



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“EFECTO DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DE CRISTALINAS EN LA AGREGACIÓN DE LA GAMMA-S-CRIS-
TALINA HUMANA (H γ S)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

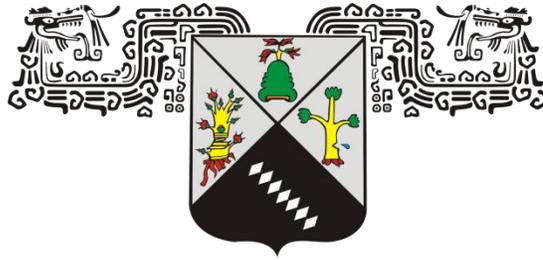
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

IBQ. ALMA PATRICIA GALINDO GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

**“EFECTO DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DE CRISTALINAS EN LA AGREGACIÓN DE LA GAMMA-S-CRIS-
TALINA HUMANA (H_γS)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

IBQ. ALMA PATRICIA GALINDO GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO

RESUMEN

La catarata es la pérdida de transparencia del cristalino, la lente natural del ojo, debido a la acumulación de agregados de proteínas y es la principal causa de ceguera a nivel mundial. Actualmente, es tratable por tratamiento quirúrgico, aunque este procedimiento es costoso e inaccesible en muchas regiones. Las cristalinas constituyen más del 90% de las proteínas del cristalino. Hay dos grupos principales de cristalinas: las α -cristalinas, que poseen actividad chaperona y las $\beta\gamma$ -cristalinas, tienen función estructural. Se ha encontrado un aumento significativo de la proteólisis de proteínas en el cristalino con cataratas y se sugiere que las cristalinas truncadas se vuelven menos solubles y pueden formar precipitados. Estudios de lentes envejecidos y con cataratas han demostrado la presencia de cantidades aumentadas de fragmentos de cristalina de bajo peso molecular, producto de la proteólisis de cristalinas. Para definir el papel de cuatro péptidos, α B- (1-18) (MDIAIHHPWIRRPFFPFH), α A- (70-88) (KFVIFLDVKHFSPEDLTVK), α A- (66-80) (SDRDKFVIFLDVKHF) y α B- (59-66) (PSWFDTGL), se evaluó su efecto sobre la agregación de HyS. La gamma-S-cristalina humana (HyS) es una de las más abundantes en el cristalino del ojo humano. Se utilizaron diversas técnicas biofísicas como la dispersión dinámica de luz, turbidimetría y fluorescencia. Los resultados mostraron que, si bien los péptidos inducen agregación de la proteína, no inducen desplegamiento de la HyS. Estos resultados pueden ser un evento clave en la agregación de cristalinas, relacionada con la edad y en la formación de cataratas.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Lina Rivillas, directora de este proyecto, por su confianza, apoyo y todos los aportes a la realización del mismo. Por haberme brindado la oportunidad de entrar a su laboratorio y sobretodo por su paciencia.

Al Dr. Carlos Amero y la Dra. Nina Pastor, por sus aportaciones, correcciones y recomendaciones a lo largo de la maestría.

A mis compañeros del grupo de investigación, la Dra. Arline Fernández y la Dra. Leydis French, por su ayuda y conocimientos. En especial a mis amigos, Diana, Ángel y Alan por ese sincero compañerismo que hacían el día más grato y llevadero.

A toda mi familia, mis padres, que sin duda alguna me han demostrado su apoyo incondicional en el transcurso de mi vida, por su amor y sacrificio. A mi hermana Magda, este logro también es tuyo, y con mucho amor a Coco.

A mi esposo, Leo, por compartir con tanta ilusión este trabajo, y brindarme el tiempo necesario para desarrollarme profesionalmente.

A mis amigos, por estar siempre a mi lado.

A todos, gracias.

ÍNDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Desarrollo, anatomía y fisiología del cristalino	2
1.2.1 Desarrollo del cristalino	3
1.2.2 Anatomía del cristalino	3
1.2.3 Funciones fisiológicas del cristalino	4
1.3 Cataratas.....	4
1.4 Cristalininas del lente	5
1.5 Factores de riesgo de cataratas	10
1.5.1 Modificaciones postraduccionales de cristalininas	11
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos particulares.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 Síntesis y purificación de los péptidos.....	18
4.2 Expresión de HyS.....	20
4.3 Purificación de HyS	21
4.4 Cinética de agregación por turbidez.....	21
4.5 Cinética de agregación por Dispersión Dinámica de Luz	22
4.6 Cinética de desplegamiento de HyS	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Expresión de HyS.....	23
5.2 Purificación de HyS	23
5.3 Estabilidad de HyS	26
5.3 Efecto de fragmentos peptídicos en la estabilidad de HyS	30
5.3.1. Estabilidad de los péptidos.....	30
5.3.2. Efecto del péptido α B- (1-18) en la agregación de HyS	32
5.3.3. Efecto del péptido α A- (70-88) en la agregación de HyS	34
5.3.4. Efecto del péptido α A- (66-80) en la agregación de HyS	36
5.3.5. Efecto del péptido α B- (59-66) en la agregación de HyS	38
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES	44
8. PERSPECTIVAS	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

Índice de figuras

Figura 1 El cristalino	3
Figura 2 Estructura terciaria de $\beta\gamma$ -cristalinas	9
Figura 3 Estructura tridimensional de HyS	9
Figura 4 Estructura química de los fragmentos derivados de cristalinas sintetizados. 15	
Figura 5 Síntesis de péptidos en fase solida (FMOC)	19
Figura 6 SDS-PAGE de la sobreexpresión de HyS	23
Figura 7 Purificación de HyS	25
Figura 8 Desplegamiento de HyS con GuHCl seguido por fluorescencia.....	26
Figura 9 Estabilidad térmica de HyS	27
Figura 10 Cinética de desplegamiento de HyS seguida por fluorescencia.....	27
Figura 11 Cinética de agregación por turbidez de HyS	28
Figura 12 Cinética de agregación por dispersión dinámica de luz de HyS	29
Figura 13 Estabilidad de los péptidos	31
Figura 14 Espectros de fluorescencia de los péptidos α B-(1-18) y α B-(59-66).	32
Figura 15 Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido α B-(1-18) por dispersión dinámica de luz y turbidez.	33
Figura 16 Cinética de desplegamiento de HyS en presencia del péptido α B-(1-18) seguida por fluorescencia.	34
Figura 17 Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido α A-(70-88) por dispersión dinámica de luz y turbidez.	35
Figura 18 Cinética de desplegamiento de HyS en presencia del péptido α A-(70-88) seguida por fluorescencia.	36
Figura 19 Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido α A-(66-80) por dispersión dinámica de luz y turbidez.	37
Figura 20 Cinética de desplegamiento de HyS en presencia del péptido α A-(66-80) seguida por fluorescencia.	38
Figura 21 Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido α B-(59-66) por dispersión dinámica de luz y turbidez.	39
Figura 22 Cinética de desplegamiento de HyS en presencia del péptido α B-(59-66) seguida por fluorescencia	39

Índice de tablas

Tabla 1 Modificaciones postraduccionales identificadas en HyS	13
Tabla 2 Péptidos de bajo peso molecular en lentes humanas	16
Tabla 3 Péptidos sintetizados	19
Tabla 4 Péptidos evaluados en este estudio	30
Tabla 5 Radios hidrodinámicos en presencia de los péptidos estimados por DLS	42

Abreviaturas

HyS gamma S-cristalina humana

OMS Organización Mundial de la Salud

sHSP proteínas de choque térmico

UV ultravioleta

RMN resonancia magnética nuclear

Fmoc 9-fluoronilmetoxycarbonilo

DIC N,N'-diisopropilcarbodiimida

TFA ácido trifluoroacético

HPLC cromatografía líquida de alto rendimiento

IPTG isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

DLS dispersión dinámica de luz

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Introducción

Las cristalinas son las principales proteínas en las células de fibra alargada de los lentes oculares, presentes en concentraciones de 200-400 mg/ml y son responsables de la transparencia como del alto índice de refracción del cristalino (Fernald & Wright 1983). Experimentan muy poca renovación después de la síntesis, pero llegan a experimentar cambios durante el envejecimiento y la cataractogénesis (Ottonello et al. 2000). La cataractogénesis es el proceso de formación de cataratas (Andjelic & Hawlina 2012). La catarata, puede definirse como la pérdida de transparencia del cristalino, y es un problema de discapacidad visual a nivel mundial afectando a más de 65 millones de personas (WHO 2019). Es tratable por la extracción de la lente y la inserción de una prótesis intraocular artificial, pero este procedimiento es costoso y es inaccesible en países de bajos ingresos, además de posibles complicaciones (Lam et al. 2015).

Las cristalinas humanas se organizan en tres clases, α , β y γ cristalinas. Las α -cristalinas, que son pequeñas proteínas de choque térmico; las β -cristalinas, diméricas y oligoméricas, y las γ -cristalinas, monoméricas. Las α -cristalinas pueden suprimir la formación de agregados de las $\beta\gamma$ -cristalinas (Bloemendal et al. 2004). Mientras que las $\beta\gamma$ -cristalinas contribuyen en la estructura, transparencia e índice de refracción de la luz del lente ocular (Andley 2007).

Algunas modificaciones postraduccionales parecen ser parte del proceso de maduración normal (Lapko et al. 2003), y otras, podrían afectar negativamente la conformación de las cristalinas, el estado de agregación o solubilidad. Estas pueden incluir desamidación, fosforilación, oxidación entre otras (Hoehenwarter et al. 2006). Se ha encontrado un aumento significativo de la proteólisis de proteínas en el cristalino con cataratas y se sugiere que las cristalinas truncadas se vuelven menos solubles y pueden formar precipitados (Harrington et al. 2007). Además, de que el cristalino está sometido a un constante estrés oxidativo atribuible en gran parte al efecto de la radiación ultravioleta (Udupa & Sharma 2005).

Estudios previos han demostrado la presencia de fragmentos peptídicos de bajo peso molecular en la lente, derivados de la degradación de α , β y γ cristalinas (Santhoshkumar et al. 2008). Barber 1973, reportó que en el cristalino humano la cantidad de proteínas

degradadas aumentaba conforme a la gravedad de la catarata (Barber 1973), y también encontraron que la cantidad de cristalina degradada en lentes envejecidos y con catarata era del 20 al 25 % de la proteína total (Srivastava et al. 1996). Se plantea la hipótesis de que la catarata se desarrolla como resultado de la interacción inadecuada de los fragmentos de cristalina generados por la proteólisis y que los mismos tienden a acumularse. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de agregación inducidos por estos fragmentos.

En este estudio nos centramos en la gamma S-cristalina humana (HyS), una proteína estructural principal del cristalino del ojo humano (Robinson et al. 2006) para explorar el efecto de varios fragmentos peptídicos derivados de cristalinas en la estabilidad y agregación de la proteína. Estos eventos podrían tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

1.2 Desarrollo, anatomía y fisiología del cristalino

El cristalino es un esferoide pequeño y transparente situado detrás de la córnea del ojo y su función principal es enfocar la luz con precisión utilizando sus propiedades de alto índice de refracción en los fotorreceptores de la retina para permitir una visión espacial adecuada (Iribarren 2015; Aliancy & Mamallis 2017). Está constituido por una alta concentración de proteínas que le confieren dicha agudeza visual, con un índice de refracción más elevado a los fluidos que lo rodean, alrededor de 1.42 y 1.47 (Michael et al. 2003; Bassnet 2009). El índice de refracción de la córnea es aproximadamente de 1.37 y detrás, está rellena con el líquido humor acuoso, el cual tiene un índice de refracción de 1.33 (Hecht 1987).

El cristalino consta de las capas celulares epiteliales, corticales y nucleares, todas derivadas del ectodermo de la superficie embrionaria. El núcleo de la lente consta de celdas de fibras primarias dispuestas en una matriz ordenada. Las celdas de fibra secundarias pueden tener una longitud de pocos mm rodeando la región del núcleo de la lente. Las células de fibra están llenas de proteínas llamadas cristalinas. Hay tres cristalinas principales de vertebrados, las α , β y γ cristalinas que representan un 90 % del contenido total de proteínas solubles y 35 % de la masa total de la lente (Takemoto & Sorensen 2008; Vendra et al. 2016).

1.2.1 Desarrollo del cristalino

El cristalino es un tejido encapsulado de un material similar a una membrana basal de colágeno, laminina y proteoglucanos que contribuyen al moldeado de la forma de la lente (Kuszak 1992), compuesto por una sola capa de células epiteliales en la superficie subcapsular anterior. Durante el desarrollo del cristalino, en la zona ecuatorial las células epiteliales comienzan a diferenciarse, alargándose para convertirse en células de fibra (Figura 1). Se diferencian terminalmente en un proceso de tipo apoptótico que degrada todos los organelos, incluyendo el núcleo (Lovicu & McAvoy 2005). Este proceso limita la dispersión de la luz necesaria para la transparencia y refracción de la lente.

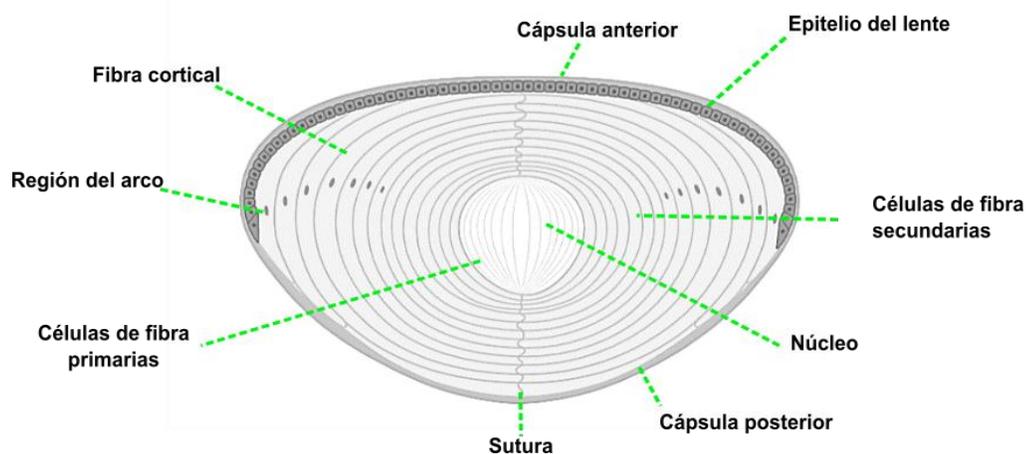


Figura 1. El cristalino. Creado en BioRender.com. En la región del arco del cristalino, las células epiteliales se alargan para convertirse en células de fibra. Después del alargamiento pierden sus organelos y comienzan a formar células de fibra recién diferenciadas.

Por lo tanto, las proteínas de la región central del cristalino que se expresaron en el útero no experimentan regeneración, no poseen maquinaria de reparación celular. El cristalino agrega continuamente capas de células a estas células previamente diferenciadas a lo largo de la vida (Bassnett 2002; Bassnett 2009; Sharma & Santhoshkumar 2009; Whitley et al. 2017).

1.2.2 Anatomía del cristalino

El cristalino es una lente biconvexa que se encuentra por delante del humor vítreo y por detrás del iris y humor acuoso, hallándose unido a los procesos ciliares por la zónula de Zinn. Este lente no dispone de riego sanguíneo propio, siendo el humor acuoso el

encargado de proporcionarle los elementos necesarios para su metabolismo y la capacidad de eliminar sus productos de desecho. La curvatura es mayor en la cara posterior que en la anterior. A los centros de dichas caras se les conoce como polo anterior y posterior, mientras que la línea que los une se llama eje y la distancia que los separa, espesor. La circunferencia que delimita las dos caras mencionadas se le denomina ecuador y el diámetro del mismo se le conoce como diámetro del cristalino (Le Grand & El Hage 1980).

1.2.3 Funciones fisiológicas del cristalino

Las funciones fisiológicas más importantes del cristalino son; la acomodación, lograda mediante la contracción y relajación coordinadas de las zónulas y los músculos ciliares que le permiten cambiar de posición; absorción de la luz ultravioleta, la lente puede proteger a la retina del daño; y refracción, puede enfocar la luz entrante (Glasser 2006; Chen et al. 2017).

1.3 Cataratas

La catarata es una afección que consiste en la opacificación del cristalino cuando el pierde su transparencia provoca que la luz se disperse al interior del ojo y no se pueda enfocar en la retina, dando lugar a una imagen borrosa (Lam et al. 2015; Sabanayagam & Cheng 2017). Actualmente, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), afecta a más de 65 millones de personas en el mundo, en su mayoría a personas mayores de los 50 años y se espera que esta cifra aumente debido al aumento de la esperanza de vida de la población (WHO 2019). La prevalencia de cataratas en México es bastante alta; se estima que en el 2013 había 2.3 millones de personas con esta discapacidad (Deloitte 2014). Hay más casos de cataratas a nivel mundial que de glaucoma, degeneración macular y retinopatía diabética juntas. El principal síntoma de la catarata es la pérdida lenta y progresiva la de visión. Clasificadas por tipos predominantes, las cataratas pueden ser congénitas, relacionadas con la edad o secundarias. Las cataratas congénitas o juveniles pueden tener graves consecuencias visuales sobre la maduración visual y el desarrollo de la ambliopía, representan aproximadamente el 30 % ceguera en los bebés (Thompson & Lakhani 2015). Mientras que las cataratas relacionadas con la edad son responsables de casi la mitad de todas las cegueras a nivel mundial (Beebe et al. 2010; Andjelic & Hawlina 2012).

1.4 Cristalinas del lente

α -Cristalinas

α -Cristalina nativa es un oligómero con un tamaño superior de 300 kDa que consta de hasta tres tipos de subunidades monoméricas en intercambio dinámico, y pertenece a la familia de proteínas de choque térmico (sHSP). Los dos principales monómeros de α -cristalina son el producto de los genes, α A y α B, que son idénticos un 60 % en estructura primaria (Hoehenwarter et al 2006). α A con un peso molecular alrededor de 20 kDa y α B de 22 kDa. Al ser un miembro de las sHSP, todas contienen un “dominio de α cristalina”, una secuencia consenso común a todos los miembros de la superfamilia. Las α -cristalinas previenen el aumento de la dispersión de la luz (Andley 2007) y son unas de las principales proteínas del lente, con una abundancia de hasta el 40 % de proteína total (Wang & Spectors 1994). La estructura secundaria de las subunidades de α -cristalina se encuentra principalmente en forma de hojas β , y un patrón de plegamiento clásico similar a la inmunoglobulina (Mornon et al. 1998). Estudios de resonancia magnética nuclear muestran que las regiones C-terminales son más flexibles que la región N-terminal (Carver & Linder 1998). La molécula de α -cristalina es un oligómero dinámico, cuyas subunidades se disocian y reasocian constantemente (Horwitz 2000; Horwitz 2003; Bloemendal et al. 2004). La proporción molar de α A y α B, es aproximadamente 3:1 o 2:1 en diferentes regiones de la lente. Tanto α A como α B se encuentran en las células epiteliales del cristalino, pero su síntesis está fuertemente regulada por la diferenciación de las células fibrilares del cristalino (McAvoy 1978). Muestran propiedades similares a las chaperonas al suprimir la agregación de otras proteínas (Bhattacharyya et al. 2006), manteniendo la transparencia y solubilidad de las proteínas en la lente (Horwitz 2003). Horwitz demostró que α -cristalina exhibe tales propiedades *in vitro*, y propuso que la α -cristalina inhibía la agregación térmica de β -cristalina.

