

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Efectos de la radiación UV en la estructura y estabilidad de la proteína β A1
cristalina humana y su interacción con otras proteínas oculares.**

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA: LAURA PÉREZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR: DR. CARLOS DANIEL AMERO TELLO

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2026

Resumen

Las cataratas siguen siendo una de las principales causas de ceguera a nivel mundial. La transparencia del cristalino depende del equilibrio estructural mantenido por una alta concentración de proteínas cristalinas. La alteración de este equilibrio conduce a la formación de agregados proteicos responsables de la opacidad característica de esta enfermedad.

Entre los factores implicados, la radiación ultravioleta (UV) representa un estrés capaz de inducir modificaciones estructurales en las proteínas del cristalino. La β A1 cristalina humana es una proteína estructural de la familia de las β cristalinas cuya estabilidad junto con la de las demás proteínas cristalinas, es esencial para mantener la transparencia ocular. Aunque diversos estudios han evaluado el efecto de la radiación sobre cristalinas aisladas, el cristalino es un sistema altamente concentrado donde las interacciones proteína-proteína pueden influir en los mecanismos de desestabilización y agregación.

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar los cambios en la estabilidad y evaluar los procesos de agregación inducidos por radiación UV en la β A1 cristalina humana, así como el posible impacto de su interacción con la HyS cristalina. Las muestras fueron irradiadas durante 2 horas y posteriormente incubadas hasta completar 12 horas de seguimiento. Los cambios estructurales y la formación de agregados se monitorearon mediante absorción de luz en la región visible (405 nm), espectroscopía de fluorescencia y dispersión dinámica de luz (DLS).

Los resultados muestran que la β A1 presenta mayor susceptibilidad a la agregación inducida por UV cuando se encuentra aislada. En contraste, al estudiarla en mezclas con la HyS cristalina, el efecto de la radiación disminuyó la magnitud de la agregación. Estos resultados resaltan que el entorno proteico influye en la estabilidad del cristalino y sugieren que la interacción entre estos dos tipos de cristalinas podrían actuar como un factor modulador frente al daño inducido por distintos factores.

Agradecimientos

A la **Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por la beca de posgrado otorgada (CVU 2054569), la cual permitió el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mi comité tutorial, la **Dra. Nina Pastor** y el **Dr. Enrique Rudiño**, por sus valiosos comentarios, su comprensión y revisión de este trabajo. Sus observaciones fueron fundamentales para esta historia.

A mis compañeros de laboratorio, tanto a los que están presentes como a los que ya han seguido nuevos caminos.

A mi familia, por brindarme su apoyo incondicional en cada paso de mi formación.

A **Yoel**, por ser mi compañía constante en todo momento. Gracias por seguirme hasta aquí y por abrazar mis sueños como si fueran los tuyos.

A **Patricia**, por aguantar mi mal genio y mis quejas constantes. Gracias por estar en mi vida durante todos estos años.

Por último y de manera muy especial, a mi tutor, el **Dr. Carlos Amero**. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio en el momento en que más lo necesitaba y por confiar en mí desde el primer día. Gracias por sus consejos, por su invaluable apoyo humano y profesional y por enseñarme que la ciencia se trata de pensar y dudar de todo. Mi gratitud hacia usted es infinita.

