radiación UV (Varma *et al.* 2010a). Por otro lado, la síntesis de antioxidantes bifuncionales retrasan la opacidad de los lentes expuestos a radiación gamma y disminuyen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Randazzo *et al.* 2011).

La mayoría de los estudios de inhibición se han enfocado en eliminar el agente causal de la enfermedad. Tal es el caso de la byakangelicina, principal componente de la raíz de *Angelica dahurics*, que disminuye la acumulación de sorbitol y por tanto la catarata inducida por galactosa (Shin *et al.* 1998), el ácido cítrico que inhibe el desarrollo de la catarata en ratas diabéticas (Nagai *et al.* 2010) y la cafeína que inhibe el estrés oxidativo en los lentes (Varma *et al.* 2010b).

En modelos animales de ratas diabéticas se han estudiado varias moléculas como posibles tratamientos preventivos de las cataratas. La aspirina fue de las primeras moléculas probadas, sin embargo solo al

administrarla combinada con carnosina se obtuvieron buenos resultados (Shi *et al.* 1987). De forma similar, la Vitamina K mostró ser efectiva para mantener la actividad de la bomba de calcio, la homeostasis del calcio y en última instancia inhibió el progreso de las cataratas en ratas diabéticas (Sai Varsha *et al.* 2014).

Los productos naturales también han sido ampliamente estudiados como posibles tratamientos preventivos debido a su alto contenido de antioxidantes. El extracto crudo de varias plantas tales como *Ocimum sanctum* (Halder *et al.* 2003), *Ginkgo biloba* (Ertekin *et al.* 2004), y *Adhatoda vasica* (Gacche y Dhole 2011) han mostrado capacidad de inhibir el estrés oxidativo, la acumulación de polioles y la actividad de la aldosa reductasa, respectivamente en modelos animales. Asimismo, la fracción de flavonoides de *Vitex negundo* mostró efecto en la actividad de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Rooban *et al.* 2006). Otras moléculas estudiadas incluyen la fracción de flavonoides aislada de la miel (Vit y Jacob 2008) y ácido egálico (Sakthivel *et al.* 2008).

Más recientemente Ishimori y colaboradores demostraron que el pirocatecol, que se produce cuando el café es tostado, restablece los valores de glutatión y ácido ascórbico, dos antioxidantes importantes en el lente, en cataratas inducidas por selenio (Ishimori *et al.* 2017). Asimismo, se ha comprobado que tanto el epigalato de galocatequina como el ácido elálgico tienen un papel importante como antioxidantes en modelos de cataratas inducidas por selenio, aumentando significativamente las concentraciones de glutatión que normalmente disminuyen en lentes con cataratas (Ergen *et al.* 2017). Por otro lado el tratamiento con el antioxidante trimetazidina disminuyó considerablemente la producción de especies reactivas del oxígeno en ratas con cataratas, reduciendo la opacidad del lente (Fang *et al.* 2019)

En el caso de la búsqueda de inhibidores *in vitro* los estudios se han enfocado hacia moléculas que modifiquen el estado nativo de la proteína o el intermediario parcialmente plegado. Con el empleo de técnicas espectroscópicas se demostró que el citrato de sodio interactúa con HyD cristalina y con una mutante, mostrando que la molécula interactúa con intermediarios de desplegamiento y promueve

interacciones estabilizantes (Goulet *et al.* 2009). Por otro lado, el fenilbutirato de sodio incrementa la solubilidad de una versión truncada de una mutante de HyD cristalina (Gong *et al.* 2010). La panteteína por su parte, disminuye la agregación de la proteína en solución y reduce la temperatura de la separación de fases (Friberg *et al.* 1996). En el caso de la agregación inducida por luz UV el resvetratrol, conocido antioxidante, inhibe la agregación (Wu *et al.* 2014) y la carnosina inhibe la degradación inducida por la radiación (Liao *et al.* 2014). El lanosterol, intermediario en la síntesis del colesterol, se demostró recientemente que es capaz de inhibir la formación de agregados de las α -cristalinas (Zhao *et al.* 2015)