Adicionalmente las α -cristalinas son fuertemente anti-apoptóticas; estudios han demostrado que interactúan directamente con caspasa-3, Bcl-X y Bax. Las α -cristalinas inhiben la apoptosis inducida por los rayos UV mediante la regulación de las vías de señalización PKC α , RAF/MEK/ERK y AKT (Liu et al., 2004). En condiciones de estrés, una regulación positiva de la α B-cristalina protege contra la muerte celular (Nagaraj et al., 2016).

Por otra parte, la α B-cristalina se encuentra en el sistema nervioso central y es un componente proteico importante de las fibras de Rosenthal, que se acumulan masivamente en el cerebro de pacientes que padecen la enfermedad de Alexander (Ikawi et al. 1989), y diversas enfermedades neurológicas como Creutzfeldt-Jacob (Renkawek et al. 1992), Alzheimer (Lowe et al. 1992), Parkinson (Ikawi et al. 1992), entre otras.

β - y γ -Cristalinas

La superfamilia de $\beta\gamma$ -cristalinas comparte un pliegue nativo organizado en dos dominios estructurales. Los dominios, a su vez, están formados por dos motivos de llave griegos consecutivos, cada uno de los cuales consta de cuatro hebras β que se intercalan y disponen el dominio en una conformación de hoja β antiparalela (Figura 2). El núcleo de cada dominio es altamente hidrófobo y la secuencia es usualmente rica en residuos aromáticos y cisteínas. La superficie está muy cargada, pero el pI es casi neutro para las γ -cristalinas. Las β -cristalinas existen como homo o heterodímeros que pueden disociarse en monómeros o asociarse en oligómeros de mayor peso molecular, mientras que las γ -cristalinas son monoméricas (Heitmancik 2008; Xi et al. 2014). Aunque la catarata puede ser inducida por numerosos factores, la precipitación de las mismas es uno de los puntos clave, tanto en cataratas congénitas como por envejecimiento (Lam et al. 2015).

Las β -cristalinas se pueden dividir en una familia de polipéptidos ácidos (β A1, β A2, β A3, y β A4) y básicos (β B1, β B2 y β B3) (Jaenicke et al. 2001; Graw 2004). Constituyen aproximadamente el 35 % del contenido total de cristalinas (Vendra et al. 2012). Los monómeros tienen masas entre 22 y 28 kDa, mientras que los oligómeros pueden llegar hasta 200 kDa (Graw 2009). Los genes de la cristalina β B1 y β B3 se expresan temprano en el desarrollo lenticular, por lo que sus proteínas se encuentran principalmente en el núcleo del cristalino. β B2 se ve como la principal de la familia y las β -cristalinas ácidas se encuentran en todo el cristalino, núcleo y la corteza (Hoehenwarter et al 2006)

Las γ -cristalinas son los miembros más pequeños y simples de las cristalinas, con un peso molecular de cerca de 21 kDa, codificadas por siete genes γ A, γ B, γ C, γ D, γ E, γ F y γ S. Las γ -cristalinas se caracterizan por ser un grupo de proteínas monoméricas altamente estables a la desnaturalización térmica con temperaturas de hasta 80°C, así como resistencia a urea y cloruro de guanidinio 2-3 M (Kosinski-Collins & King 2003; Serebryany & King 2014). El origen preciso de esta alta estabilidad termodinámica sigue siendo objeto

de intensas investigaciones. Aunque a menudo se ha propuesto que la naturaleza intercalada y compacta de la llave griega doble produce proteínas altamente estables, este argumento se aplica solo hasta cierto punto. Las β -cristalinas, que comparten el mismo pliegue en llave griega, son significativamente menos estables termodinámicamente, tanto a la desnaturalización térmica como a la química (Mayr et al. 1997).

Sólo las cristalinas γ C, γ D y γ S se expresan en una concentración apreciable en el ojo humano, comprenden el 7 %, 11 % y 9 % respectivamente (Robinson et al. 2006), del contenido total de proteínas estructurales del cristalino. γ C y γ D son sintetizadas durante la etapa embrionaria, mientras que γ S se sintetiza después del nacimiento (Vendra et al. 2012; Vendra et al. 2016). La cristalina γ S, es la única γ -cristalina detectada en todas las especies de vertebrados presente en numerosos tejidos fuera del cristalino (Van Rens et al. 1989).

Gamma-S-cristalina humana (H γ S)

La cristalina H γ S, una proteína estructural principal del cristalino del ojo humano, comprende cerca del 9 % del contenido total de cristalinas (Robinson et al. 2006). La H γ S está altamente conservada en evolución y se expresa tardía pero abundantemente en las regiones corticales del cristalino. Altos niveles de H γ S marcan las fibras corticales de la lente madura, las mismas afectadas por la catarata (Sinha et al. 2001). Su estructura tridimensional fue resuelta por espectroscopia de RMN (Wu et al. 2005) y consta de 177 residuos que se pliegan en dos dominios, el N-terminal y C-terminal, cada uno con dos motivos de llave griega en hojas β intercaladas. Los residuos 88-93 forman la interfaz entre los dominios y permite que se forme una molécula globular compacta (Grishaev et al. 2005; Vendra et al. 2016). Es codificada por el gen CRYGS, se parece en estructura y secuencia a las otras γ -cristalinas pero es el miembro más divergente de la familia, difiere principalmente en la región de la interfaz entre los dominios. La región enlazadora es un residuo más larga en γ S que en γ B, mientras que en las γ -cristalinas restantes es un residuo más corta (Zarina et al. 1994). Muestra alta conservación entre especies, con una identidad de secuencia respecto a la proteína humana del 89 % en murino y 91 % en bovino (Sun et al. 2005). El gen también se expresa fuera de la lente, particularmente en la retina y la córnea maduras (Sinha et al. 1998).

Es importante destacar el papel que juegan los residuos aromáticos en la estructura y estabilidad de la proteína; H γ S esta constituida por 14 Tyr, 4 Trp y 9 Phe. De éstos, la

tirosina está involucrada en la conformación de los motivos de llave griega, al localizarse en lo que se ha denominado la esquina de tirosina (Figura 2) (Hemmingsen et al. 1994). La esquina de tirosina, donde un residuo de tirosina cerca del inicio o el final de una cadena β antiparalela se une por medio de enlaces H desde su grupo OH de cadena lateral a la cadena principal NH o CO de un residuo cercano. En la HyS se encuentra conformada por Y60, Y67 y W73 en un dominio, y Y150, Y157, W163 en el otro (Purkis et al 2002).

Además de Tyr, la agrupación de las cadenas laterales aromáticas dentro del interior de la molécula es una característica que permite que las γ -cristalinas adquieran una forma compacta con todos los residuos no polares enterrados dentro. Los Trps en HyS están en las posiciones 47, 73, 137 y 163 (Figura 3). El contenido de triptófanos permite el empleo de la espectroscopia de fluorescencia. La variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca de Trp y el tiempo de vida de las proteínas se explota ampliamente para seguir los cambios en la estructura de la proteína, como el estado plegado / desplegado, la unión de ligandos, e interacciones (Callis & Liu 2004). El triptófano tiene una longitud de onda de máxima absorción a 280 nm y un máximo de emisión que va desde 300 hasta 350 nm, dependiendo del ambiente local de los triptófanos. Por ejemplo, si una proteína que contiene triptófano en su núcleo hidrofóbico se desnaturaliza por aumento de temperatura, hay un cambio en el espectro de emisión hacia el rojo debido a la exposición del triptófano a un ambiente acuoso. A diferencia de la adición de un surfactante, este causará un cambio al espectro azul si el triptófano está incrustado.

Las reacciones fotoquímicas de Trp en las cristalinas pueden desempeñar un papel clave en las cataratas (Chen et al. 2008). Por lo tanto, las mediciones de fluorescencia intrínseca nos proporcionan información valiosa sobre el estado conformacional de la proteína.

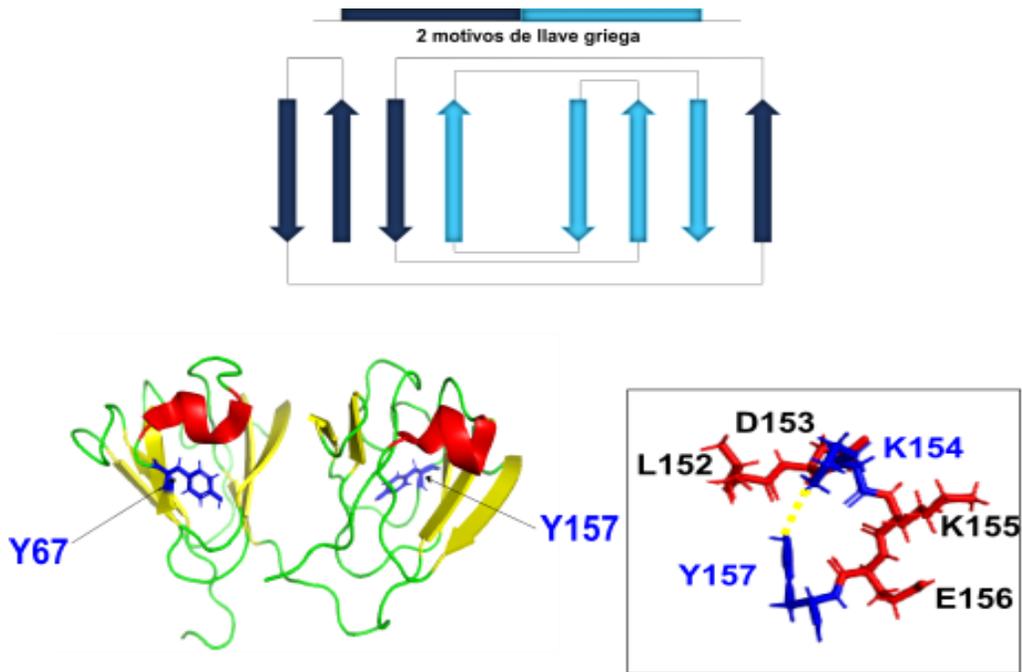


Figura 2. Estructura terciaria de $\beta\gamma$ -cristalinas. El motivo en llave griega representado (arriba). Estructura de cristalina HyS y sus esquinas de Tyr (abajo). PDB: 2M3T. El recuadro muestra sólo la esquina de tirosina del dominio C-terminal; los residuos intermedios están en rojo. Se forman enlaces de hidrógeno (amarillo), donde el hidrógeno Tyr157 se une al nitrógeno de la cadena principal Lys154 (azul).

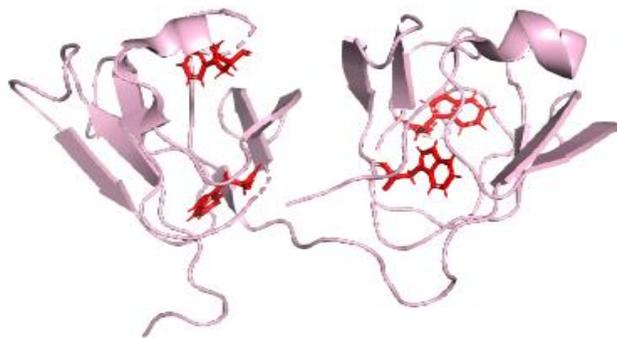


Figura 3. Estructura tridimensional de HyS. Muestra los cuatro Trp conservados de vertebrados. Trp 47 y Trp 73 en el dominio N-terminal, Trp 137 y Trp 163 en el dominio C-terminal. PDB: 2M3T.

1.5 Factores de riesgo de cataratas

Entre los factores de riesgo que pueden producir las cataratas, los más comunes han sido asociados a la edad, el tabaco, radiaciones ultravioleta, y algunos fármacos (como los corticoides). Asimismo, el desarrollo es acelerado por afecciones como la diabetes mellitus. Dentro de todos los factores de riesgo, el más determinante es la edad debido al desgaste de las proteínas del lente. Las cristalinas acumulan distintos daños a lo largo de la vida y a su vez producen modificaciones postraduccionales que pueden inducir un cambio conformacional que después van a promover la agregación o formación de cataratas (Takemoto & Sorensen 2008; Mishra et al. 2012). Las modificaciones de mayor incidencia que se han observado incluyen desamidación, oxidación, fosforilación, formación de puentes disulfuro y proteólisis (Truscott 2005).

La exposición a los rayos UV causa daño acumulativo en los tejidos que componen el ojo. Cuando envejecemos la capacidad del ojo de filtrar la luz UV disminuye un 12 % por década (Ferrer et al 2009). La radiación del tipo UVA (320-400 nm) es la más dañina, y se relaciona con cambios estructurales en diferentes residuos que desestabilizan las proteínas (Alvarez 1995). A lo largo de los años, el estrés oxidativo se vuelve más importante debido a la disminución de los niveles de glutatión y enzimas antioxidantes, conduciendo a la agregación, insolubilidad y fragmentación de cristalinas (Patel et al 2012).

Se ha sugerido que las mutaciones puntuales de cristalina que se ven en cataratas congénitas con un patrón de herencia mendeliana (Shiels 2007), pueden conducir a perturbaciones en la estructura, que conducen a la agregación intermolecular. Entre las γ -cristalinas, existen al menos 30 mutaciones reportadas en γ C, γ D y γ S (Vendra et al 2016).

La catarata parece ser el resultado de la descomposición espontánea de las cristalinas y los análisis proteómicos recientes han permitido identificar las modificaciones y los sitios de estas modificaciones dentro de cada polipéptido (Srivastava et al. 2017). En la tabla 1 se resumen algunos sitios de modificación identificados en H γ S. Éstos podrían ampliar nuestra comprensión y aclarar los mecanismos subyacentes a la patogénesis de la enfermedad.

1.5.1 Modificaciones postraduccionales de cristalinas

Desamidación

La desamidación introduce una carga negativa cuando un grupo amida se reemplaza con un carboxilato en Asn y Gln; puede provocar cambios en la estructura terciaria, y a su vez su función, ocasionando desplegamiento. Se ha descrito como uno de los factores que limitan la vida útil de las proteínas y ocurre en un grado significativo en cristalinas a medida que envejecen (Ray et al. 2016; Zhang et al. 2018). Su efecto ha sido estudiado *in vitro*. Chaves y colaboradores examinaron el efecto de desamidación de Asn101 y Asn123 sobre la estructura y función de la chaperona de α A-cristalina humana, encontrando cambios en la estructura secundaria y terciaria, y una disminución pronunciada en su actividad. De la misma forma ocurre en α B-cristalina humana en el caso de Asn146 y Asn78 (Chaves et al. 2008). El efecto de desamidación de β -cristalinas también muestra una alteración de la estructura terciaria, para el caso de β A3 en Asn133, Asn155 y Asn120 (Takata et al. 2008), mientras que la desamidación de Gln70 y Gln162 en β B2 conduce a la desestabilización del dímero nativo y los cambios estructurales son mínimos (Lampi et al. 2014). Durante el desplegamiento, las cristalinas desamidadas se agregan rápidamente y no son rescatadas por la cristalina chaperona; efectos similares han sido observados en la desamidación de HyD y HyS. En HyS, la desamidación de Asn76 conduce a una disminución en la estabilidad durante el desplegamiento químico (Forsythe et al. 2019).

Oxidación

La oxidación de proteínas implica la modificación inicial de grupos de cadena lateral de aminoácidos inducida por especies reactivas de oxígeno o durante una reacción con los subproductos del estrés oxidativo. La lente ocular está bajo constante estrés oxidativo con el envejecimiento por el debilitamiento progresivo del sistema antioxidante (Ferrer et al. 2009), el daño a las cristalinas parece ser en gran parte atribuible al efecto de los rayos ultravioleta, y H_2O_2 . La reacción de oxidación de proteínas de más incidencia involucra dos residuos Met y Cys, en los que Met se oxida en sulfóxido de metionina y la oxidación en la cisteína forma enlaces disulfuro y radicales tiol. Además, los residuos Tyr, Trp e His también pueden sufrir oxidación. Tyr se puede convertir en ditirosina, radicales libres y peroxi-nitrato. Trp puede convertirse gradualmente en quinurenina y sus derivados. His puede dar como resultado la formación de múltiples productos de descomposición incluidos el ácido

aspártico, la asparagina y la urea (Pattison et al. 2012; Zhang et al. 2013). Todos estos productos inducidos por el daño directo de la radiación UV.

Para estudiar el papel de la oxidación en lentes envejecidas, se han generado agregados de proteínas *in vitro* por oxidación de los grupos SH- en las α , β y γ -cristalinas. Rajan y colaboradores mostraron que la oxidación de α A y α B altera significativamente su estructura secundaria y terciaria y provoca una pérdida de alrededor del 50 % en la actividad de chaperona (Rajan et al. 2006).

Fosforilación

La fosforilación desempeña un papel importante en la regulación de varias vías de bioseñalización en relación con los procesos metabólicos y funciones celulares que pueden inducir la formación de cataratas (Huang et al. 2011). Las cristalinas tienen varios sitios de fosforilación y algunos estudios han demostrado que la fosforilación puede modular la actividad de chaperona de α -cristalinas. Los sitios más predominantes en cristalinas β B1 y β B2 son Ser81 y Ser93, respectivamente. La fosforilación de α B-cristalina se distribuye en Ser19, Ser21, Ser59 y Ser139. También se identificó la Ser75 en HyD (Huang et al. 2011).

Metilación

Las γ -cristalinas son ricas en cisteínas y son las cristalinas con enlaces disulfuro más abundantes presentes en los agregados de alto peso molecular en cataratas nucleares (Lapko et al. 2003). La metilación de residuos de cisteína evita su participación en el enlace disulfuro intermolecular que conduce al entrecruzamiento de proteínas, agregación y eventualmente las cataratas, por lo que se ha planteado como un mecanismo protector. Las γ -cristalinas están metiladas en cisteínas específicas, γ D en Cys110, mientras que γ C y γ B en Cys22 y Cys79 (Wilmarth et al. 2006).