Índice

1. Introducción.....	6
1.1 Estructura del cristalino.....	6
1.2 Proteínas cristalinas.....	7
1.3 β A1 cristalina humana.....	11
1.4 Plegamiento y agregación de proteínas.....	12
1.5 Agregación de cristalinas.....	13
1.6 Radiación UV y daños en cristalinas.....	14
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. Metodología.....	18
4.1 Expresión de las proteínas en <i>Escherichia coli</i> BL21(RIL).....	18
4.2 Purificación de β A1 y HyS cristalinas.....	19
4.3 Análisis de estabilidad estructural por temperatura en ausencia de UV.....	20
4.4 Ensayos de estabilidad térmica en mezcla β A1:HyS.....	21
4.5 Ensayos de irradiación UVB de la β A1 y la mezcla.....	21
4.6 Técnicas de análisis y criterios de interpretación.....	21
4.6.1 Fluorescencia intrínseca de triptófano.....	22
4.6.2 Fluorescencia de Tioflavina T (ThT).....	22
4.6.3 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).....	22
4.6.4 Mediciones de turbidez.....	23
5. Resultados.....	24
5.1 Expresión y purificación de β A1 cristalina humana.....	24
5.1.1 Cromatografía de afinidad I.....	24
5.1.2 Digestión enzimática y cromatografía de afinidad II.....	26
5.1.3 Cromatografía de intercambio aniónico.....	27
5.2 Expresión y purificación de HyS cristalina humana.....	28
5.2.1 Cromatografía de afinidad I.....	28
5.2.2 Digestión enzimática y Cromatografía de afinidad II.....	29
5.3 Caracterización de las proteínas en estado nativo.....	33
5.3.1 Caracterización de la β A1 nativa.....	33

5.3.2 Caracterización de la HyS nativa.....	35
5.3.3 Variabilidad en el estado de asociación de la HyS.....	36
5.4 Análisis de estabilidad por temperatura en ausencia de UV.....	37
5.5 Análisis del efecto de la radiación UVB sobre la β A1 individual.....	39
5.6 Análisis de estabilidad estructural del β A1:HyS.....	42
5.6.1 Efecto de la temperatura en β A1, HyS y sus mezclas.....	42
5.6.2 Estado final del sistema: Agregación térmica a 85 °C.....	44
5.7 Efecto de la radiación UV sobre β A1, HyS y sus mezclas.....	45
5.7.1 Dinámica de agregación y cambios por irradiación UVB.....	47
5.7.2 Evolución del sistema durante 12 horas de incubación.....	51
5.7.3 Evolución del sistema tras radiación UVB y 12 h de incubación.....	52
5.8 Evaluación de la interacción de Tioflavina (ThT).....	55
5.8.1 Respuesta al estrés térmico.....	55
5.8.2 Respuesta a la radiación UVB.....	56
6.Discusión.....	58
7. Conclusiones.....	62
8. Perspectivas.....	62
10. Bibliografía.....	63

1. Introducción

Las cataratas puede definirse como la pérdida de transparencia del cristalino y representa un problema de discapacidad visual a nivel mundial, afectando a más de 94 millones de personas según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2023). Esta condición constituye una de las principales causas de ceguera en el mundo, con una mayor prevalencia en poblaciones pertenecientes a niveles socioeconómicos más bajos y países en desarrollo (Pascolini & Mariotti 2012). El padecimiento en México afecta a 760 mil personas y se estima que cada año se suman 47 600 nuevos casos según cifras de la Secretaría de Salud de México.

Si bien, las cataratas son tratable mediante la extracción quirúrgica de la lente y la implantación de una prótesis intraocular, este procedimiento conlleva costos significativos y puede resultar inaccesible en naciones con bajos ingresos (Lam *et al.*, 2015). Debido a que los daños en las proteínas del cristalino se acumulan progresivamente, las cataratas se consideran una condición degenerativa, siendo las relacionadas con la edad las más frecuentes. Sin embargo, también existen cataratas juveniles de origen genético vinculadas a mutaciones específicas en las proteínas del cristalino. Estas alteraciones comprometen la estabilidad proteica, promoviendo la desnaturalización y agregación a edades tempranas (Karri *et al.*, 2013; Pande *et al.*, 2001; Pande *et al.*, 2015; Vendra *et al.*, 2016). Sumado a los factores genéticos, existen otros que pueden provocar cataratas, están las enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus, la exposición a radiación ultravioleta (UV) y la presencia de metales (Javitt & Taylor, 1995; Truscott, 2005; Micun *et al.*, 2022).