En nuestro laboratorio se tiene experiencia con el estudio de inhibidores de fibras amiloides (Pelaez-Aguilar *et al.* 2015). En este sentido, contamos con varias moléculas que han sido empleadas para la inhibición de fibras amiloides, tal es el caso de la melatonina, una hormona que se ha visto que es capaz de interactuar con la proteína beta amiloide e inhibir la formación de hojas beta (Gunasingh *et al.* 2008). La tetraciclina es un antibiótico que ha traído buenos resultados en el tratamiento de la amiloidosis por beta 2 microglobulina (Giorgetti *et al.* 2011). La rifampicina es un antibiótico que inhibe la formación de fibras de la α -sinucleína (Li *et al.* 2004). El epigalato de galocatequina, principal componente del té verde, inhibe la formación de fibras de la amilina y de la cadena ligera lambda 6a (Meng *et al.* 2010; Pelaez-Aguilar *et al.* 2015). Por otra parte, la curcumina ampliamente utilizada como especia se ha visto que es capaz de inhibir la formación de fibras amiloides de la proteína beta amiloide (Yang *et al.* 2005).

Tomando en consideración los antecedentes de estas moléculas en la inhibición de fibras, en este trabajo se evaluó si estas moléculas también pueden inhibir agregados no amiloides de la HyS cristalina dañada con radiación UVB.

2. Metodología.

2.1 Ensayos de radiación.

Los ensayos de radiación se realizaron utilizando el mismo procedimiento que se describe en el epígrafe 5.10.

2.2 Preparación de los ligandos.

Para estos ensayos se emplearon cinco moléculas pequeñas: epigalato de calocatequina, rifampicina, melatonina, tetraciclina y curcumina. De todas las moléculas se preparó un stock 10 mM y se disolvió en una solución (50/50) v/v de etanol/agua. Se empleó una concentración de proteína de 50 μ M disuelto en Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl pH 8. Posterior a la radiación de la proteína por 2 h se añadió 1 eq de cada molécula y se incubaron las muestras por 12 h a 37°C. Se realizaron mediciones de turbidez a 405 nm y dispersión dinámica de luz a la proteína inmediatamente después de irradiada así como luego de 12 h incubadas con las moléculas.

3. Resultados

3.1 Ensayos de turbidimetría en ausencia y presencia de posibles moléculas inhibidoras.

La figura 1 muestra los valores de turbidez de la HyS cristalina irradiada por 2 horas e incubada por 12h a 37°C en ausencia y presencia de las diferentes moléculas empleadas. Se puede observar que las muestras de proteína incubadas con 1eq melatonina y tetraciclina mostraron valores de turbidez mucho menores que la proteína irradiada en ausencia de estas moléculas. Por el contrario el resto de las moléculas empleadas (rifampicina, epigalato y curcumina) no presentaron efecto inhibitorio de la agregación. Estos resultados indican que tanto la melatonina como la tetraciclina pudieran funcionar como posibles inhibidores de la agregación de la HyS cristalina en el tiempo.