Puentes disulfuro

Un enlace disulfuro o enlace SS, es un enlace covalente muy fuerte entre grupos tiol -SH de dos cisteínas. La formación de enlaces disulfuro puede causar cambios conformacionales en la proteína o la formación de oligómeros (Hanson et al. 2000).

Tabla 1. Modificaciones postraduccionales identificadas en HyS.

Modificación	Daño	Producto estructura (Ejemplo)	Referencia
Desamidación N14, Q16, N53, Q63, Q70, N76, Q92, Q106, Q120, N143, Q148, Q170	Introduce una carga negativa en la proteína, conduciendo a cambios estructurales y disminución de estabilidad.	<p>Gln desamidada</p>	Hanson et al. 1998, Hanson et al. 2000, Wilmarth et al. 2006, Srivastava et al 2017, Forsythe et al. 2019
Oxidación Y21, W46, M58, Y60, W73, M73, Y94, Y109, M118, M123, W137, Y150, W163	Alteración en la estructura secundaria y terciaria, fragmentación espontánea.	<p>Trp oxidado</p>	Hanson et al. 2000, Srivastava et al 2017
Fosforilación S89	Puede modular la actividad chaperona de α -cristalinas.	<p>Ser fosforilada</p>	Sharma & Santhoshkumar 2009
Metilación K6, C24, C26	Mecanismo de protección para prevenir enlaces disulfuro y agregación.	<p>Lys metilada</p>	MacCoss et al. 2002, Wilmarth et al. 2006, Srivastava et al 2017
Formación de puentes disulfuros C22-24, C114-C129	Cambios conformacionales de la proteína.	<p>Puente disulfuro</p>	Hanson et al. 1998

Proteólisis

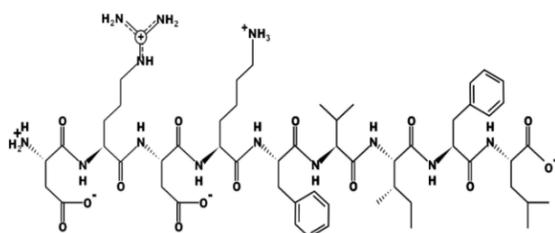
La proteólisis de cristalinas aumenta significativamente en lentes envejecidos y con catarata, lo cual puede alterar el arreglo ordenado de las proteínas en el lente. Las proteasas de lentes juegan un papel importante durante el desarrollo, la morfogénesis, la degradación de los organelos y la disminución de las mismas puede provocar la acumulación de proteínas modificadas, volviéndose menos soluble. No obstante, una reacción de oxidación puede convertir las proteínas en formas más susceptibles a la degradación proteolítica (Bassnet 2009). Santhoshkumar y colaboradores aislaron 23 fragmentos de cristalinas con masas moleculares menores de 3.5 kDa en lentes de personas jóvenes, ancianos y personas con cataratas (Tabla 2) (Santhoshkumar et al. 2008). La interacción de péptidos derivados de cristalina con cristalinas intactas podría ser un factor clave en la formación de cataratas relacionadas con la edad. Varios de los fragmentos listados en la tabla 2 han mostrado que, al interactuar con cristalinas de bovinos, inducen su agregación o inhiben la actividad chaperona de las α -cristalinas (Udupa & Sharma 2005; Kannan et al. 2013).

Udupa & Sharma demostraron que el péptido oxidado β B3 - 152 AINGTWVGYEFGYR 166 aumentaba la agregación de las $\beta\gamma$ -cristalinas. Los datos fueron confirmados por análisis espectrométrico de masas y determinaron que el péptido β B3 interactuaba preferentemente con la cristalina β B2, con residuos de aminoácidos en ambos extremos N- y C- terminales de la proteína. Los extremos son expuestos al solvente y son flexibles en el dímero (Udupa & Sharma 2005). La asociación de cristalinas en complejos de orden superior es de importancia crítica para mantener la transparencia del cristalino.

Santhoshkumar y colaboradores, mostraron que los péptidos del cristalino generados *in vivo* interactuaban con las cristalinas y aumentaban su agregación y precipitación, exhibiendo actividad anti-chaperona (Santhoshkumar et al 2011). Además, han encontrado que alteran el tamaño oligomérico de la cristalina soluble (Santhoshkumar et al 2011), interactúan con los componentes del citoesqueleto y la membrana, alteran la interacción de la α -cristalina soluble con la membrana y llegan a formar agregados de tipo amiloides *in vitro* (Su et al.2011; Srivastava et al. 2012). El péptido de α -cristalina 66 SDRDKFVIFLDVKH 80 , lleva una secuencia similar al motivo formador de fibrillas de la proteína β -amiloides y demuestra los rasgos característicos como la existencia de una estructura secundaria de hojas β (Kannan et al. 2013).

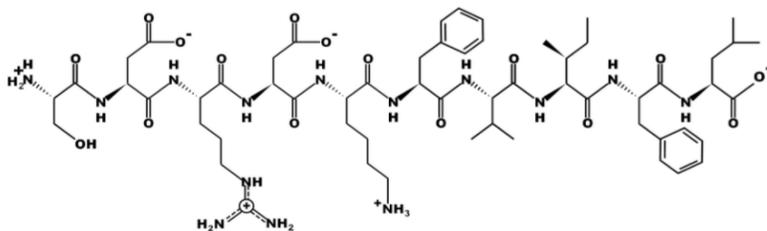
De tal forma que la presencia de péptidos relacionada con la edad y la agregación de proteínas asociada en el cristalino ha llevado a la hipótesis emergente de que los péptidos podrían ser uno de los factores iniciadores en la formación de cataratas. Los lentes viejos y con cataratas muestran una mayor proteólisis en comparación con los lentes sin cataratas de la misma edad. Los péptidos tienen sitios de interacción en cristalinas solubles y se encuentra que modulan la fisiología normal del cristalino. De acuerdo a estos antecedentes, se sintetizaron 3 fragmentos (Figura 4): el péptido α A- (67-75), el péptido α A- (66-75), y el péptido γ S- (167-178) de cristalinas para conocer los modos de interacción con la cristalina HyS nativa.

A) DRDKFVIFL



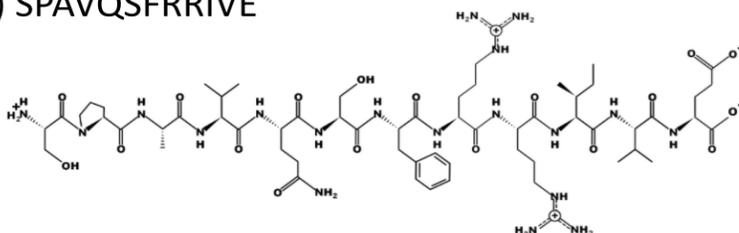
Propiedades
 Longitud: 9
 Masa: 1151.6320
 (pI): 6.94
 Carga neta: 0
 Hidrofobicidad: +13.54 Kcal * mol⁻¹

B) SDRDKFVIFL



Propiedades
 Longitud: 10
 Masa: 1238.6639
 (pI): 6.67
 Carga neta: 0
 Hidrofobicidad: +14.00 Kcal * mol⁻¹

C) SPAVQSFRRIVE



Propiedades
 Longitud: 12
 Masa: 1387.7550
 (pI): 10.69
 Carga neta: +1
 Hidrofobicidad: +13.73 Kcal * mol⁻¹

Figura 4. Estructura química de los fragmentos derivados de cristalinas sintetizados. **(A)** α A- (67-75) **(B)** α A- (67-75) y **(C)** γ S- (167-178). Se utilizó el software en línea PepDraw.com.

Tabla 2. Péptidos de bajo peso molecular en lentes humanas. Tomado de Santhoshkumar et al. 2008.

Fuente	Encontrado en personas			Secuencia del péptido
	Joven	Ancianos	Catarata	
α B- (59-66)	No	Sí	Sí	PSWFDTGL
α A- (67-75)	Sí	No	No	DRDKFVIFL
α A- (66-75)	No	Sí	Sí	SDRDKFVIFL
α B- (24-34)	No	No	Sí	FDQFFGEHLLE
γ S- (167-178)	Sí	Sí	Sí	SPAVQSFRRIVE
α A- (2-12)	No	Sí	Sí	DVTIQHPWFKR
α A- (2-13)	No	Sí	Sí	DVTIQHPWFKRT
α B- (45-57)	Sí	Sí	No	SPFYLRPPSFLRA
α A- (43-56)	Sí	Sí	Sí	TISPYRQSLFRTV
α A- (67-80)	No	Sí	Sí	DRDKFVIFLDVKHF
α A- (51-65)	No	No	Sí	SrLFRTVLDSGISEVR
α A- (66-80)	No	Sí	Sí	SDRDKFVIFLDVKHF-H20
α A- (66-80)	No	Sí	Sí	SDRDKFVIFLDVKHF
β A3 / A1 (59-74)	No	Sí	Sí	SD(N)AYHIERLMSFRPIC
α A- (50-65)	No	No	Sí	QsrLFRTVLDSGISEVR
β B2- (181-196)	Sí	No	Sí	PQVQSVRRIRDMQWHQ
α B- (2-18)	No	Sí	Sí	DIAIHPWIRRPFFPFH
α B- (1-18)	No	Sí	Sí	Ace-MDIAIHPWIRRPFFPFH
β (γ) S- (2-22)	No	Sí	Sí	Ace-SKTGKITFYEDKNFQGRRYD
β B2- (181-204)	Sí	No	Sí	PQVQSVRRIRDMQWHQRGAFHPSN
β A3- (190-215)	Sí	Sí	Sí	GDYKHWREWGSHAQTSQIQSIRRIQQ
β A3- (189-215)	Sí	Sí	Sí	GGDYKHWREWGSHAQTSQIQSIRRIQQ
β A3- (188-215)	Sí	Sí	Sí	HGGDYKHWREWGSHAQTSQIQSIRRIQQ

2. HIPÓTESIS

La interacción de HyS con fragmentos peptídicos de otras cristalinas acelera su agregación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de fragmentos peptídicos de cristalinas en la agregación de la HyS.

3.2 Objetivos particulares

- 1 Sintetizar y purificar los fragmentos peptídicos α A- (67-75), α A- (66-75), γ S-(167-178).
- 2 Sobreexpresar y purificar HyS.
- 3 Estudiar el efecto de fragmentos peptídicos de cristalinas en la cinética de agregación de la HyS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Síntesis y purificación de los péptidos

Los péptidos se sintetizaron empleando el esquema de protección Fmoc/tBu (Figura 5). La técnica está basada en el crecimiento de una cadena peptídica mediante la adición consecutiva de aminoácidos sobre una resina a la cual permanecen anclados durante la síntesis. La síntesis se realiza del C-terminal al N-terminal, utilizando la resina Rink amida-MBHA. El grupo 9-fluoronilmetoxicarbonilo (Fmoc) impide reacciones no deseadas del grupo amino y los grupos del tipo (tBu) protegen las cadenas laterales de los aminoácidos.

Existen tres pasos importantes en la síntesis de péptidos:

1. Desprotección. Consiste en remover el grupo Fmoc con piperidina:dimetilformamida, 50:50.
2. Activación. Consiste en transformar el extremo carboxilo en un ester modificado para aumentar la reactividad del aminoácido. Se lleva a cabo con N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y oxyma, para evitar racemización.
3. Acoplamiento. Consiste en adicionar el aminoácido activado a la resina o péptido-resina para que se forme el enlace peptídico entre el extremo amino libre de la péptido-resina y el grupo carboxilo del aminoácido activado.
4. Prueba de Kaiser o ninhidrina. Consiste en una reacción colorimétrica que permite evaluar la presencia de aminas libres. Con esta prueba se garantiza que el acoplamiento y la desprotección hayan sido completas para obtener un buen rendimiento.

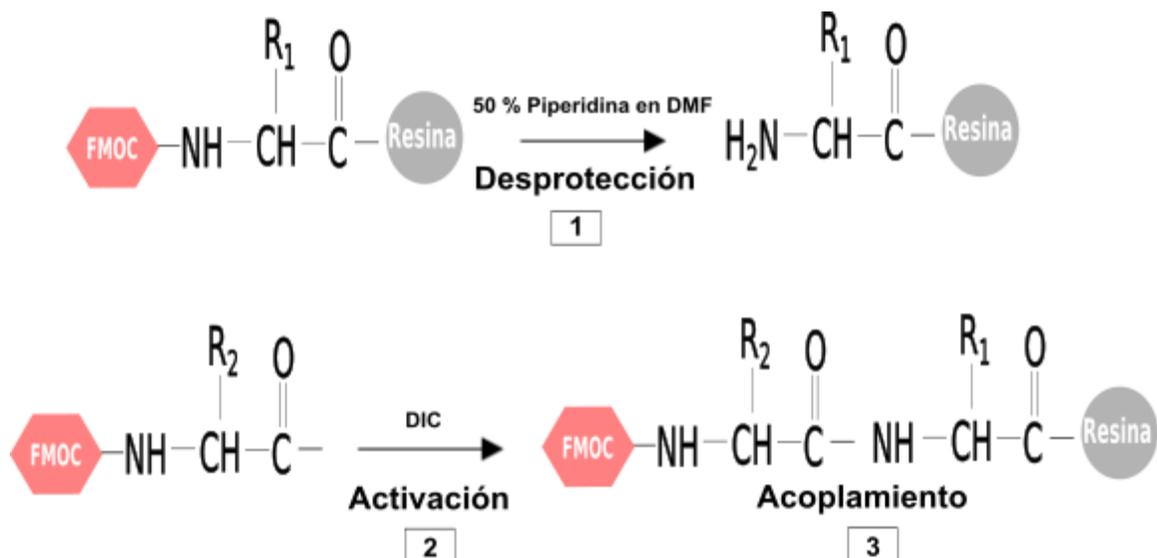


Figura 5. Síntesis de péptidos en fase sólida (Fmoc). Esta secuencia de desprotección y activación-acoplamiento se repite luego hasta que se completa la cadena peptídica.

En la tabla 3 se muestran los péptidos que se sintetizaron durante este trabajo. El péptido α A- (67-75) está presente en jóvenes y lentes con catarata, mientras que el péptido α A- (66-75), que sólo difiere en un residuo, se encuentra en ancianos y lentes con catarata. El péptido γ S- (167-178) se encuentra presente en los tres grupos. Una vez sintetizada la cadena peptídica, ésta se separó de la resina y se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos a través de una hidrólisis ácida con TFA. Luego, se purificaron por HPLC en una columna de fase reversa (C18), y la masa molecular de cada péptido se confirmó por espectrometría de masas.

Tabla 3. Péptidos sintetizados.

Masa de péptidos (Da)	Péptido	Encontrado en personas			Secuencia del péptido
		Joven	Ancianos	Catarata	
1152.64	α A- (67-75)	Sí	No	No	DRDKFVIFL
1239.67	α A- (66-75)	No	Sí	Sí	SDRDKFVIFL
1388.77	γ S- (167-178)	Sí	Sí	Sí	SPAVQSFRIVE

Además de estos péptidos se evaluó el efecto de los péptidos α B- (1-18), α A- (66-80), α A- (70-88) y α B- (59-66) que ya se encontraban sintetizados y puros en el laboratorio, por Hugo Gómez en el 2017.

4.2 Expresión de HyS

La proteína se expresó en células de *E. coli* BL21-RIL, resistentes a cloranfenicol. Éstas se transformaron con el plásmido pE-SUMO CRYGS que las hace resistentes a ampicilina. Este plásmido contiene una secuencia de la proteína HyS unida a una proteína SUMO con cola de histidinas en el extremo amino. La transformación se realizó adicionando 2 μ l de plásmido a 100 μ l de células de *E. coli*, se dejó 15 minutos en hielo. Después fueron incubadas a 44°C por 45 segundos, y se pusieron en hielo durante 2 minutos. Se agregó 1 mL de medio LB y se dejó que las células se recuperaran a 37°C por 1 hora. Luego, las células se plaquearon en una caja Petri con agar LB con 100 μ g/ml de ampicilina y 30 μ g/ml de cloranfenicol, se incubó por 12 horas a 37°C. Entonces, se tomó una colonia de las células transformadas para inocular 10 mL de cultivo LB con 100 μ g/ml de ampicilina y 30 μ g/ml de cloranfenicol, se incubó durante 12 horas a 37°C en agitación a 200 rpm. Posteriormente, este precultivo se transfirió a 1 L de LB en las mismas condiciones y se incubó a 37°C y 200 rpm de agitación hasta que se alcanzó una densidad óptica de \sim 0.7 a 600 nm. Se utilizó Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.33 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína y se incubó a 18°C a 150 rpm de agitación por 12 horas. Las células se recuperaron por centrifugación a 4,000 rpm por 30 minutos a 4°C. El botón de células fue resuspendido en buffer Tris-HCl 50 mM con imidazol 10 mM a pH 8. Enseguida, para la lisis celular, se añadió 1 mg/mL de lisozima y se dejó incubando por 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron 15 ciclos de sonicación de 1 minuto con descansos de 1 minuto. El lisado se centrifugó a 17,000 rpm por 45 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue filtrado por una membrana de 0.22 μ m antes de inyectarlo en la cromatografía. En todos los pasos descritos se confirmó la presencia de la proteína HyS mediante SDS-PAGE al 16%.

4.3 Purificación de HyS

El sobrenadante filtrado fue aplicado en una columna HisTrap™ Sepharose-Níquel, con un gradiente lineal de imidazol (10-500 mM). El buffer A contenía Tris-HCl 50 mM y 10 mM de imidazol pH 8; el buffer B contenía Tris-HCl 50 mM y 500 mM de imidazol pH 8. Se colectaron fracciones de acuerdo a su absorción a 280nm. Las fracciones eluidas se evaluaron por SDS-PAGE. Las fracciones ricas en HyS-SUMO se unieron. Para obtener la proteína sin imidazol, se realizó una diálisis durante 12 horas a 5°C contra Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl pH 8. Para eliminar la secuencia SUMO, se adicionó 1 unidad de proteasa por cada 100 µg de proteína, y se incubó durante 12 horas a temperatura ambiente. Para comprobar si ocurrió el corte se realizó un SDS-PAGE al 16%, donde se distinguieron dos bandas correspondientes al peso de la proteína cortada en 20 kDa y a la secuencia SUMO alrededor de 17 kDa. La proteína HyS se pasó nuevamente por una columna HisTrap™ Sepharose-Níquel, con un gradiente escalonado de tres volúmenes de columna cada uno. El gradiente inicia con Tris-HCl 50 mM pH 8, sin imidazol, sube a 10 mM de imidazol, 50 mM imidazol, 100 mM imidazol y 200 mM imidazol. La fracción sin imidazol debe contener a la proteína HyS. Esta fracción se pasa por una columna de intercambio iónico Q-sepharose con un gradiente lineal que va de 100 a 500 mM de NaCl. El buffer A contenía Tris-HCl 50 mM y 100 mM de NaCl pH 8; el buffer B contenía Tris-HCl 50 mM y 500 mM de NaCl pH 8. Posteriormente, se analizaron las fracciones eluidas mediante SDS-PAGE para verificar la presencia y pureza de HyS. La concentración de proteína se determinó con el coeficiente de extinción molar de $41200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 280 nm.