1.1 Estructura del cristalino

Para comprender como se originan estas opacidades, es necesario analizar la naturaleza del cristalino. Este es una lente biconvexa con una alta concentración de proteínas, cuya función principal es refractar la luz hacia los fotorreceptores de la retina neurosensorial para permitir una visión espacial adecuada (Aliancy & Mamallis, 2017). Además de su papel óptico, funciona como un filtro natural para la radiación UV, absorbiendo la mayor parte de la radiación que llega a la retina (Fielding *et al.*, 2015). Anatómicamente, se ubica por delante del humor vítreo y por detrás del iris y del humor acuoso. Una característica crítica de su fisiología es que carece de un sistema propio de irrigación sanguínea, por lo que depende del humor acuoso para la obtención de los nutrientes necesarios para sustentar su metabolismo y la eliminación de desechos (Le Grand & El Hage, 1980).

Este aislamiento vascular tiene un origen en el desarrollo embrionario. El cristalino se desarrolla a partir del ectodermo superficial, constituyendo un tejido encapsulado por una membrana basal de colágeno, laminina y proteoglicanos que mantienen su forma característica (Kuszak & Costello, 1992). Durante el desarrollo, las células epiteliales subcapsulares de la región ecuatorial se diferencian en células fibrilares, un evento que implica un alargamiento celular y la degradación programada de sus organelos, incluido el núcleo. Esta eliminación de estructuras internas es fundamental ya que minimiza la dispersión de la luz y garantiza la transparencia necesaria para la función óptica (Lovicu & McAvoy, 2005). Sin embargo, esta especialización conlleva un costo biológico: al carecer de núcleo y maquinaria de síntesis, las proteínas no pueden ser reparadas ni resintetizadas (Donaldson & Lim, 2008; Artigas, 2015; Fielding *et al.*, 2015). Las células primarias, formadas en etapas tempranas, constituyen el núcleo del cristalino maduro, mientras que las células secundarias se añaden en capas concéntricas durante toda la vida. Ambas contienen principalmente proteínas cristalinas, que representan aproximadamente el 90 % del contenido proteico soluble del cristalino y son las responsables directas de las propiedades refractivas del ojo (Takemoto & Sorensen, 2008; Vendra *et al.*, 2016).

En consecuencia, la transparencia del cristalino depende de un equilibrio extremadamente delicado en la composición y estabilidad de estas proteínas. Cualquier alteración en este orden molecular conduce a la opacidad, impidiendo el paso normal de la luz (Jaenicke & Slingsby, 2001). Por ello, resulta fundamental comprender los mecanismos moleculares que regulan la estabilidad proteica para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas.

1.2 Proteínas cristalinas

Las cristalinas son proteínas solubles en agua, termodinámicamente estables y su función principal es contribuir a la transparencia y a las propiedades reflectantes del cristalino, formando una solución concentrada en el interior de sus células (Sharma & Santhoshkumar, 2009). En vertebrados, estas se clasifican en dos grupos principales: las α -cristalinas y las $\beta\gamma$ -cristalinas (Bloemendal *et al.*, 2004).

Las α -cristalinas representan una fracción importante de las cristalinas en la lente humana y se localizan tanto en las células epiteliales como en las fibras (Andley, 2007). Sus dos monómeros, productos de los genes αA (20 kDa) y αB (22 kDa) comparten un 60 % de similitud en su secuencia (Hoehenwarter *et al.*, 2006). Estructuralmente, la α -cristalina es un oligómero dinámico formado en su mayoría por láminas β y pocas hélices α adoptando un plegamiento tipo

β -sándwich antiparalelo o immunoglobulin-like fold (Sun & MacRae, 2005; Bagneris *et al.*, 2009). Más allá de su aporte estructural, las α -cristalina pertenecen a la familia de proteínas de choque térmico (sHSP) (Andley, 2007) y actúan como chaperonas moleculares. Su función es crucial: se unen a proteínas dañadas para evitar que se aglomeren, manteniendo así la transparencia y solubilidad de la lente (Horwitz, 2003; Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Además de su papel protector contra la agregación térmica en β -cristalina (Horwitz, 2003), inhiben la apoptosis inducida por radiación UV mediante la modulación de las vías de señalización PKC α , RAF/MEK/ERK y AKT (Liu *et al.*, 2004). Es importante destacar un mecanismo de respuesta diferencial: bajo condiciones de estrés, la expresión de α B-cristalina puede aumentar, es decir, ocurre una regulación positiva de este gen para proteger a las células contra la muerte celular (Nagaraj *et al.*, 2016). No obstante, este mecanismo de defensa ocurre únicamente en las células epiteliales del cristalino que conservan su núcleo y no en las fibras maduras que carecen de maquinaria transcripcional.