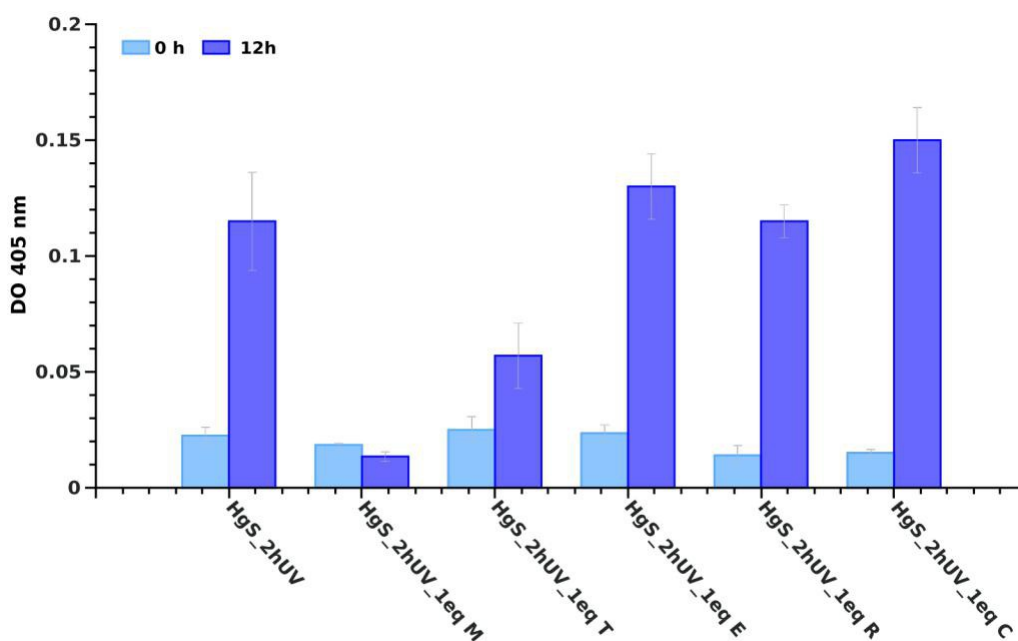


Figura 1: Turbidez a 405 nm de la proteína HyS cristalina irradiada en ausencia y presencia de diversos compuestos orgánicos. Se emplearon relaciones equimolares entre la proteína y las diferentes moléculas. M: Melatonina, T: tetraciclina, E: epigalato de galocatequina, R: rifampicina, C: curcumina.

3.2 Dispersión dinámica de luz en presencia de moléculas pequeñas.

En un intento por entender el mecanismo por el cual las moléculas pueden funcionar como inhibidores realizamos ensayos de DLS con la proteína inmediatamente después de irradiada y posterior al tiempo de incubación. Como se observa en la figura 2 la curva de correlación de la proteína después de irradiada (Figura 2A, azul) es una curva característica de una muestra polidispersa, donde se observa la proteína en diferentes estados oligoméricos. Uno de estos estados se corresponde con el monómero de radio 2.3 nm, mientras que la otra corresponde a un oligómero. Sin embargo la población correspondiente al monómero representa más del 85% de la señal. La curva de correlación correspondiente a la proteína irradiada por 2h e incubada 12h a 37°C (Figura 2A, magenta) muestra un corrimiento hacia la derecha que es reflejo de la formación de moléculas más grandes. Al comparar las curvas de correlación obtenidas (Figura 2D y 2F) en presencia de epigalato y curcumina podemos observar que en ambas se observa el mismo corrimiento de la curva hacia la derecha que se encontró en la proteína irradiada luego de 12h a 37°C, lo que es un indicativo de la presencia en la muestra de oligómeros de gran tamaño. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por turbidimetría, corroborando que el aumento de la turbidez en estas muestras se debe a la presencia de agregados de gran tamaño. Por otra parte, la inspección visual de estas cubetas mostró la presencia de agregados. Por el contrario, para el caso de la melatonina y la tetraciclina (2B y 2C) se pierde la correlación durante los primeros segundos de la medición, esto es un indicativo de la presencia en la muestra de moléculas con radios hidrodinámicos pequeños. Esto pudiera ser un indicativo de que en presencia de dichas moléculas se conserva una mayor población correspondiente a la forma monomérica de la proteína. Por otro lado, estas curvas de correlación muestran que además de la población monomérica, también están presentes oligómeros de mayor tamaño, sin embargo la carencia de turbidez (Figura 1) sugiere que estos oligómeros permanecen solubles. Estos resultados concuerdan con los resultados de turbidimetría, donde HyS en presencia de estas moléculas no presentó un aumento tan alto en la turbidez.