4.4 Cinética de agregación por turbidez

Se empleó la proteína HyS 50 µM en buffer Tris-HCl 50 mM y 100 mM de NaCl pH 8. Las cinéticas se corrieron en ausencia y presencia de los péptidos en una relación equimolar a 37°C. Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro Agilent 8423. Se colectaron los valores de absorbancia a 405 nm cada 5 min durante 12 horas. Los ensayos se realizaron al menos dos veces para cada condición.

4.5 Cinética de agregación por Dispersión Dinámica de Luz

El tamaño de agregados de la proteína se siguió en un espectrofotómetro Malvern Zetasizer Nano ZSP a 37°C, con un ángulo de dispersión de 173°. El volumen empleado fue de 1 mL a una concentración de proteína 50 μ M. Este ensayo se realizó en ausencia y presencia de los péptidos en una relación equimolar. El tiempo de equilibrio fue de 120 s; se obtuvieron 450 corridas con 10 escaneos de 10 s para cada muestra por duplicado. Todas las muestras se filtraron previamente por una membrana de 0.22 μ m. El radio hidrodinámico, R_H , se obtuvo del coeficiente de difusión, D , a través de la ecuación de Einstein-Stokes (Stetefeld et al. 2016). Los datos se analizaron en el paquete de software SEDFIT (Zhao et al. 2015) y las figuras fueron hechas en GUSI (Brautigam 2015).

4.6 Cinética de desplegamiento de HyS

La fluorescencia intrínseca de triptófano se midió usando un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse. La proteína a una concentración 50 μ M se excitó a 295 nm, mientras que los espectros de emisión se registraron entre los 300 y 450 nm, cada 5 min durante 12 horas a 37°C. Los experimentos se hicieron por triplicado en ausencia y presencia de concentraciones equimolares de los péptidos. El grado de desplegamiento se evaluó en términos del corrimiento del máximo de emisión y calculando las relaciones máximas de intensidades medidas a 328 nm y 355 nm (I_{355}/I_{328} nm), con el fin de controlar simultáneamente los cambios en los máximos nativos y desplegados. Además, se tomaron espectros de la proteína desnaturalizada en diferentes concentraciones de GuHCl de 0 a 4 M. La estabilidad térmica de HyS se siguió en un rango de temperatura de 37 a 98° C con un incremento de 3.0 C°/min. Los datos se ajustaron a una sigmoide empleando la ecuación de Boltzmann.

5. RESULTADOS

5.1 Expresión de HyS

En la figura 6 se muestra el perfil electroforético de cada uno de los pasos del sistema de expresión de la proteína. Claramente la proteína migró a la altura esperada, una banda de ≈ 35 kDa, que corresponde al peso de la cristalina HyS unida a la secuencia 6xHis-SUMO. La banda de la proteína se puede observar, en bajas concentraciones, a partir de la inducción, pero se observa una banda de alta concentración en la fracción esperada luego de la lisis celular.

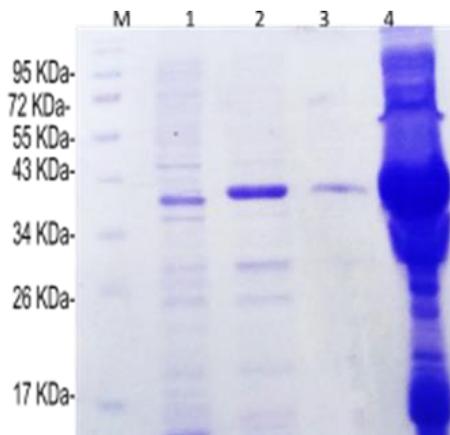


Figura 6. SDS-PAGE de la sobreexpresión de HyS. Carril M, marcador de peso molecular; carril 1, botón de células antes de inducir; carril 2, botón de células después de la inducción con IPTG; carril 3, botón obtenido con la lisis celular, carril 4, sobrenadante del lisado celular.

5.2 Purificación de HyS

El sobrenadante rico en la proteína se eluyó en la columna HisTrapTM Sepharose-Ni usando un gradiente lineal de imidazol. En la figura 7A se puede observar un pico mayoritario al 50 % de imidazol. Después se analizaron estas fracciones por SDS-PAGE (Figura 7B); las fracciones 17 a la 25 contenían la proteína con la banda correspondiente de 35 kDa. Estas fracciones ricas en HyS se juntaron y se obtuvo una concentración de proteína de 124 μ M. Esta fracción enriquecida en HyS se proteolizó con la proteasa 1 específica de Ubl de *Saccharomyces cerevisiae* (Proteasa SUMO) para remover la etiqueta SUMO. Esta

proteólisis se verificó con un gel de electroforesis SDS y se observó una banda correspondiente al peso molecular de la cristalina HyS en 20 kDa (Figura 7C). La proteína se recuperó pasándola nuevamente por la columna HisTrap™ Sepharose-Ni con un gradiente escalonado de imidazol. En esta etapa, la proteína HyS no contiene cola de histidinas, por lo tanto, no se une a la columna y se recoge en las fracciones no retenidas, como se confirmó por SDS-PAGE (Figura 7D y E). Las fracciones 1 a la 8 contienen a la proteína, así que se juntaron y se pasaron por una columna de intercambio iónico Q-sepharose, para remover proteínas de mayor peso molecular (Figura 7F). Finalmente, se confirmó la pureza de HyS con un gel (Figura 7G).

La cantidad de proteína obtenida durante la purificación se cuantificó usando el coeficiente de extinción molar de HyS ($41200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280nm). El rendimiento aproximado de la expresión y purificación fue de 12 mg de proteína a partir de 1 L de cultivo inducido.

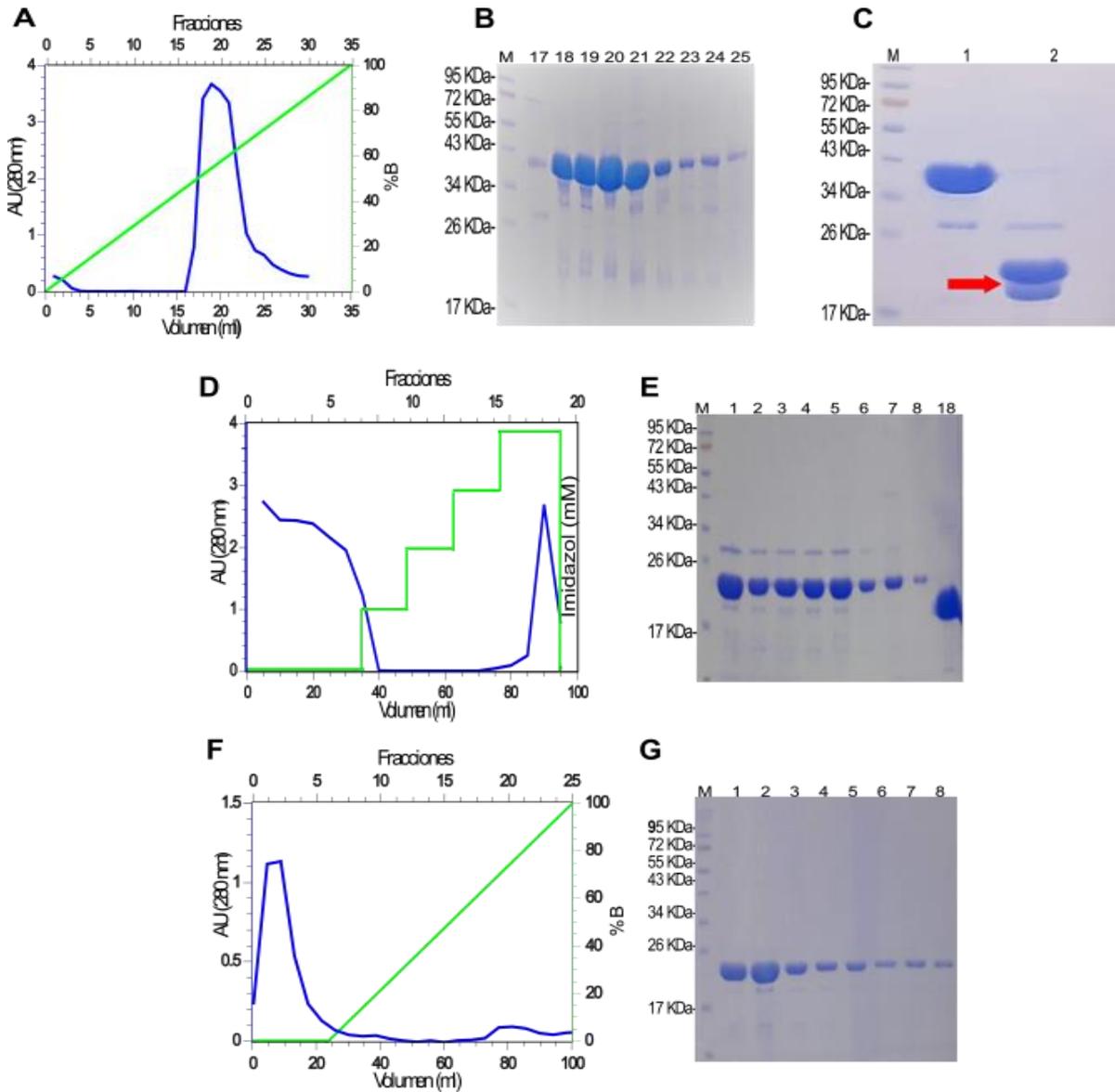


Figura 7. Purificación de HyS. **(A)** Perfil de elución de HyS en columna de afinidad HisTrap™ Sepharose-Níquel, detectando absorción a 280 nm, bajo un gradiente lineal de imidazol de 10 a 500 mM (verde). **(B)** SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas, carril M, marcador de peso molecular; carril 1 al 9, fracciones 17 a 25 de HyS-SUMO. **(C)** SDS-PAGE, carril M, marcador de peso molecular; carril 1, HyS antes de proteólisis; carril 2, HyS proteólisisada, la flecha roja señala la banda de HyS. **(D)** Perfil de elución de HyS en columna de afinidad HisTrap™ Sepharose-Níquel, detectando absorción a 280 nm, el gradiente inicia sin imidazol, sube a 10 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM imidazol (verde). **(E)** SDS-PAGE de las fracciones eluidas, carril M, marcador de peso molecular; carriles 1 al 8, fracciones 1 a 8 de HyS; carril 9, fracción 18 secuencia SUMO. **(F)** Perfil de elución de HyS en columna Q-sefarosa eluida con gradiente lineal de NaCl de 100 a 500 mM (verde). **(G)** SDS-PAGE de las fracciones eluidas, carril M, marcador de peso molecular; carriles 1 al 8, fracciones 1 a 8 de HyS pura.

5.3 Estabilidad de HyS

La desnaturalización de HyS a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio (GuHCl), se estudió por fluorescencia. La cristalina nativa HyS tiene un máximo de fluorescencia aproximadamente en 328 nm; cuando la proteína se despliega su máximo de fluorescencia se desplaza hacia el rojo, hasta 356 nm. Como se muestra en la figura 8A, HyS tiene su máximo a 328 nm y a medida que aumenta la concentración de GuHCl el máximo se desplaza a mayores longitudes de onda. A 4M de GuHCl, el máximo de fluorescencia es 356nm, indicando que la proteína está completamente desplegada. La relación de intensidades de fluorescencia a 355 y 328 nm ($IF_{355/328}$) se representó en función de la concentración de GuHCl (Figura 8B). El ajuste sigmoide sugiere que la concentración media fue de 3.14 M, a la cual la mitad de las moléculas de proteína se encuentran plegadas y la otra mitad desplegadas.

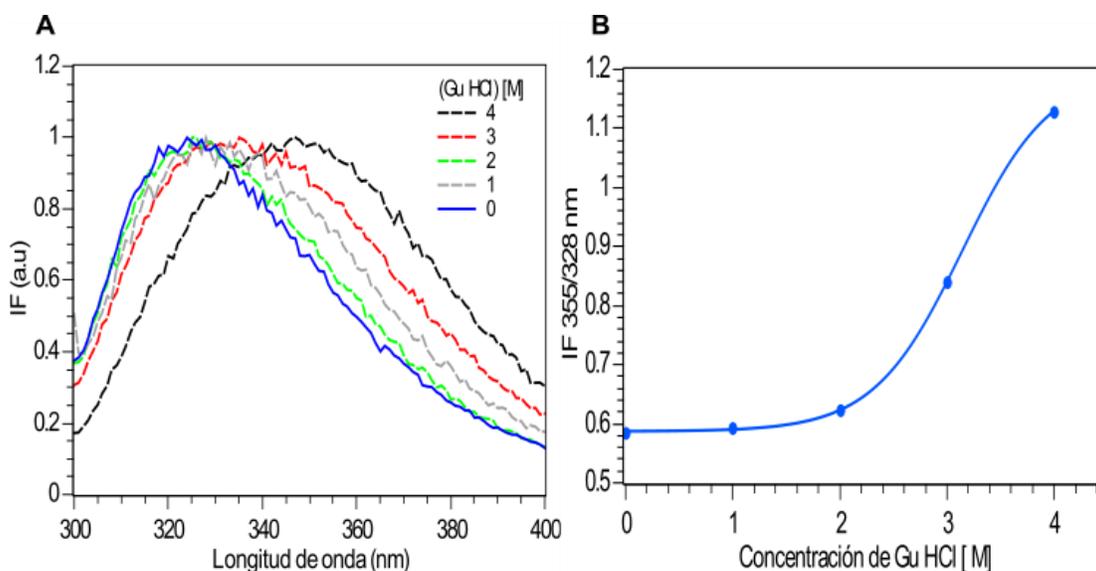


Figura 8. Desplegamiento de HyS con GuHCl seguido por fluorescencia. **(A)** Espectros de emisión de fluorescencia de HyS en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de GuHCl. **(B)** Curva de tendencia del despliegamiento de HyS.

De la misma manera, se evaluó la estabilidad térmica de HyS. La figura 9 muestra el despliegamiento térmico de la proteína seguida por fluorescencia. Ajustando los datos a una ecuación sigmoide se determinó que la T_m de HyS es 73.34°C . Esto indica que la proteína es muy estable térmicamente, pues sólo comienza a desplegarse a temperaturas por encima de 60°C .

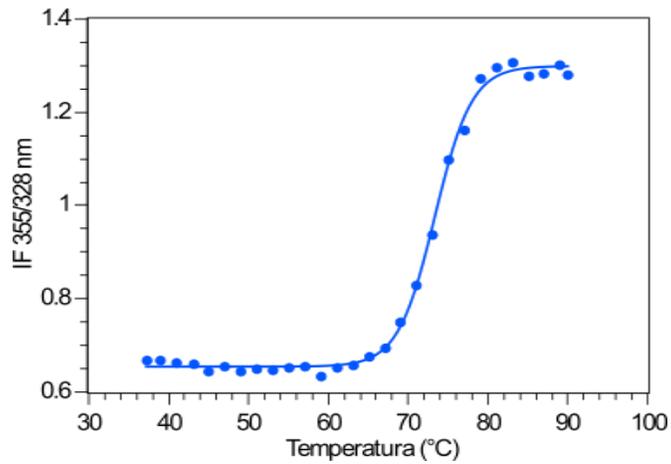


Figura 9. Estabilidad térmica de HyS. Se aumentó la temperatura 3°C/min, de 37 a 98°C.

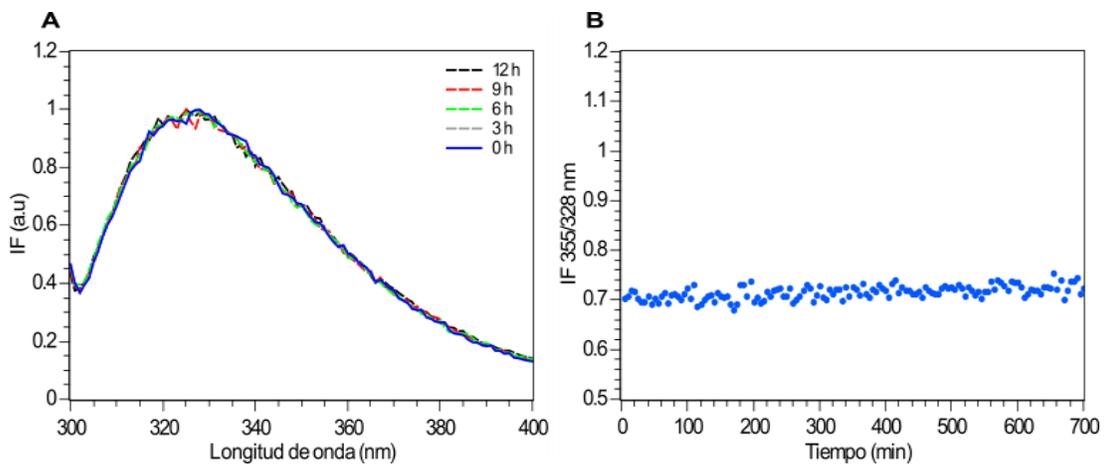


Figura 10. Cinética de desplegamiento de HyS a 37°C durante 12 horas seguida por fluorescencia. **(A)** Espectros correspondientes a las 0, 3, 6, 9 y 12 h. **(B)** Relación 355/328 nm respecto al tiempo.

Por otra parte, se evaluó la cinética de desplegamiento de la proteína por fluorescencia, a 37°C durante 12 horas. En la figura 10 se puede observar que el máximo de emisión se mantiene en 328 nm a lo largo de la cinética y la relación 355/328 nm en ~0.7, lo que indica que la proteína se mantiene plegada en las condiciones probadas en el experimento. El valor máximo de esta relación (~1.3) corresponde al 100 % de la proteína desplegada. De acuerdo con estos resultados se puede decir que se obtuvo la proteína en estado nativo y que la proteína se mantiene estable en las condiciones experimentales.