A diferencia de las α , la superfamilia de las $\beta\gamma$ -cristalinas constituye la mayor parte de la masa proteica del cristalino. Aunque ambas familias comparten una identidad entre el 29 % y el 35 % (Fig. 1) y un centro globular formado por dos dominios, formados a su vez por cuatro hebras β que se intercalan y disponen el dominio en una conformación de hoja β antiparalela (plegamiento tipo llave griega) presentan diferencias fundamentales en su estado de asociación. Las γ -cristalinas se componen de siete proteínas(γ A, γ B, γ C, γ D, γ E, γ F y γ S) aunque solo las cristalinas γ D, γ C y γ S se expresan en lentes humanos a concentración apreciable (Andley, 2006). Estructuralmente, han sido descritas como monoméricas y representan la fracción menos abundante de esta superfamilia (Hejtmancik & Smaoui, 2003; Xi *et al.*, 2014).

La familia de las β -cristalinas está formada por un grupo de siete proteínas (β A1, β A2, β A3, β A4, β B1, β B2 y β B3). Estas se clasifican, atendiendo a la extensión en sus dominios, en ácidas (β A1, β A2, β A3, y β A4) cuando posee una sola extensión en el dominio N-terminal y en básicas (β B1, β B2 y β B3) si la extensión se encuentra en ambos dominios. A diferencia de las γ , estas proteínas pueden asociarse formando tanto homo como heterodímeros (Downard *et al.*, 2011; Bloemendal *et al.*, 2004). En particular, se ha descrito que las cristalinas β B1, β B3 y β A4 forman homooligómeros, mientras que β B2 forma dímeros en solución y hetero-oligómeros con las cristalinas β A1, β A2 y β A3 (Bateman *et al.*, 2003). En cuanto a sus dimensiones, los monómeros tienen masas entre 22 y 30 kDa (Lampi *et al.*, 1997) mientras que los oligómeros pueden llegar hasta 200 kDa (Graw, 2009).

La distribución de estas proteínas está ligada al desarrollo: la β B1 y β B3 se expresan principalmente durante las etapas tempranas del desarrollo del cristalino lo que las posiciona mayoritariamente en el núcleo del cristalino maduro. Por otro lado, la β B2 cristalina destaca por ser una de las más estable entre todas las β -cristalinas y presenta una alta capacidad de asociación proteína-proteína con otras cristalinas. Un detalle estructural clave se observa en la estructura cristalográfica de la β B2 (PDB 2BB2) la cual muestra que puede formar dímeros mediante intercambio de dominios (domain swapping), sin embargo, estudios de NMR/SAXS indican que no adopta este tipo de arreglo en solución, sino que forma dímeros tipo “cara a cara” (Xu *et al.*, 2012; Bari, 2021).

Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de las cristalinas β y γ realizado con MAFFT y visualizado en Jalview. Los residuos conservados están coloreados según su tipo. Las secuencias incluidas corresponden a: β B1-crystallin (P53674), β B2-crystallin (P43320), β B3-crystallin (P26998), β A3/A1-crystallin (P05813), β A2-crystallin (P53672), β A4-crystallin (P53673), γ C-crystallin (P07315), γ D-crystallin (P07320) y γ S-crystallin (P22914).

Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de las cristalinas β y γ realizado con MAFFT y visualizado en Jalview. Los residuos conservados están coloreados según su tipo. Las secuencias incluidas corresponden a: β B1-crystallin (P53674), β B2-crystallin (P43320), β B3-crystallin (P26998), β A3/A1-crystallin (P05813), β A2-crystallin (P53672), β A4-crystallin (P53673), γ C-crystallin (P07315), γ D-crystallin (P07320) y γ S-crystallin (P22914).