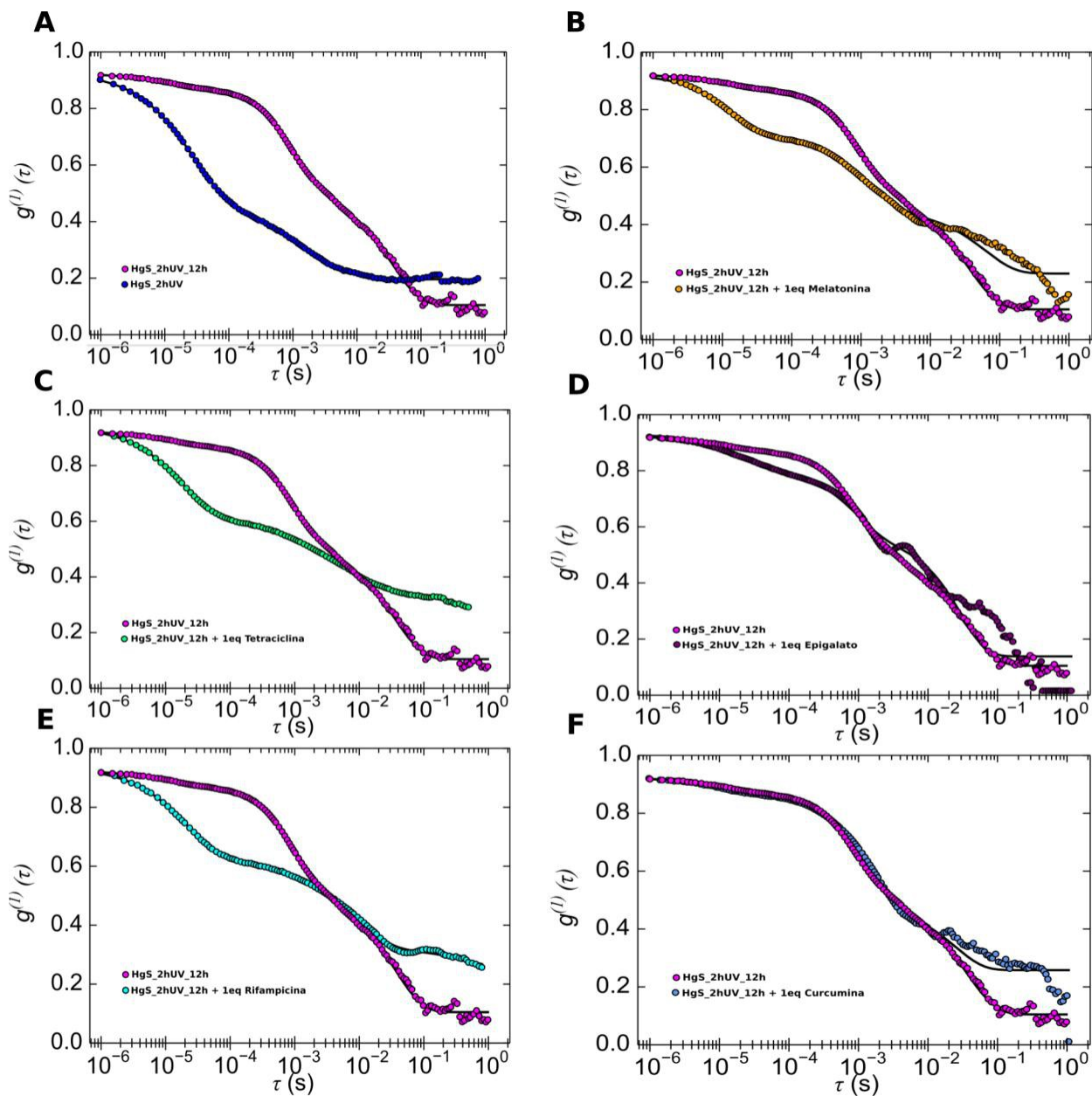


Figura 2: Curvas de correlación de la H₂S cristalina irradiada con UVB por 2h e incubada a 37°C por 12h (magenta) A) H₂S irradiada por 2h (azul oscuro), B) H₂S irradiada por 2h en presencia de 1eq de melatonina (naranja), C) H₂S irradiada por 2h en presencia de 1eq tetraciclina (verde), D) H₂S irradiada por 2h en presencia de Epigalato (morado), E) H₂S irradiada por 2h en presencia de rifampicina (cian) y F) H₂S irradiada por 2h en presencia de curcumina (azul claro).

Los resultados obtenidos tanto por turbidimetría como por dispersión dinámica de luz permiten sugerir que la melatonina y la tetraciclina inhiben la agregación de la H₂S cristalina. Además, los resultados de

DLS permiten sugerir que estas moléculas pudieran interaccionar con la forma monomérica de la proteína, estabilizándola e impidiendo la formación de agregados que generan turbidez en la muestra. Estos resultados son muy preliminares, por lo que este proyecto lo continuará una estudiante de licenciatura de nuestro laboratorio como su proyecto de tesis.

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **Efecto de iones metálicos y radiación ultravioleta en el desplegamiento y agregación de gamma cristalinas humanas** que presenta la alumna **Arline Fernández Silva (5620140501)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB-UAEM	Aprobado	
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	Aprobado	
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	Aprobado	