Para evaluar la agregación de HyS, se midió el cambio de absorbancia a 405 nm a 37°C durante 12 horas (Figura 11). La cristalina HyS muestra una densidad óptica constante a los ~508 minutos, posteriormente hay un aumento de la turbidez que va de 0.01

hasta 0.04. Sin embargo, la cubeta permaneció completamente transparente durante todo el tiempo del experimento.

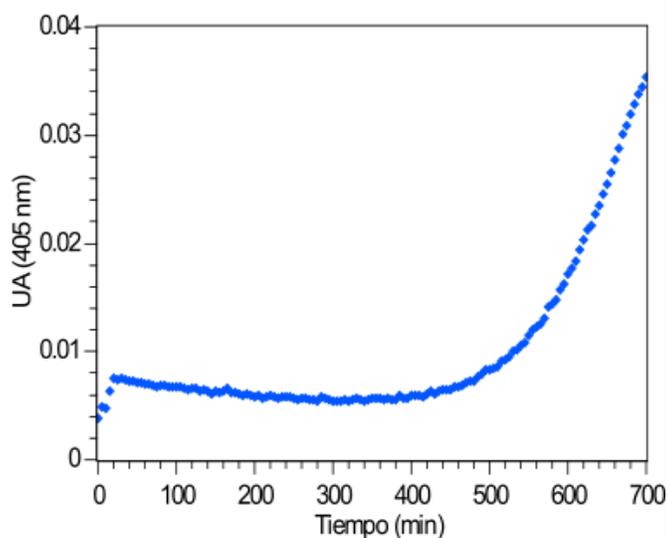


Figura 11. Cinética de agregación de H γ S seguida por turbidez a 405 nm y 37°C.

Con el fin de obtener información sobre el tamaño de agregados, la muestra se analizó por dispersión dinámica de luz (DLS), que se emplea para la determinación de la distribución de los tamaños de partícula en solución y así obtener su radio hidrodinámico. Las mediciones muestran una curva de correlación consistente con una solución polidispersa, con al menos dos especies diferentes (Figura 12A). Al tiempo inicial, la especie más abundante que representa un 90 % de la señal total, corresponde a un R_H aparente de 2.3 nm. La segunda especie tiene un radio alrededor de 100 nm y un 11 % de la señal total. Estos resultados demuestran que H γ S consiste principalmente de un monómero, aunque también hay especies oligoméricas más grandes presentes en la muestra. Después de transcurridas las 12 horas, el porcentaje de la señal total cambia al 50 % para el monómero y alrededor del 45 % para los oligómeros con un tamaño de hasta 550 nm de radio hidrodinámico. Es importante resaltar que la muestra permaneció completamente transparente a lo largo del experimento como en la cinética de agregación por turbidez, confirmando que el aumento en el tamaño de los oligómeros es responsable del ligero aumento en la escala de turbidez.

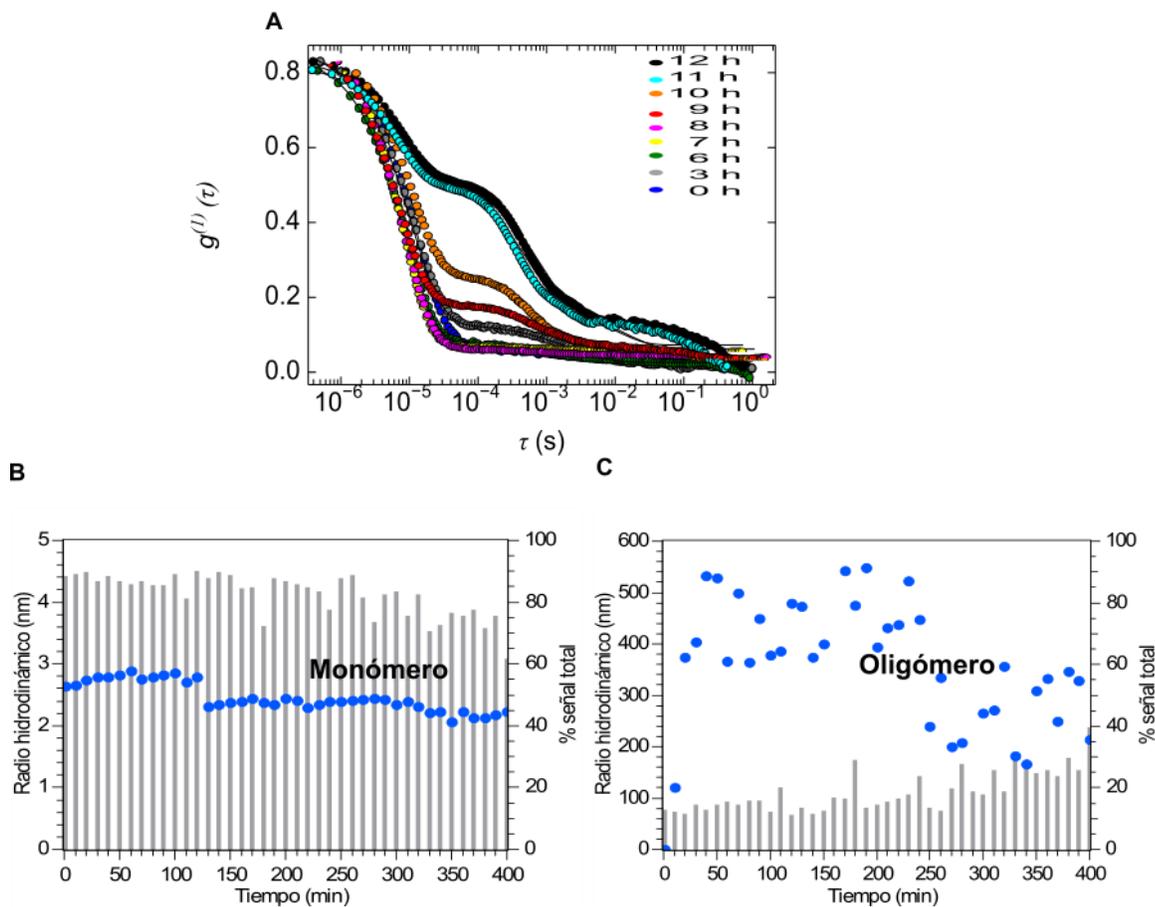


Figura 12. Cinética de agregación por dispersión dinámica de luz de HyS. **(A)** Curvas de correlación colectadas cada 3h durante 12 h. **(B)** Radio hidrodinámico estimado de la especie monomérica en función del tiempo. **(C)** Cambio en el radio hidrodinámico estimado para la especie oligomérica en función del tiempo. Las barras grises indican el porcentaje de señal correspondiente a la especie.

Al graficar el cambio de radio hidrodinámico contra el tiempo para la especie monomérica (Figura 12B) y para el oligómero (Figura 12C), y se observa que el monómero se mantiene durante toda la cinética, sólo que su porcentaje disminuye de 90 a cerca de 60 %. En el caso de los oligoméricos, se observa como aumenta el tamaño de los oligómeros, pero el porcentaje no aumenta más allá del 40%. Entonces, durante la cinética se forman oligómeros de gran tamaño, pero permanecen solubles y está presente el monómero.

5.3 Efecto de fragmentos peptídicos en la estabilidad de HyS

5.3.1. Estabilidad de los péptidos

Los péptidos sintetizados en este trabajo y descritos en la metodología no se pudieron usar para evaluar su efecto en la agregación de HyS debido a la contingencia Covid-19 que no permitió el ingreso al laboratorio desde marzo de 2020 hasta la fecha en la que se entrega este trabajo. En la tabla 4 se muestran los péptidos que se evaluaron durante este estudio. El péptido α B- (1-18) está presente en ancianos y lentes con catarata, y se reporta que tiene efecto en la agregación de las $\beta\gamma$ -cristalinas de bovino; el péptido α A- (70-88), conocido como la minicristalina, es capaz de inhibir la agregación de las γ -cristalinas; el péptido α A- (66-80) acelera la agregación de α -cristalinas de bovino; y el péptido α B- (59-66) presente en ancianos y lente con catarata, no cuenta con reportes.

Tabla 4. Péptidos evaluados en este estudio.

Masa de péptidos (Da)	Péptido	Encontrado en personas			Secuencia del péptido
		Joven	Ancianos	Catarata	
922,43	α B- (59-66)	No	Sí	Sí	PSWFDTGL
1865.94	α A- (66-80)	No	Sí	Sí	SDRDKFVIFLDVKHF
2113.19	α A- (70-88)	---	---	---	KFVIFLDVKHFSPEDLTVK
2359.18	α B- (1-18)	No	Sí	Sí	MDIAIHPWIRRPFFPFH

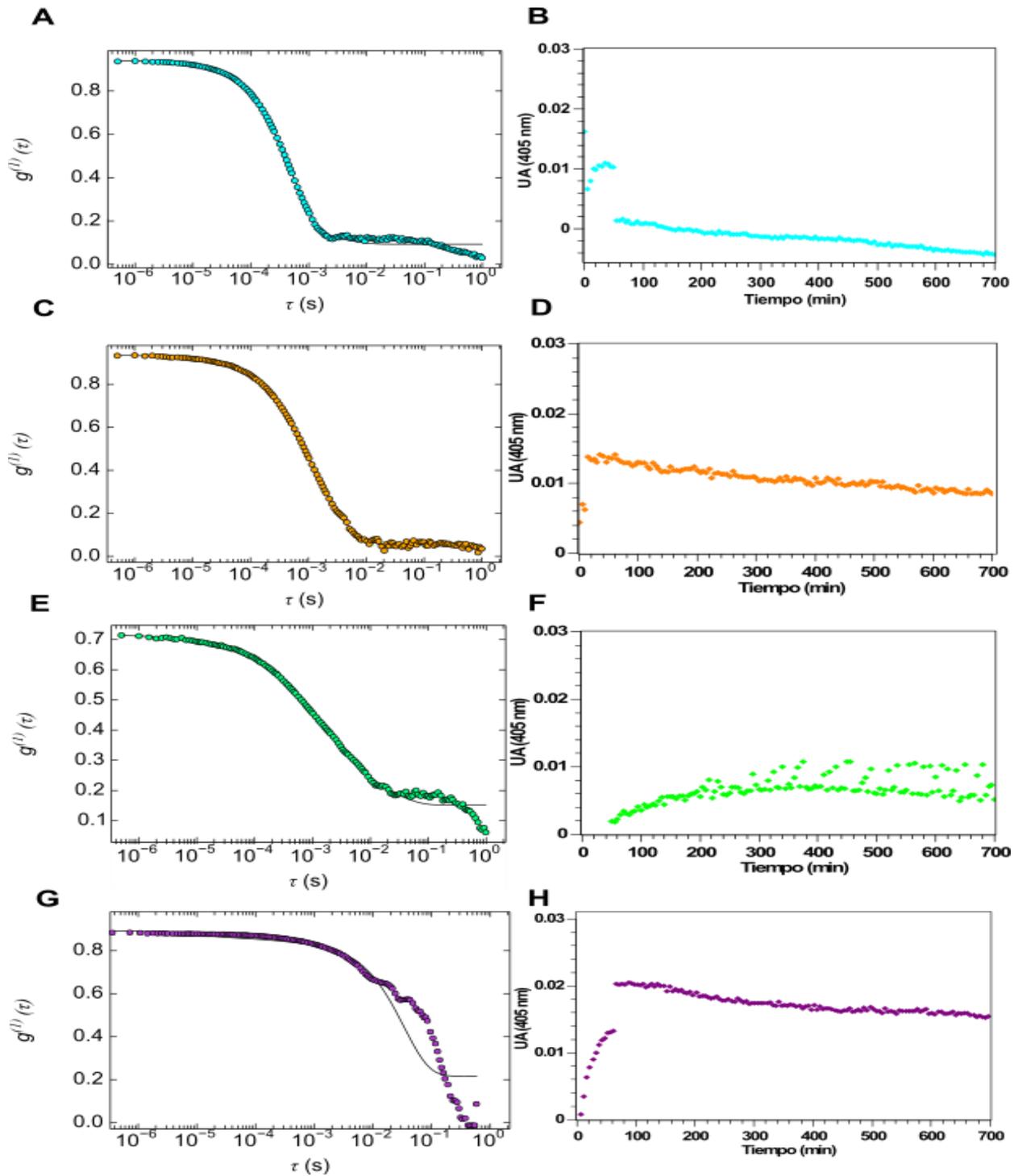


Figura 13. Cinéticas de agregación de diferentes fragmentos de cristalinas. Curva de correlación del péptido α B-(1-18) (A) α A-(70-88) (C), α A-(66-80) (E), ab-(59-66) (G) seguida por DLS en el tiempo inicial. Cinética de agregación del péptido α B-(1-18) (B), α A-(70-88) (D), α A-(66-80) (F), ab-(59-66) (H) seguida por turbidez.

En la figura 13 se muestran las curvas de correlación y las cinéticas de agregación de los fragmentos mencionados en la tabla 4. Todos los péptidos presentaron curvas de correlación que ajustan a radios hidrodinámicos grandes, 110 nm, 190 nm, 180 nm y 225 nm para α B- (1-18), α A- (70-88), α A- (66-80), α B- (59-66) respectivamente. En la cinética de agregación, los péptidos α B- (1-18) y α B- (59-66) presentan un ligero aumento en absorbancia en los primeros minutos; el péptido α A- (70-88) cambia de ~ 0.008 a 0.015 (UA); el péptido α A- (66-80) cambia de 0 a 0.01 (UA) con una tendencia exponencial, lo que indica que los péptidos se agregan ligeramente, sin embargo la solución se observa translúcida. Por otra parte, los péptidos α B- (1-18) y α B- (59-66) tienen un triptófano, por lo que pueden alterar el espectro de emisión de fluorescencia de la proteína. Por lo tanto, se tomaron sus espectros de fluorescencia y se observa que presentaron máximos de emisión a 357 y 367 nm respectivamente (Figura 14).

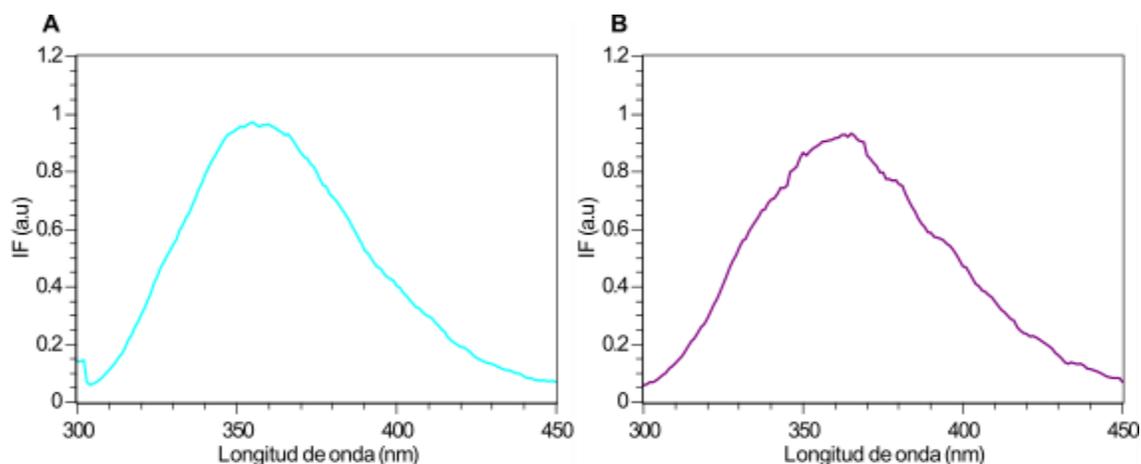


Figura 14. Espectros de fluorescencia de los péptidos α B-(1-18) (A) y α B-(59-66) (B).

5.3.2. Efecto del péptido α B- (1-18) en la agregación de HyS

Al seguir la cinética de agregación de HyS en presencia del péptido α B- (1-18) por DLS, se observó que el porcentaje de la señal de monómero de HyS disminuyó drásticamente desde la primera medición, de 90% a 8.5% , mientras que la señal de oligómeros fue de 91.5% durante toda la cinética. El radio hidrodinámico estimado para el oligómero varió entre 181.75 y 199.25 nm a lo largo del tiempo, por lo que se puede apreciar que las curvas de correlación no cambian entre el tiempo inicial y final. (Figura 15).

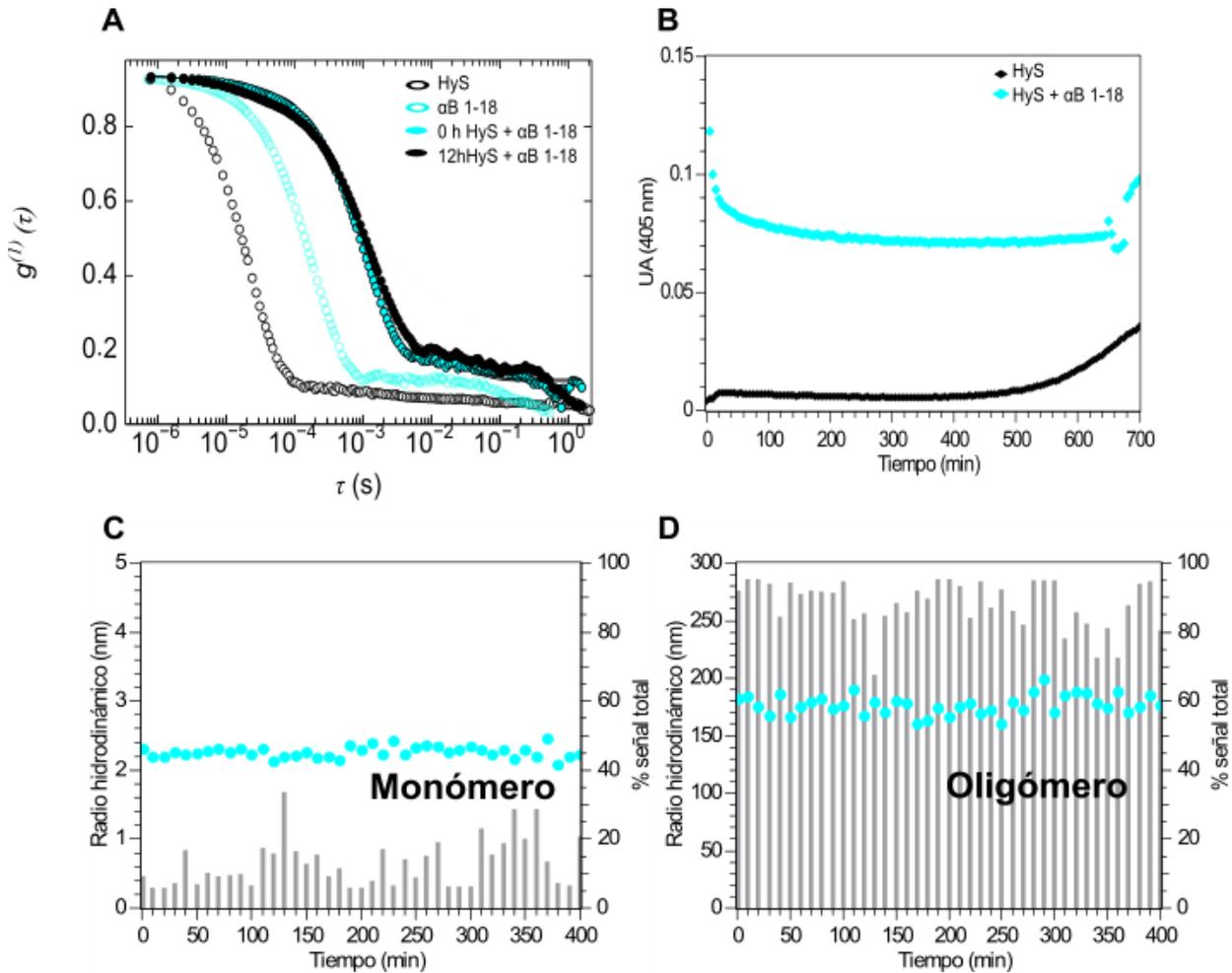


Figura 15. Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido $\alpha B(1-18)$ por dispersión dinámica de luz y turbidez. **(A)** Curvas de correlación. **(B)** Cinética de agregación. **(C)** Radio hidrodinámico estimado de la especie monomérica en función del tiempo. **(D)** Cambio en el radio hidrodinámico estimado para la especie oligomérica en función del tiempo. Las barras grises indican el porcentaje de señal correspondiente a la especie.