1.3 β A1 cristalina humana

La cristalina β A1 es codificada por el gen *Cryba1*, el cual también codifica a la proteína β A3 cristalina humana mediante un mecanismo denominado "exploración ribosomal con fugas" (*leaky ribosomal scanning*). Este mecanismo permite la generación de variantes proteicas a partir de un solo ARNm mediante el uso de diferentes codones de inicio. Estructuralmente, la β A1 cristalina tiene una masa molecular de 23 kDa con 198 residuos de aminoácidos, presentando 17 residuos menos en su extremo N-terminal en comparación con la β A3 cristalina (Bloemendal *et al.*, 2004). Al igual que otras cristalinas, esta proteína está compuesta por dos dominios (N-terminal y el C-terminal) conectados por un *linker* de 5 aminoácidos. Debido a que no existe una estructura experimental resuelta, el estudio de su conformación se basa en un modelo obtenido por métodos computacionales por homología (Fig. 2). Más allá del lente ocular, la β A1 y la β A3 se distribuyen extra lenticularmente en tejidos como la retina, el epitelio pigmentado retinal y el cerebro. Además, la β A3 puede asociarse formando homodímeros o heterodímeros con otras cristalinas, interacciones que están mediadas principalmente por las extensiones del N-terminal (Bateman *et al.*, 2003; Serebryany *et al.*, 2014).

La β A1 destaca por ser una de las cristalinas con más triptófanos en su secuencia, sumando un total de nueve. Según el modelo estructural (Fig. 2) estos residuos presentan distintos grados de exposición al solvente: dos están expuestos al solvente (Trp122 y Trp136), tres son semiexpuestos (Trp14, Trp79 y Trp178) indicando una accesibilidad parcial de sus cadenas laterales y cuatro se encuentran ocultos en el *core* de la proteína (Trp56, Trp82, Trp151 y Trp181).

Debido a esta distribución de residuos de triptófano, la proteína presenta un máximo de emisión de fluorescencia cercano a los 345 nm para el estado plegado y 357 nm para el estado desplegado según los ensayos de desplegamiento inducidos por urea (Martínez Seoane, 2022). Esta sensibilidad espectral convierte a la fluorescencia intrínseca en una herramienta analítica clave para monitorear la estabilidad de β A1 frente a diversos factores de estrés.

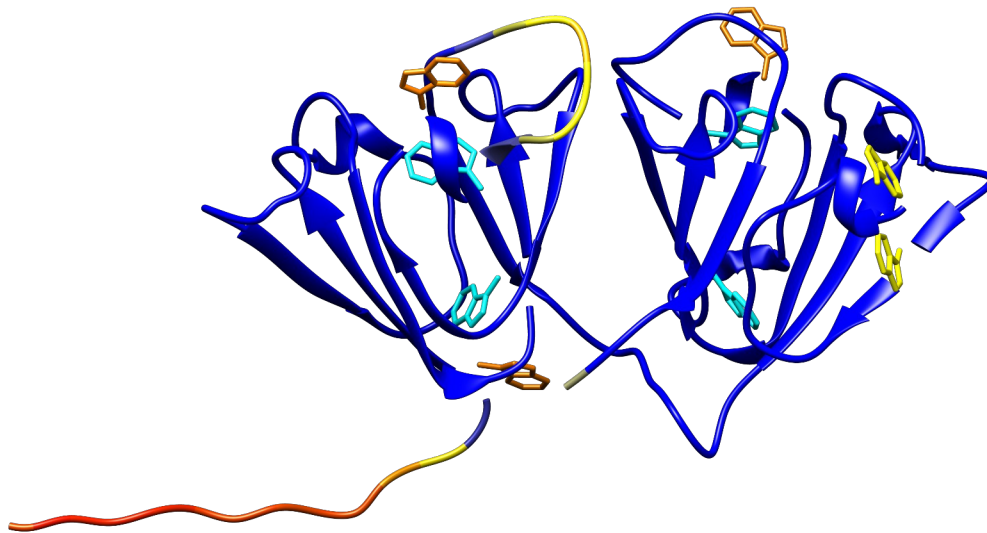


Figura 2. Representación estructural de la β A1 cristalina humana obtenida mediante un modelo tridimensional predicho con AlphaFold, generado mediante ColabFold en Google Colab (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=KK7X9T44pWb7>) a partir de la secuencia UniProt (ID: P05813-2) y visualizado en UCSF Chimera. La estructura está colorada según la confianza del modelo: azul alta confianza (>90), amarillo confianza intermedia y rojo/naranja baja confianza (<50). Se destacan las cadenas laterales de los residuos de triptófano clasificadas según su exposición al solvente: dos expuestos (Trp122 y Trp136) en amarillo, tres semi expuestos (Trp14, Trp79 y Trp178) en naranja y cuatro ocultos (Trp56, Trp82, Trp151 y Trp181) en cian.