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís CEIB-UAEM	Aprobado	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	Aprobado	
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC-UAEM	Aprobado	
Dr. Carlos Daniel Amero Tello CIQ-UAEM	Aprobado	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2020-06-16 19:25:22 | Firmante

ypndMNHXeru909fdGwCxs5PuHkKqdrO0GaCjjeT4GHyl7AAJHvDPQU1ZZFX5PInSiGM7sza3T+FgxtYysCih0SonzEHnc0jAZO1/9Rw7vKK5Zfk/0Jlp9ZUubqX4yIH2CKbwHhxd0pt8J4lm7F9137BUN80CX1/RNFvnm76j8zpkjosaEgcwX8aIUTM3sQKrDSNFYNNWxZPQYH/7FWaU51fE6llvTievZ1wYBqQUbndlxqjvPubRLVOMjO8WH++jkyKpVa2Gpkmc87JaeroaTBLxPkS AKRCLYp3gFRRC+BIUIqo90RezHCudG7K0VRfmc7Yz9JsUtrAsl4Jye6w==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2020-06-16 19:30:26 | Firmante

Mbg113l/LS6MjXYKpl1XEJGdfSiKf9VdAnvzVP59UYRt7128fti5+noP1In8DhXcbvR7KpnNnLlp/4jnWHJgSpSbSYxjQjYlyYeUKxSN6UdOmXT2cGXie6N4k3cuO//Qfk+J3xLTPu51CUnwfoDc4inHkRmRuveVlezyOpZ4epzq9FrcnYKcsGZD0DruffHWItGPHsmcD2xexiSQvMt9+aMlkQ9nwwTqUUpIraPf2FiyZD4KT/Rsbln5i0aHh6yY9bRPYRoVfQ5Tf+GaActXQav4338s1qQIF0SdvORikPLTJXHCwFrzScdARRIR50n8oT6R3Ax7QSZy38LHIY4/A==

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2020-06-16 19:38:32 | Firmante

kKRyDUbgxAto87HRKGJqibQz12b8a2Agj3tEJvH25T7mLHNILwqNTzVko73oH5xCFB5+1O/K0F2qVvNks9h13hLxhr7n6+pcNCmTi6UuSLG0XgMCJ+Bgk20whbNkzAb87Okj5Cw8o/PGoieWC2OQhtxOcZwUw38NirGMbcP8fZi2deonv3Jx8OZ0w0Dw0b9BygX1OmmVi2GffXDMvPnFtlvAgBTDuQnaGovDwocEKd+rGwwKLGOMM2m1A+CtHoqi6dVJSpkdHjgkZzhhySLQM/z9QkboGxfGnXZfHRHnP5aqBpMhi5Nslb8PAd4X7SysPr5+fY/OmNkSqCR0b5g==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2020-06-16 20:11:44 | Firmante