En un ensayo de turbidez, un aumento en la absorbancia es indicativo de la formación de grandes agregados de proteínas que dispersan la luz. La absorbancia fue monitoreada después de la adición del péptido y se observó un aumento en la absorbancia de la proteína que pasó de 0 a 0.1. Este aumento en absorbancia se observó desde el tiempo cero y después permaneció constante (Figura 15B), lo cual indica que la interacción entre la proteína y este péptido induce la formación de oligómeros muy rápidamente.

Por otra parte, por fluorescencia se evaluó si la interacción induce un cambio conformacional en HyS. Se observó un corrimiento del máximo de fluorescencia hacia el rojo, de 328 a 337 nm, desde el tiempo inicial. La relación 355/328 pasó a ser de ~ 0.8 , lo que indica que aproximadamente 22 % de proteína está desplegada (Figura 16). Sin embargo,

otra posible explicación para el cambio en el cociente 355/328 es el Trp presente en el péptido 1-18 que presenta un máximo de emisión a 357nm y que puede estar induciendo que el espectro de la proteína sea más ancho.

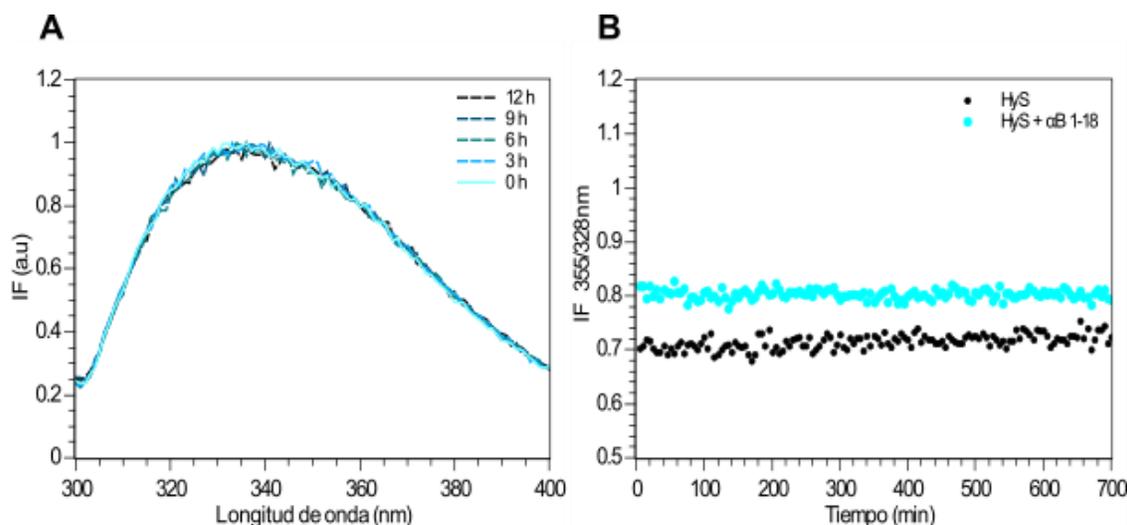


Figura 16. Cinética de desplegamiento de HsY en presencia del péptido α B-(1-18) seguida por fluorescencia. **(A)** Espectros correspondientes a las 0, 3, 6, 9 y 12 h. **(B)** Relación 355/328 nm respecto al tiempo

5.3.3. Efecto del péptido α A- (70-88) en la agregación de HsY

Tras la adición del péptido α A- (70-88), se observó por DLS la formación de una especie polidispersa y un aumento en el radio hidrodinámico con tendencia exponencial. El punto inicial indica un R_H de 175.35 nm y 89.7 % de la señal, y después de las 12 horas llega hasta los 837.9 nm. Al evaluar si existe especie monomérica presente, se confirma una caída en el porcentaje de la señal a menos del 20 % durante el experimento (Figura 17). Estos resultados indican que el péptido α A- (70-88) favorece la formación de oligómeros de radio hidrodinámico grande.

Por otra parte, en la cinética de agregación por turbidez, se observó un incremento significativo en absorbancia desde el tiempo cero, la intensidad pasa de 0 a 0.25 (Figura 17B), pero ocurre demasiado rápido y no es posible observarla en la escala de tiempo del experimento.

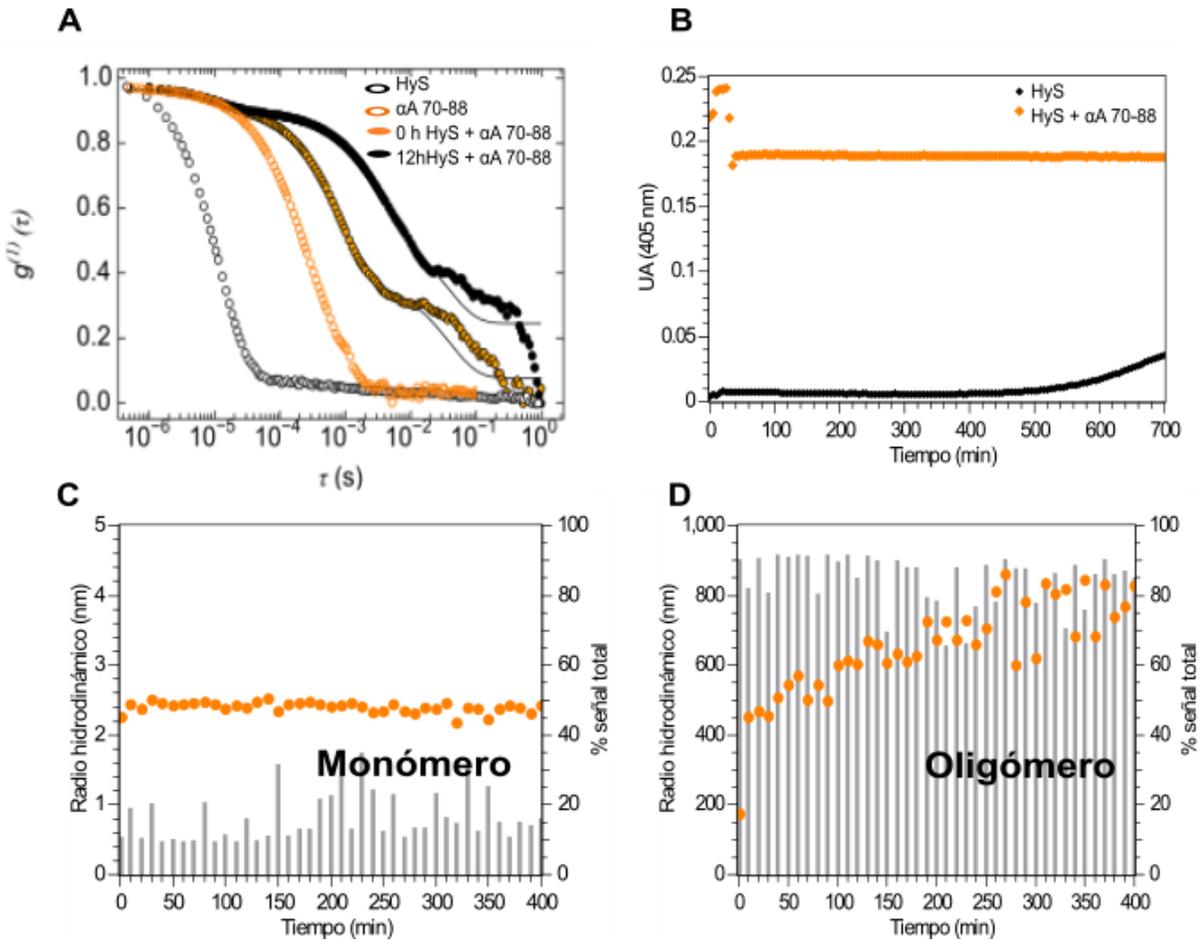


Figura 17. Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido $\alpha A(70-88)$ por dispersión dinámica de luz y turbidez. **(A)** Curvas de correlación. **(B)** Cinética de agregación. **(C)** Radio hidrodinámico estimado de la especie monomérica en función del tiempo. **(D)** Cambio en el radio hidrodinámico estimado para la especie oligomérica en función del tiempo. Las barras grises indican el porcentaje de señal correspondiente a la especie.

Finalmente, al evaluar la cinética de agregación del complejo HyS- $\alpha A(70-88)$ por fluorescencia, se observó que no hay corrimiento en el máximo de emisión (Figura 18A) y la relación 355/328 permanece en ~ 0.6 todo el tiempo (Figura 18B). Todo esto indica que la interacción no induce desplegamiento de la proteína.

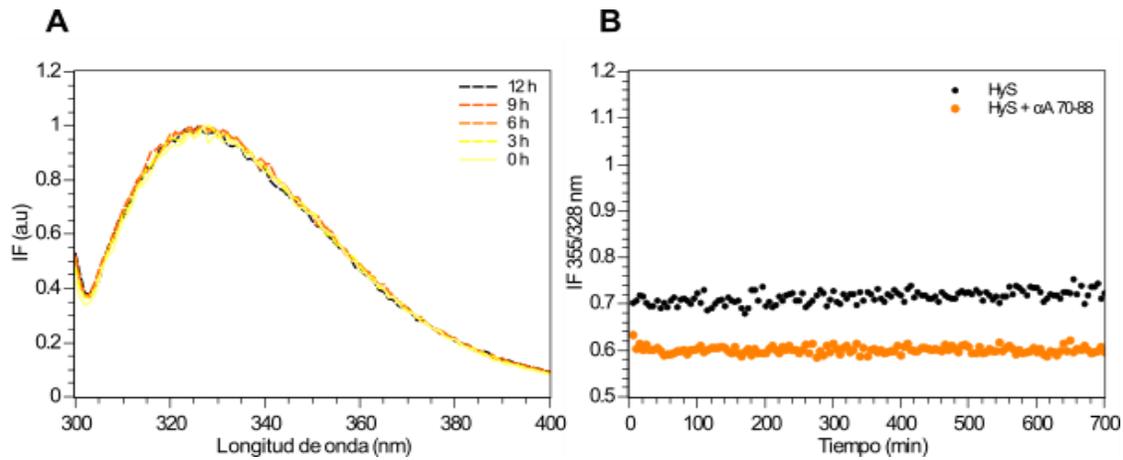


Figura 18. Cinética de desplegamiento de HγS en presencia del péptido αA-(70-88) seguida por fluorescencia. (A) Espectros correspondientes a las 0, 3, 6, 9 y 12 h. (B) Relación 355/328 nm respecto al tiempo.

5.3.4. Efecto del péptido αA- (66-80) en la agregación de HγS

La cinética de agregación de HγS con el péptido αA- (66-80) seguida por DLS, se observó una especie polidispersa y un radio hidrodinámico de 132.3 nm correspondiente al 62.2 % de la señal (Figura 19A y D) . El radio hidrodinámico aumenta hasta 309.8 nm en el tiempo final y presenta un porcentaje de señal de 48.1% (Figura 19D). La especie monomérica permanece constante durante toda la cinética con un porcentaje de señal alrededor del 40 % (Figura 19C).

En la cinética de turbidez, se observó un cambio rápido en la absorbancia 0 a 0.04 (Figura 19 B). Con estos resultados se puede decir que el péptido αA- (66-80) induce la formación de complejos de mayor radio hidrodinámico y alcanza valores de turbidez ligeramente mayores que la cristalina HγS sola.

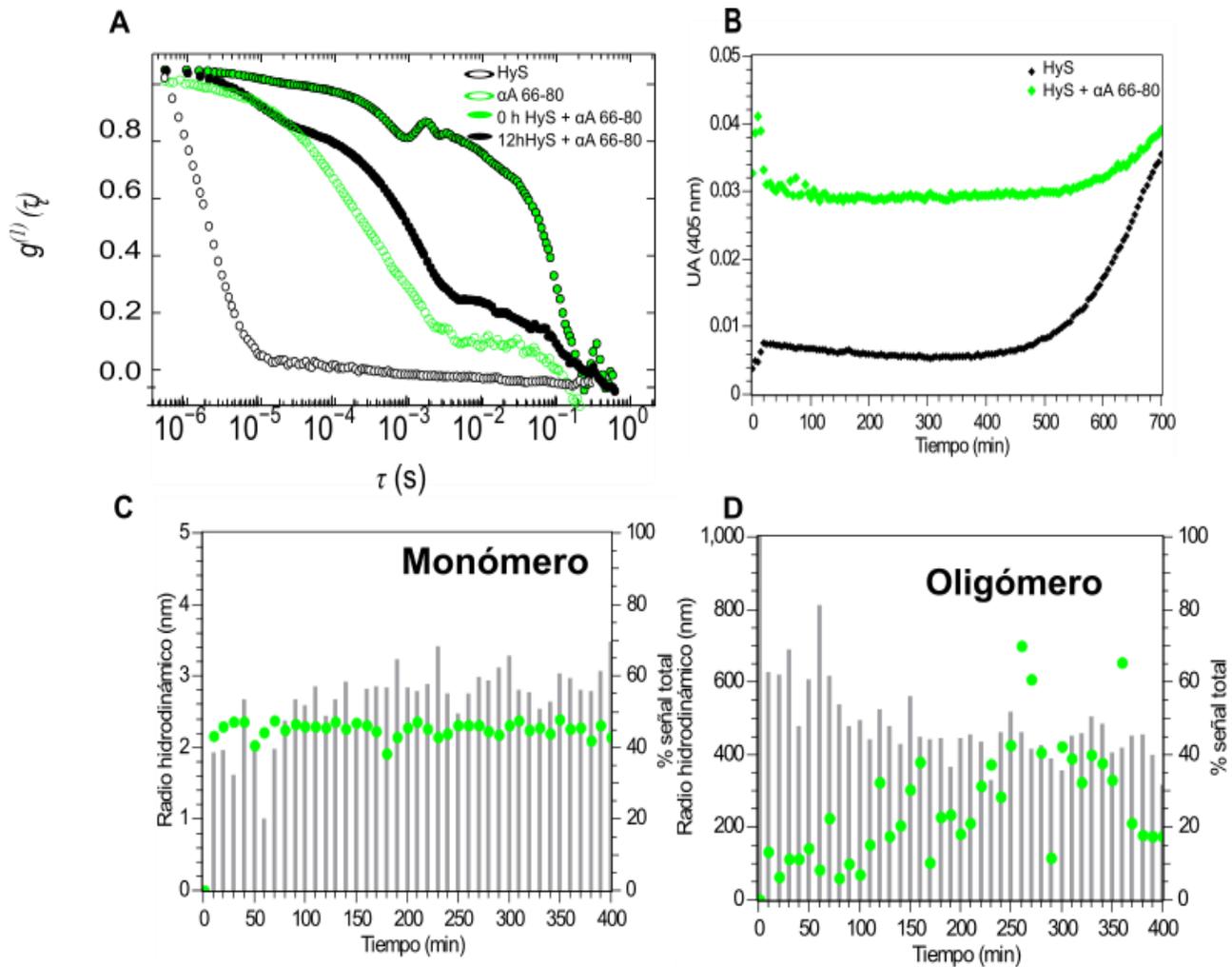


Figura 19. Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido αA -(66-80) por dispersión dinámica de luz y turbidez. **(A)** Curvas de correlación. **(B)** Cinética de agregación. **(C)** Radio hidrodinámico estimado de la especie monomérica en función del tiempo. **(D)** Cambio en el radio hidrodinámico estimado para la especie oligomérica en función del tiempo. Las barras grises indican el porcentaje de señal correspondiente a la especie.

La cinética evaluada por fluorescencia mostró que el máximo de emisión se mantuvo a 328 nm durante las 12 horas del análisis y la relación 355/328 se queda en ~ 0.6 . Por lo tanto, el péptido induce agregación pero no induce desplegamiento de HyS (Figura 20).

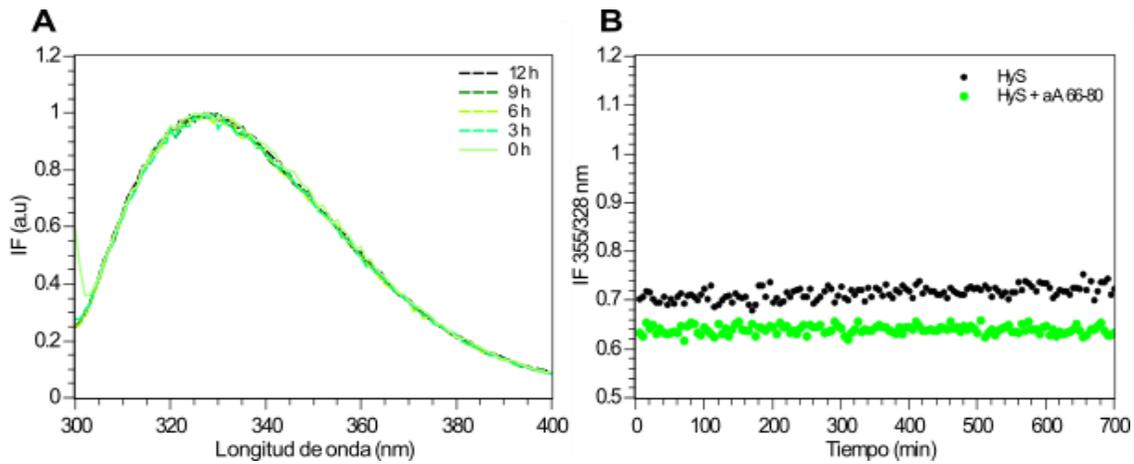


Figura 20. Cinética de desplegamiento de HγS en presencia del péptido αA-(66-80) seguida por fluorescencia. **(A)** Espectros correspondientes a las 0, 3, 6, 9 y 12 h. **(B)** Relación 355/328 nm respecto al tiempo.