1.4 Plegamiento y agregación de proteínas

La conformación nativa de una proteína se alcanza cuando se establece un conjunto de interacciones covalentes y no covalentes durante el proceso de plegamiento, resultando en una conformación energéticamente favorable y estable. Sin embargo, durante este proceso, la proteína puede experimentar interacciones no nativas que conduzcan a un plegamiento incorrecto, originando estructuras no funcionales que en algunos casos podrían ser más estables que la conformación nativa (Eichner & Radford, 2011). Si bien no todas las conformaciones no nativas conducen a la formación de agregados, ciertos estados parcialmente plegados o desplegados pueden favorecer la asociación intermolecular. Esto da lugar a diversos tipos de agregados proteicos, tales como oligómeros, agregados amorfos y fibras amiloides (Agbas, 2018). En condiciones fisiológicas, las células disponen de chaperonas y mecanismos de degradación para corregir estos estados; no obstante, cuando estos mecanismos fallan, los

agregados se acumulan y se vinculan a patologías como el Alzheimer, el Parkinson, la amiloidosis de cadena ligera y las cataratas (Chuang *et al.*, 2018).

De manera general, la agregación de proteínas puede ocurrir por la asociación no covalente o a través de interacciones covalentes (Finke *et al.*, 2000) generando agregados que pueden ser clasificados como solubles o insolubles dependiendo del sistema (Mori *et al.*, 2022). En el caso de la agregación por interacciones no covalentes, que involucra fuerzas hidrofóbicas, interacciones electrostáticas o la formación de estructuras tipo hoja-beta, se ha propuesto que los intermediarios formados durante el plegamiento o desplegamiento de proteínas son precursores clave para este proceso (Shamsi *et al.*, 2017). Esta ruta comienza con la nucleación, donde una proteína nativa inicia la formación del agregado en un paso que suele ser el más lento y limitante en la cinética (Wang, 2005; Buell, 2017), seguido por un crecimiento que ocurre mediante la unión de monómeros a multímeros o por interacción entre multímeros. Por el contrario, la agregación de proteínas mediada por enlaces covalentes se produce a través de la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína (Toichi *et al.*, 2013) o mediante enlaces isozeptídicos (Kang & Baker, 2011).

1.5 Agregación de cristalinas

En el caso de las cristalinas, la capacidad para mantener su conformación nativa es crucial para la transparencia y funcionalidad del cristalino ocular. Sin embargo, se ha reportado que estas proteínas son propensas a formar agregados en condiciones de estrés, como cambios en la temperatura o exposición a radiación UV, factores que contribuyen directamente al desarrollo de cataratas (Bloemendal *et al.*, 2004; Horwitz, 2003). Estudios previos han demostrado que los procesos de plegamiento y desplegamiento en estas proteínas pueden generar intermediarios que actúan como precursores clave para la formación de agregados (Shamsi *et al.*, 2017; Takata *et al.*, 2008).

Esta pérdida de estabilidad y el consecuente desplegamiento parcial pueden ser el resultado de diversas modificaciones post-traduccionales en sus residuos, tales como desamidación, glicosilación, oxidación o la escisión de alguno sus dominios (Basak *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006). En las proteínas del cristalino, dicha agregación se manifiesta mediante la formación de estructuras tanto ordenadas (tipo amiloide) como desordenadas (agregados amorfos) de alta masa molecular (Cetinel *et al.*, 2017; Muranov *et al.*, 2011). Para investigar estos fenómenos se

han empleado diversos métodos de estudio de estabilidad, incluyendo el uso de altas temperaturas, radiación ultravioleta (UV), desnaturalizantes químicos, iones metálicos, variación de pH y mutagénesis sitio-dirigida (Mafia *et al.*, 2008; Rivillas-Acevedo *et al.*, 2015).