SFMHR/KNVkdCxMloZPCAYrz8KHeP8RWGRnmAmy12+dvDuk1SnbyrVAe0psSYa+2MORVILgD9QKRKUzuZs3ySvO89ktB6nxTg/Vw2hiUKI8JSgmVxG+XAAK7NX7SI2Y/7Eix4x0G4n4IDTpnqzmzGLT/keTUx/5dmBM3imH32eP/WuOitUGssNDNZ3PPifUmv77afa0i95xd6MGRHNUo6c1nkNVy8zJDnJ68P+ur7dlSpDb/8hkc2ypPJ4/DunmFAZwHvCPNZ0dnVqs5Blv4vNn/O/j5eK8K/kCspV8WjFmWF2lvq85JuwEtiThPhK3eSjrlLhe6sQnmVfqFrgFnBUbg==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2020-06-16 20:57:42 | Firmante

egTtdOxOq8azddO6dFof+9bAcHqy/R8yu7zhq5Gt4T5PFjsVe6Rlqz2Ogb7Za3keOJVON6zFIA9NvXy1nFCsqWLeHAtTih9rMR//cQgzOV52DhtgrE/b4GxHoiZ/GVLoguSQWrs7WAgzHdW/XUveO4xbprLyo+RdyQ4sbOr2rgFf1Ulvw+TM/UMShLokFq0aus13bEuZK6412QCSZqOIBSSVY3qZibUuHxA0aSywaA/vBojjhMCeGp/gWfVg+vQGmVgqLgNqCgK4GLQsYBwTxYn+I4eBm4wyRzh9uK1CxGnKm22BThBjn35OpChRlZVUETGAMLYyxOTBqRhPQ==

ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA | Fecha:2020-06-17 08:49:59 | Firmante

sWlrfjOwsEsMMnSdwzZ0n0AT0UwWeLSUvin9rAQvt85Pm18KBZyclZLmJfv70dWWICLb6126nodw8FvEic0lvH/17M+HHb7dhM4/xncbiG3MCRn6aKm2Wxwxe5jXZdpUEXZeP48e4Ed8CAbR3OAOsUROIFyZcYUU5ACak6oaU+VV6t6/Wty9XuQacU+Rm07hi8Q0cNZXlw2muL/qnzwR42Hh43dWnvKDFYGVCMxIXUNhZcGHn63wqvxbq/sKGLV7FgJmCHMkCcRrC6m0A4foS0w6imCjYxf/Mho8OVs2/mZfrVBHd3cNeB5y2dKoviExeiLckDfa0WB79Zig82HniA==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2020-06-17 15:24:43 | Firmante

B6t+PfgS81zzELj0eYfy3N+I0pcQQPV4n3rtOx5LoOnZPd4yoLq9txqTy7CP86kZZSwd/z53ZlUoSHdDF8H6KExwNUpt6pEmqUYw58IUKwb3f+TreVcAPH2MSDm/c6JAffGH4DV SJhZcBook4y63MzRbwvC+ws3er0L/SbZuXzqUD1qDLsqRahNi3LUIB79DTouddyExtQHKUegzd74tkRw3rxosBdHyvyFfFv0608BH5JH+NzpiQkLgToYu3ixOK/kpmSbXZSgzsfWYsd+fbptMLkfmjr+JEZzqLNKkFW368GkNDT29tkJyijaCOKNDq+wPuO8B3zHtdg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



SsRj62

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ECOPVUC9z8q4QFkyEyzSvav0FnA3fzU>