5.3.5. Efecto del péptido αB- (59-66) en la agregación de HγS

Finalmente, se evaluó el efecto del fragmento αB- (59-66) en la cinética de agregación de HγS. Por DLS se observó que las curvas de correlación presentan la forma de una muestra polidispersa (Figura 21A). En el punto inicial se estimó un radio hidrodinámico de 104.9 nm correspondiendo a un 65.3 % de la señal con una tendencia a aumentar. A las 12 horas el radio hidrodinámico aumentó hasta 238.35 nm y 81.3 % de la señal (Figura 21 D). El porcentaje de señal de la especie monomérica disminuyó de 34.7 % a 18.7 % (Figura 21C). Ajustando los datos de la Figura 21D a una ecuación exponencial se pudo determinar una constante de tiempo de 54.05 ± 0.535 min.

En la cinética de agregación seguida por turbidez, el péptido αB- (59-66) indujo agregación y fue posible observar una tendencia exponencial (Figura 21B). Al ajustar la cinética a una ecuación exponencial se estimó una constante de tiempo de 1.51 ± 0.16 min.

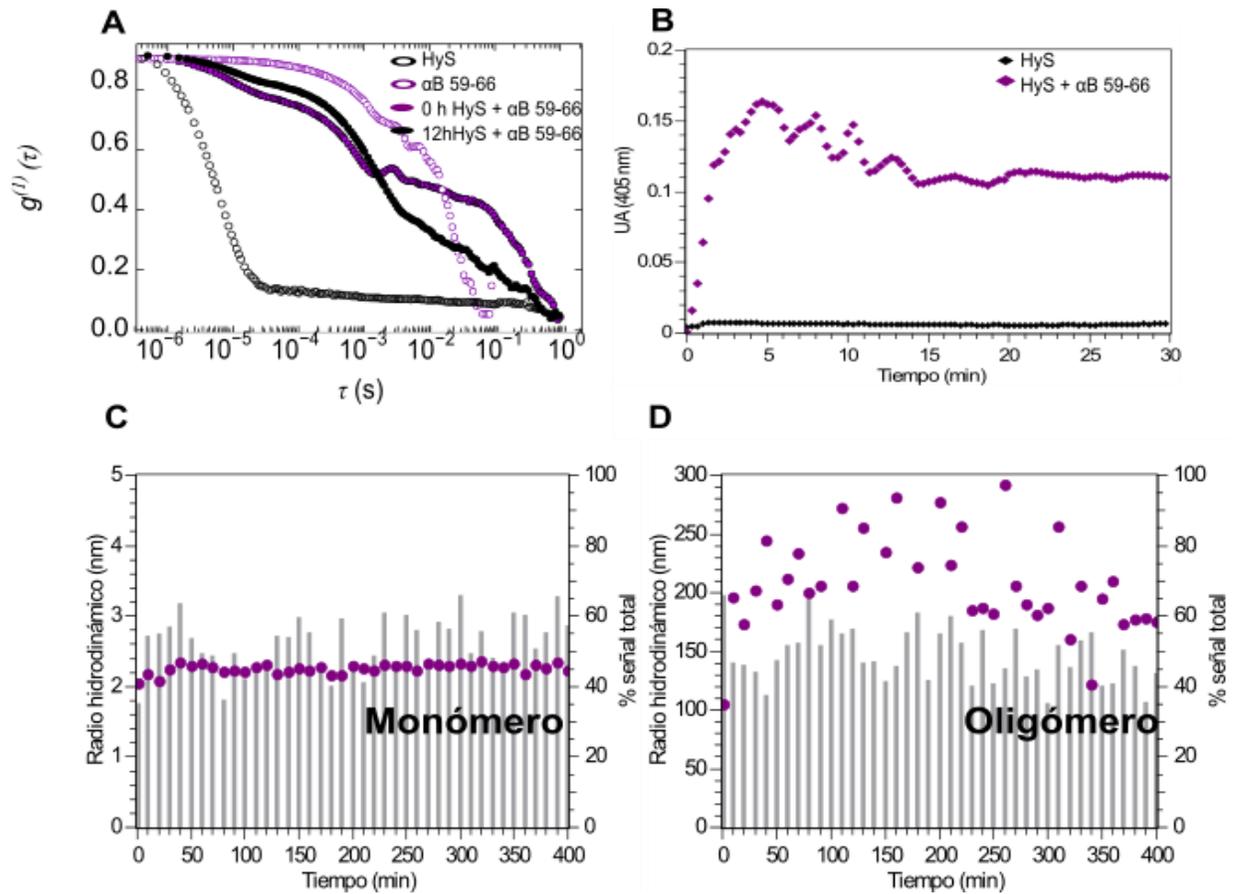


Figura 21. Cinética de agregación de HyS en presencia del péptido α B-(59-66) por dispersión dinámica de luz y turbidez. **(A)** Curvas de correlación. **(B)** Cinética de agregación. **(C)** Radio hidrodinámico estimado de la especie monomérica en función del tiempo. **(D)** Cambio en el radio hidrodinámico estimado para la especie oligomérica en función del tiempo. Las barras grises indican el porcentaje de señal correspondiente a la especie.

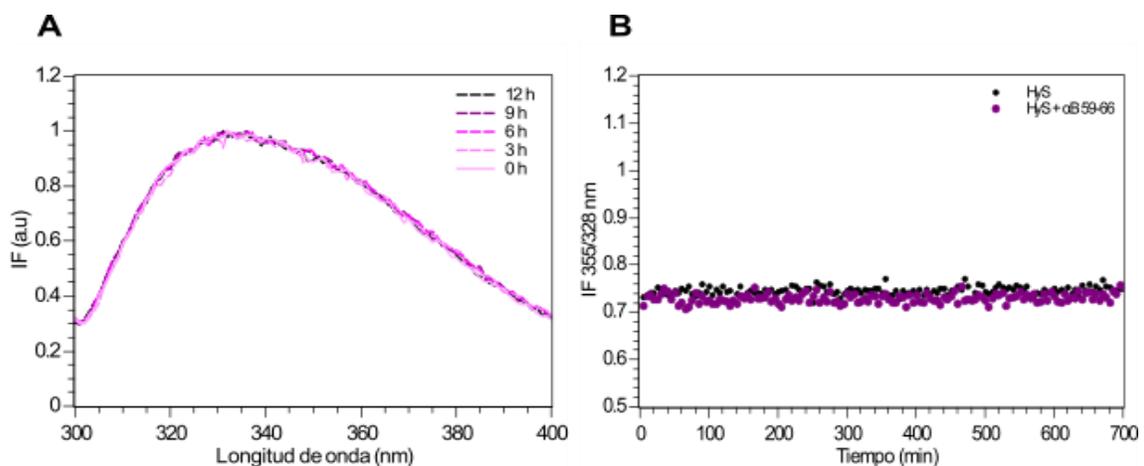


Figura 22. Cinética de desplegamiento de HyS en presencia del péptido α B-(59-66) seguida por fluorescencia. **(A)** Espectros correspondientes a las 0, 3, 6, 9 y 12 h. **(B)** Relación 355/328 nm respecto al tiempo

Por otro lado, la cinética seguida por fluorescencia mostró un corrimiento del máximo de emisión hacia el rojo, a 337 nm (Figura 22A). Ésto puede deberse a la presencia del Trp en la secuencia del péptido 59-66. La relación 355/328 indica que la proteína permanece plegada durante toda la cinética (Figura 22B). Por lo tanto, la interacción de HyS induce agregación, pero no induce desplegamiento de la proteína.

6. DISCUSIÓN

Las cristalinas son los principales componentes proteínicos de la lente; su estabilidad y disposición son fundamentales para la claridad y el índice de refracción del cristalino. Las cristalinas son proteínas muy estables, sin embargo, sufren diversos cambios durante el envejecimiento debido a factores externos como la radiación ultravioleta, estrés oxidativo, entre otros. Estos cambios producen ciertas modificaciones postraduccionales que pueden inducir cambios conformacionales, lo que lleva a las proteínas del cristalino a formar agregados. Entre estas modificaciones postraduccionales, la proteólisis puede conducir a la acumulación de fragmentos peptídicos. La degradación de cristalinas, en ocasiones, es parte del proceso de maduración normal o puede deberse a la activación de enzimas proteolíticas del cristalino. También es necesaria para eliminar proteínas desnaturalizadas. Aun así, las proteínas truncadas o péptidos cortos pueden acumularse en el cristalino debido a su producción excesiva o porque el sistema de degradación ya no puede descomponer los fragmentos (Santhoshkumar et al. 2008). Se sabe que el cristalino contiene fragmentos de cristalina degradados cuya concentración va aumentando con el avance de la edad. En este estudio se evaluaron cuatro fragmentos, α B- (1-18), α A- (70-88), α A- (66-80) y α B- (59-66) y se determinó que todos tienen un efecto en la agregación de HyS. La HyS representa cerca del 9 % del total de proteínas en lentes de ojos humanos. Tiene un alto contenido de residuos aromáticos que son constituyentes en la estructura y estabilidad de la proteína. Las cinéticas de agregación seguidas por DLS, demuestran que HyS forma grandes oligómeros inmediatamente después de la interacción con los péptidos (Tabla 5), siendo el fragmento α A- (70-88) el que indujo la formación de complejos con mayor radio hidrodinámico. Adicionalmente, por turbidez se observó que todos los péptidos parecen acelerar la agregación de la proteína desde los primeros minutos. Es importante resaltar, que si bien se parte de péptidos con radios hidrodinámicos grandes y que presentan una ligera turbidez (Figura 13), estos péptidos no presentan aumento en la turbidez durante las 12 horas del ensayo. Por el contrario, en las cinéticas de agregación de los complejos péptido-HyS sí se observa aumento en la turbidez. Este aumento puede deberse a agregación de la proteína o del péptido, pero tomando en cuenta reportes previos, es factible concluir que es la proteína quien sufre agregación.

Tabla 5. Radios hidrodinámicos en presencia de los péptidos estimados por DLS.

Radio aparente - % de la señal total		
	Tiempo inicial	12 horas
HγS + αB-(1-18)	Monómero~2.30 nm -8.5 %	~2.43 nm -6 %
	Oligómero~181.75 nm -91.5 %	~199.25 nm -88 %
HγS + αA-(70-88)	Monómero~2.25 nm -10 %	~2.21 nm -19.7 %
	Oligómero~175.35 nm -89.7 %	~837.9 nm -81.2 %
HγS + αA-(66-80)	Monómero~2.35 nm -31.8 %	~2.32 nm -26.4 %
	Oligómero~132.3 nm -62.2 %	~309.8 nm -48.1 %
HγS + αA-(59-66)	Monómero~2.25 nm -34.7 %	~2.12 nm -18.7 %
	Oligómero~104.9 nm -65.3 %	~238.35 nm -81.3 %

El efecto de estos péptidos puede ser debido a una interacción específica. Estudios previos han demostrado que los péptidos inducen un cambio conformacional en la proteína que conduce a una mayor exposición de los residuos hidrofóbicos, que resulta en una mayor interacción y agregación (Udupa & Sharma 2005). Sin embargo, los resultados de fluorescencia indican que la interacción de HγS con los fragmentos probados no induce desplegamiento de la proteína. Por lo tanto, si bien los péptidos inducen agregación, no siguen el mecanismo propuesto arriba. Pero, sería necesario realizar más estudios para descartar este mecanismo de inducción de la agregación.

Aunque comprender el mecanismo de agregación de un sistema particular no es crucial, un enfoque en los mecanismos de agregación de proteínas nos puede ayudar a entender el proceso. Podemos especular sobre una tendencia de los monómeros nativos a formar agregados de forma reversible. La superficie del monómero de proteína nativa es autoadhesiva, de modo que se autoensamblará fácilmente para formar pequeños oligómeros reversibles. Puede haber múltiples parches pegajosos o complementarios en la superficie del monómero que posteriormente pueden generar diferentes tipos de interfaces, produciendo efectivamente varios oligómeros de la misma estequiometría pero de diferentes patrones. Con el tiempo, estos agregados más grandes pueden volverse irreversibles, tal vez formando enlaces disulfuro. Estas proteínas agregadas se encuentran inicialmente en estado de monómero plegado y transformadas en dímeros u oligómeros, se consideran complejos estables

que pueden coexistir con los monómeros en equilibrio dinámico o pueden separarse de la solución. La insulina es sólo un ejemplo de una proteína terapéutica que se asocia fácilmente y normalmente para formar oligómeros reversibles (Dunn 2005). Así mismo, una contribución importante a las interacciones péptido-proteína son las interacciones electrostáticas que pueden conducir a la formación de oligómeros nativos reversibles así como oligómeros reversibles no nativos. En términos de energía, un efecto importante del plegamiento de proteínas es la pérdida de entropía conformacional. A diferencia de los dominios proteínicos plegados estables, los péptidos suelen ser moléculas flexibles en su estado libre, y pierden una gran cantidad de entropía configuracional al asociarse. Las proteínas son rígidas respecto a su asociación con los péptidos y para la mayoría de estas interacciones no inducen cambios conformacionales al unirse y la interfaz está mejor empaquetada conteniendo más enlaces de hidrógeno (London et al. 2010).

Estos agregados péptido-proteína pueden reclutar otras proteínas y péptidos y, por lo tanto, volverse resistentes a la degradación o eliminación. Por tanto, una acumulación constante de los péptidos de bajo peso molecular inicia una cascada que da como resultado la formación de agregados y el crecimiento de agregados en el cristalino, lo que provoca un aumento de la dispersión de la luz y conduce a la pérdida de visión y cataratas.

Aún quedan preguntas con respecto a la agregación de cristalina inducida por péptidos de bajo peso molecular en lentes humanos y con catarata. El desafío ahora es determinar la afinidad y los sitios de interacción de H₂S con los fragmentos peptídicos y su relación con la formación de catarata, y sobretodo, conocer el mecanismo de agregación que inducen estos péptidos en la proteína para buscar estrategias e inhibir la generación de los mismos.

7. CONCLUSIONES

1. Los fragmentos α B- (1-18), α A- (70-88), α A- (66-80) y α B- (59-66) tienen un efecto en la agregación de la proteína HyS.
2. Todos los fragmentos inducen formación de oligómeros de radio hidrodinámico grande.
3. La interacción de los fragmentos induce agregación, pero sin que haya desplegamiento de la proteína.

8. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto de los fragmentos α A-(66-75), α A-(67-75) y γ S-(167-178) en la agregación de HyS.
2. Modelado molecular para determinar sitios de unión probables entre los fragmentos de cristalinas y la HyS.
3. Búsqueda de estrategias para inhibir la generación de los péptidos o las interacciones de los mismos y poder retrasar o prevenir la aparición de cataratas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aliancy, J. F., & Mamalis, N. (2017). Crystalline Lens and Cataract. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. University of Utah Health Sciences Center.
- Alvarez Fontanet, E. (1995). Consecuencias del estrés oxidativo de la piel por radiaciones ultravioleta. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1), 0-0.
- Andjelić, S., & Hawlina, M. (2012). Cataractogenesis. *Slovenian Medical Journal*, 82.
- Andley, U. P. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26(1), 78–98.
- Barber, G. W. (1973). Human cataractogenesis: a review. *Experimental eye research*, 16(2), 85-94.
- Bassnett, S. (2002). Lens organelle degradation. *Experimental eye research*, 74(1), 1-6.
- Bassnett, S. (2009). On the mechanism of organelle degradation in the vertebrate lens. *Experimental Eye Research*, 88(2), 133–139.
- Beebe, D. C., Holekamp, N. M., & Shui, Y. B. (2010). Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts. *Ophthalmic research*, 44(3), 155-165.
- Bhattacharyya Jaya, Udupa Padmanabha E.G., Wang Jing, & S. K. K. (2006). Mini-alphaB-crystallin. *Biochemistry*, 45(9), 3069–3076.
- Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C., & Tardieu, A. (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Progress in biophysics and molecular biology*, 86(3), 407-485.
- Brautigam, C. A. (2015). Calculations and publication-quality illustrations for analytical ultracentrifugation data. In *Methods in enzymology* (Vol. 562, pp. 109-133). Academic Press.
- Callis, P. R., & Liu, T. (2004). Quantitative prediction of fluorescence quantum yields for tryptophan in proteins.

- Carver, J. A., & Lindner, R. A. (1998). NMR spectroscopy of α -crystallin. Insights into the structure, interactions and chaperone action of small heat-shock proteins. *International journal of biological macromolecules*, 22(3-4), 197-209.
- Chaves, J. M., Srivastava, K., Gupta, R., & Srivastava, O. P. (2008). Structural and functional roles of deamidation and/or truncation of N-or C-termini in human α A-crystallin. *Biochemistry*, 47(38), 10069-10083.
- Chen, J., Topygin, D., Brand, L., & King, J. (2008). Mechanism of the efficient tryptophan fluorescence quenching in human γ D-crystallin studied by time-resolved fluorescence. *Biochemistry*, 47(40), 10705-10721.
- Chen, W., Tan, X., & Chen, X. (2017). Anatomy and Physiology of the Crystalline Lens. In *Pediatric Lens Diseases*. Springer, Singapore 21-28.
- Deloitte Access Economics (2014) The economic cost and burden of eye diseases and preventable blindness in Mexico. <https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/au/Documents/Economics/deloitte-au-economics-cost-eye-diseases280314.pdf>. Accedido 27 Marzo, 2020.
- Dunn, M. F. (2005). Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer—a review. *Biometals*, 18(4), 295-303.
- Fernald, R. D., & Wright, S. E. (1983). Maintenance of optical quality during crystalline lens growth. *Nature*, 301(5901), 618-620.
- Ferrer Fernández, Y., Martínez Sánchez, G., Leroy Wright, D., & Thndiwe Chellah, N. (2009). El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(3), 1–11.
- Forsythe, H. M., Vetter, C., Jara, K. A., Reardon, P. N., David, L. L., Barbar, E. J., & Lampi, K. J. (2019). Cataract-associated deamidations on the surface of γ S-crystallin increase protein unfolding and flexibility at distant regions. *bioRxiv*, 646083.
- Glasser, A. (2006). Accommodation: mechanism and measurement. *Ophthalmol Clin North Am*, 19(1), 1-12.
- Graw, J. (2004). Congenital hereditary cataracts. *International Journal of Developmental Biology*, 48(8-9), 1031-1044.

- Graw, J. (2009). Genetics of crystallins: Cataract and beyond. *Experimental Eye Research*, 88(2), 173–189.
- Grishaev, A., Wu, J., Trehwella, J., & Bax, A. (2005). Refinement of multidomain protein structures by combination of solution small-angle X-ray scattering and NMR data. *Journal of the American Chemical Society*, 127(47), 16621–16628.
- Hanson, S. R., Hasan, A., Smith, D. L., & Smith, J. B. (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(2), 195-207.
- Hanson, S. R., Smith, D. L., & Smith, J. B. (1998). Deamidation and disulfide bonding in human lens γ -crystallins. *Experimental eye research*, 67(3), 301-312.
- Harrington, V., Srivastava, O. P., & Kirk, M. (2007). Proteomic analysis of water insoluble proteins from normal and cataractous human lenses. *Mol Vis*, 13, 1680-1694.
- Hecht, Eugene, *Optics*, 2nd Ed, Addison Wesley, 1987.
- Hejtmancik, J. F. (2008). Congenital cataracts and their molecular genetics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19(2), 134–149.
- Hemmingsen, J. M., Gernert, K. M., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (1994). The tyrosine corner: A feature of most greek key β -barrel proteins. *Protein Science*, 3(11), 1927-1937.
- Hoehenwarter, W., Klose, J., & Jungblut, P. R. (2006). Eye lens proteomics. *Amino acids*, 30(4), 369-389.
- Horwitz, Joseph. (2000). The function of alpha-crystallin in vision. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 11(1), 53–60.
- Horwitz, Joseph. (2003). Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research*, 76(2), 145–153.
- Huang, C. H., Wang, Y. T., Tsai, C. F., Chen, Y. J., Lee, J. S., & Chiou, S. H. (2011). Phosphoproteomics characterization of novel phosphorylated sites of lens proteins from normal and cataractous human eye lenses. *Molecular vision*, 17, 186.
- Iribarren, R. (2015). Crystalline lens and refractive development. *Progress in Retinal*

and Eye Research, 47, 86–106.

- Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R. K., & Goldman, J. E. (1989). α B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell*, 57(1), 71-78.
- Iwaki, T., Wisniewski, T., Iwaki, A., Corbin, E., Tomokane, N., Tateishi, J., & Goldman, J. E. (1992). Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. *The American journal of pathology*, 140(2), 345.
- Jaenicke, R., & Slingsby, C. (2001). Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(5), 435-499.
- Kannan, R., Santhoshkumar, P., Mooney, B. P., & Sharma, K. K. (2013). The α A66–80 Peptide Interacts with Soluble α -Crystallin and Induces Its Aggregation and Precipitation: A Contribution to Age-Related Cataract Formation. *Biochemistry*, 52(21), 3638-3650.
- Kosinski-Collins, M. S., & King, J. (2003). In vitro unfolding, refolding, and polymerization of human γ D crystallin, a protein involved in cataract formation. *Protein Science*, 12(3), 480-490.
- Kuszak, J. R., & Costello, M. J. (1992). Embryology and anatomy of human lenses. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*.
- Lam, D., Rao, S. K., Ratra, V., Liu, Y., Mitchell, P., King, J., & Chang, D. F. (2015). Cataract. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-15.
- Lampi, K. J., Wilmarth, P. A., Murray, M. R., & David, L. L. (2014). Lens β -crystallins: the role of deamidation and related modifications in aging and cataract. *Progress in biophysics and molecular biology*, 115(1), 21-31.
- Lapko, V. N., Smith, D. L., & Smith, J. B. (2003). Methylation and carbamylation of human γ -crystallins. *Protein science*, 12(8), 1762-1774.
- Le Grand, Y., & El Hage, S. G. (1980). *Physiological Optics: Springer Series in Optical Sciences*.
- Liu, J. P., Schlosser, R., Ma, W. Y., Dong, Z., Feng, H., Liu, L., & Li, D. W. C. (2004). Human α A-and α B-crystallins prevent UVA-induced apoptosis through regulation of PKC α ,

RAF/MEK/ERK and AKT signaling pathways. *Experimental eye research*, 79(3), 393-403.

- London, N., Movshovitz-Attias, D., & Schueler-Furman, O. (2010). The structural basis of peptide-protein binding strategies. *Structure*, 18(2), 188-199.
- Lovicu, F. J., & McAvoy, J. W. (2005). Growth factor regulation of lens development. *Developmental biology*, 280(1), 1-14.
- Lowe, J., McDermott, H., Pike, I., Spendlove, I., Landon, M., & Mayer, R. J. (1992). α B crystallin expression in nonlenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *The Journal of pathology*, 166(1), 61-68.
- MacCoss, M. J., McDonald, W. H., Saraf, A., Sadygov, R., Clark, J. M., Tasto, J. J., & Clark, J. I. (2002). Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 7900-7905.
- Mayr, E. M., Jaenicke, R., & Glockshuber, R. (1997). The domains in γ B-crystallin: identical fold-different stabilities. *Journal of molecular biology*, 269(2), 260-269.
- McAvoy, J. W. (1978). Cell division, cell elongation and the co-ordination of crystallin gene expression during lens morphogenesis in the rat. *Development*, 45(1), 271-281.
- Michael, R., Van Marle, J., Vrensen, G. F. J. M., & Van Den Berg, T. J. T. P. (2003). Changes in the refractive index of lens fibre membranes during maturation - Impact on lens transparency. *Experimental Eye Research*, 77(1), 93-99.
- Mishra, S., Stein, R. A., & Mchaourab, H. S. (2012). Cataract-linked γ D-crystallin mutants have weak affinity to lens chaperones α -crystallins. *FEBS Letters*, 586(4), 330-336.
- Mornon, J. P., Halaby, D., Malfois, M., Durand, P., Callebaut, I., & Tardieu, A. (1998). α -Crystallin C-terminal domain: on the track of an Ig fold. *International journal of biological macromolecules*, 22(3-4), 219-227.
- Nagaraj, R. H., Nahomi, R. B., Mueller, N. H., Raghavan, C. T., Ammar, D. A., & Pe-trash, J. M. (2016). Therapeutic potential of α -crystallin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(1), 252-257.
- Ottonello, S., Foroni, C., Carta, A., Petrucco, S., & Maraini, G. (2000). Oxidative stress and age-related cataract. *Ophthalmologica*, 214(1), 78-85.
- Patel, P. M., Jivani, N., Malaviya, S., Gohil, T., & Bhalodia, Y. (2012). Cataract: A major

secondary diabetic complication. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(7), 180-185.

- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S., & Davies, M. J. (2012). Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(1), 38-53.
- Purkiss, A. G., Bateman, O. A., Goodfellow, J. M., Lubsen, N. H., & Slingsby, C. (2002). The X-ray crystal structure of human γ S-crystallin C-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4199-4205.
- Ray, N. J., Hall, D., & Carver, J. A. (2016). Deamidation of N76 in human γ S-crystallin promotes dimer formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(1), 315-324.
- Renkawek, K., De Jong, W. W., Merck, K. B., Frenken, C. W. G. M., Van Workum, F. P. A., & Bosman, G. J. C. G. M. (1992). α B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta neuropathologica*, 83(3), 324-327.
- Robinson, N. E., Lampi, K. J., Speir, J. P., Kruppa, G., Easterling, M., & Robinson, A. B. (2006). Quantitative measurement of young human eye lens crystallins by direct injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Mol Vis*, 12, 704-11.
- Sabanayagam, C., & Cheng, C.-Y. (2017). Global causes of vision loss in 2015: are we on track to achieve the Vision 2020 target? *The Lancet Global Health*, 5(12), 1164–1165.
- Santhoshkumar, P., Raju, M., & Sharma, K. K. (2011). α A-crystallin peptide 66 SDRD-KFVIFLDVKHF 80 accumulating in aging lens impairs the function of α -crystallin and induces lens protein aggregation. *PloS one*, 6(4), 19291.
- Santhoshkumar, P., Udupa, P., Murugesan, R., & Sharma, K. K. (2008). Significance of interactions of low molecular weight crystallin fragments in lens aging and cataract formation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8477-8485.
- Serebryany, E., & King, J. A. (2014). The $\beta\gamma$ -crystallins: Native state stability and pathways to aggregation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 115(1), 32–41.
- Sharma, K. K., & Santhoshkumar, P. (2009). Lens aging: effects of crystallins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1095-1108.

- Shiels, A., & Hejtmancik, J. F. (2007). Genetic origins of cataract. *Archives of ophthalmology*, 125(2), 165-173.
- Sinha, D., Esumi, N., Jaworski, C., Kozak, C. A., Pierce, E., & Wistow, G. (1998). Cloning and mapping the mouse *Crygs* gene and non-lens expression of [gamma] S-crystallin. *Mol Vis*, 4(8).
- Sinha, D., Wyatt, M. K., Sarra, R., Jaworski, C., Slingsby, C., Thaung, C., & Wistow, G. (2001). A temperature-sensitive mutation of *Crygs* in the murine *Opj* cataract. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9308-9315.
- Srivastava, O. P., Chaves, J. M., & Srivastava, K. (2012). *in vivo*-Existing Human Lens Crystallin Fragments Form Amyloid-Type Aggregates *in vitro*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(14), 2278-2278.
- Srivastava, O. P., Srivastava, K., & Silney, C. (1996). Levels of crystallin fragments and identification of their origin in water soluble high molecular weight (HMW) proteins of human lenses. *Current eye research*, 15(5), 511-520.
- Srivastava, O. P., Srivastava, K., Chaves, J. M., & Gill, A. K. (2017). Post-translationally modified human lens crystallin fragments show aggregation *in vitro*. *Biochemistry and biophysics reports*, 10, 94-131.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8(4), 409-427.
- Su, S. P., McArthur, J. D., Friedrich, M. G., Truscott, R. J., & Aquilina, J. A. (2011). Understanding the α -crystallin cell membrane conjunction. *Molecular Vision*, 17, 2798.
- Sun, H., Ma, Z., Li, Y., Liu, B., Li, Z., Ding, X., Shen, Y. (2005). Gamma-S crystallin gene (*CRYGS*) mutation causes dominant progressive cortical cataract in humans. *Journal of Medical Genetics*, 42(9), 706–710.
- Takata, T., Oxford, J. T., Demeler, B., & Lampi, K. J. (2008). Deamidation destabilizes and triggers aggregation of a lens protein, β A3-crystallin. *Protein science*, 17(9), 1565-1575.
- Takemoto, L., & Sorensen, C. M. (2008). Protein-protein interactions and lens transparency. *Experimental Eye Research*, 87(6), 496–501.

- Thompson, J., & Lakhani, N. (2015). Cataracts. *Primary Care: Clinics in office practice*, 42(3), 409-423.
- Truscott, R. J. W. (2005). Age-related nuclear cataract - Oxidation is the key. *Experimental Eye Research*, 80(5), 709–725.
- Udupa, E. P., & Sharma, K. K. (2005). Effect of oxidized β B3-crystallin peptide on lens β L-crystallin: interaction with β B2-crystallin. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(7), 2514-2521.
- Van Rens, G. L., Raats, J. M., Driessen, H. P., Oldenburg, M., Wijnen, J. T., Khan, P. M., & Bloemendal, H. (1989). Structure of the bovine eye lens γ s-crystallin gene (formerly β s). *Gene*, 78(2), 225-233.
- Vendra, V. P. R., 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(12), 51401.
- Vendra, V. P. R., Khan, I., Chandani, S., Muniyandi, A., & Balasubramanian, D. (2016). Gamma crystallins of the human eye lens. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(1), 333–343.
- Wang, K., & Spector, A. (1994). The Chaperone Activity of Bovine alpha Crystallin. *J. Biol. Chem.*, 269, 13601.
- Whitley, M. J., Xi, Z., Bartko, J. C., Jensen, M. R., Blackledge, M., & Gronenborn, A. M. (2017). A Combined NMR and SAXS Analysis of the Partially Folded Cataract-Associated V75D γ D-Crystallin. *Biophysical Journal*, 112(6), 1135–1146.
- WHO. (2019) Visual impairment and blindness. 2019. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/>. Accedido 24 Marzo, 2020.
- Wilmarth, P. A., Tanner, S., Dasari, S., Nagalla, S. R., Riviere, M. A., Bafna, V., & David, L. L. (2006). Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility?. *Journal of proteome research*, 5(10), 2554-2566.
- Wu, Z., Delaglio, F., Wyatt, K., Wistow, G., & Bax, A. (2005). Solution structure of γ S-crystallin by molecular fragment replacement NMR. *Protein science*, 14(12), 3101-3114.

- Xi, Y. B., Zhang, K., Dai, A. B., Ji, S. R., Yao, K., & Yan, Y. Bin. (2014). Cataract-linked mutation R188H promotes β 2-crystallin aggregation and fibrillization during acid denaturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 447(2), 244–249.
- Zarina, S., Zaidi, Z. H., Driessen, H., Srinivasan, N., Slingsby, C., & Jaenicke, R. (1994). Three-dimensional model and quaternary structure of the human eye lens protein γ S-crystallin based on β - and γ -crystallin X-ray coordinates and ultracentrifugation. *Protein Science*, 3(10), 1840-1846.
- Zhang, K., Zhu, X., & Lu, Y. (2018). The proteome of cataract markers: focus on crystallins. In *Advances in clinical chemistry* 86, 179-210.
- Zhang, W., Xiao, S., & Ahn, D. U. (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(11), 1191-1201.
- Zhao, H., Piszczek, G., & Schuck, P. (2015). SEDPHAT—a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods*, 76, 137-148.

DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **“Efecto de fragmentos peptídicos de cristalinas en la agregación de la gamma-s-cristalina humana (HyS)”**, que presenta la alumna **Alma Patricia Galindo Guzmán (10024366)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Carlos Daniel Amero Tello CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC-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

ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA | Fecha:2020-11-12 09:11:27 | Firmante

BulBR1s97iWjoPvy/CR8fZR4MY74alx4XwGqpUwSxOsf/+BFW3gHNUJACt/qj3YU4LDWREZg2gxnQAh/6FQ09eP+ia6s6FclM4ifDyOZCB5jcDKnkC8J2y18vrhW3wkYeYm0QCto
gXw6nW3Hp7nH82cC/Hq1g7FHc8Wsv/Z+ZjoaAV8cFDAJTaNOOZ3RX2R5RoDk3tJnp061XVvrDn9l75FFgDsAgT5sRAOCAV+V5JCq1yKhL6+EyQf3HbXdl2ZgDfKf/j2chclzTSh
XmUqqe+6WtsC/Xrw7c9xTiY130JF4hdSkLaPL+zw4ChgHy5Cx8SmEyf0djTMXbVj0uIPA==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2020-11-12 11:01:36 | Firmante

XIZ7CCdqTUdGw8mnbWyD+zrn/D8n+0wuUi3Afm654UETNz8eCHyweolG5wUT0b7r4KwNTG9ZBJpdmvHXPQG5VrK1Vheljls4NYXFJC+VhYnmWiuFpKzaEjz9TrWkzURVN8n0
sQz6Ki/fmunJJ/5kdCm1wUll0FJAtiW1H0dL/5zje95pbWH3mvMNT8e/wScejQUoWG088ax886ii42r8oD/Dd0wtKkint2aBmEY+baA0koEQcJ2QMLUUKzmkLtYKGCJnX0hXm0fzjY
hpDIRpSiOB0uv4rZXQwJfI3X07Us+QgflKpdKAKSkv7LGujnFX5zEY7ZFeo0592pa/9lu1g==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2020-11-12 14:38:46 | Firmante

P5AKUN6vPUGaQ38uffaBPaeARAnNusWqwlMhy5KPEp+0DebMRlsmjP23MTLKSUmYVLLL9vPOibPO74iVWUK2oDjuNCHM/+vdz3AaQHJfH6CScJCaHmTnlf6poDhu/UCS
DyDprj66tzqsfK8/Y9t9pwAwuNbeAKrwHTDO8nEOvsBAP/qRbayo3AwxcbVFdOvomURBvtXcfzBH46YBrfHOJ/w3kzRSnjtb1L3u9gAjq2GLHYk8ojPh3DVCwYerpM5rGkhV/u6VG
yyGWz69uzItJpercvKoncZ2MJMiGf1P9UU/1eAT3VPXoL1wnfa5mjTm8NtlxG4nlp+uyZ4vRw==

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2020-11-18 12:48:47 | Firmante

IG2UbyiSulLG4+LZMvVThwsRXL+Q+0lc8PHQWN7N12DmaZGc9x7WwAJ7/d2eA3aN47OchRI1XedNmW4z08vlo8m8ei/2TKXKDoR4nPhHd7j1/wNMVzgjYRjya5RjtEk83O/D
Wo4xwVOM47OCs8YdPzxp+17gY8LssDvsH5trFnmWvQuQ1Wu+xA3bBTkGHxN2+GiZTQO3UGSRdKlQPgnpTxLi5kPXqPInslrDW3ly7+aBDlvE40mMdX0pYgy2Prk17szB92j
tgCOINWH1IsicUBPuAQhGZ+2HU8TR4pdc33mf4MUxpreCejFaFgJ7yb2Ldp+aTIY470r/o7kTKiQ==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2020-11-18 15:21:47 | Firmante

bWpTW5LtiK+4PUHFhySDv2K8YHWWF/dnoUxp+IDSCDgmpEONv0hOcgdGFJqnyihDC+guLSKyTZz2NCzQAsa8l38+Ungje4hrOhwJXyKZ1pQ9mzrnQJbVSfUJ1oggy9Na3kFh
2FeB1t1KYeuIYadH6CWPZYVknslAwTphKt7oeohMavuOV3T2cF802/vRiNtL9D9cmDcik5KE1GMeRneZ7TCmal9Lh0SRaRnz0pe9d8XB82ceinmU4zuYTuVJ318ZwEPyLl68yO2u
e5sZ3VRWZANKnbcM0/PiyME1/K7Rr+zesvSk0VDdxTQs+DSc+IWaf8Dh4bbAPD4uMBFiQh99A==

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



prMJ3o

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/AoW5HncinLAYBTFhdcKaHTMdTbPWF8EO>