Específicamente, la β A1 es considerada una proteína estable térmicamente, con una temperatura de fusión (T_m) reportada de aproximadamente 78 °C. No obstante, investigaciones previas utilizando ANS (8-anilino-1-naftalensulfonato) han revelado que la exposición de parches hidrofóbicos y la disminución de la solubilidad proteica pueden ocurrir durante eventos de desplegamiento, sugiriendo así una tendencia a la agregación (Martínez Seoane, 2022). Por lo tanto, resulta de gran interés determinar si factores de estrés ambiental pueden inducir cambios estructurales y promover la asociación intermolecular de esta proteína en condiciones que preceden a su desnaturalización global.

1.6 Radiación UV y daños en cristalinas

La exposición prolongada a los rayos ultravioletas (UV) es un factor determinante en el daño acumulativo de los tejidos oculares. Con el proceso natural de envejecimiento, la capacidad del ojo para filtrar esta radiación disminuye (Ferrer *et al.*, 2009), lo que posiciona a la radiación UV como uno de los principales factores asociados al desarrollo de cataratas (Delcourt *et al.*, 2014). Dentro del espectro UV (100-380 nm), este se clasifica según su longitud de onda en UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) y UVA (315-380 nm). De estos, la radiación UVC es bloqueada por los gases atmosféricos, la UVB es parcialmente absorbida por la capa de ozono y la radiación UVA es débilmente filtrada en la atmósfera (Diffey, 2002).

En el ojo, la córnea actúa como barrera primaria filtrando casi toda la radiación UVC y UVB restante, no obstante, una parte de la UVA alcanza y es absorbida por el cristalino. Aunque la cantidad de radiación que alcanza el cristalino es limitada, su exposición acumulativa es suficiente para inducir daño fotoquímico en las proteínas. La evidencia relaciona mayoritariamente a la radiación UVB con la formación de cataratas, debido a su alta energía, permitiendo un daño directo en las proteínas (Bochow *et al.*, 1989; Alvarez Fontanet, 1995). Por su parte, la radiación UVA contribuye de manera indirecta mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como oxígeno singlete que favorece la oxidación de regiones específicas y el daño de enzimas clave del cristalino (Truscott, 2005; Andley, 2007; Frederik, 1991).

En resumen, tanto la radiación UVA como la UVB provocan la pérdida de la estructura nativa en las cristalinas y su posterior agregación (Ostrovsky *et al.*, 2002; Sergeev *et al.*, 2005; Muranov *et al.*, 2011). Estos daños pueden originarse por mecanismos que incluye la fotooxidación directa de residuos de aminoácidos (Pattison *et al.*, 2012). Particularmente en los residuos de triptófano, la absorción de radiación UV genera estados excitados que de no disiparse mediante procesos de apagamiento o fluorescencia, derivan en reacciones de fotoionización y ruptura del anillo indol. Como consecuencia, se forman productos como N-formilquinurenina, quinurenina y especies relacionadas (Andley & Clark, 1989; Chen *et al.*, 2009; Muranov *et al.*, 2011). Además del triptófano, otros aminoácidos son afectados como residuos de tirosina y fenilalanina que pueden formar radicales libres, mientras que histidina, cisteína y metionina son susceptibles a la oxidación mediada por ROS (Pattison *et al.*, 2012).

La agregación de cristalinas inducidas por fotooxidación ha sido ampliamente estudiada. En particular, en las β -cristalinas, como β B2 y β B3, la exposición a radiación UVB provoca la ruptura de puentes salinos superficiales y la oxidación de residuos de cisteína a ácido cisteico (Andley & Clark 1989). Estudios *in vivo* en modelos animales con absorción de radiación UV similar a la humana han mostrado la agregación de proteínas solubles y la generación de péptidos de baja masa molecular (Jedziniak *et al.*, 1987). En paralelo, también se ha reportado alteraciones en las propiedades fluorescentes de las cristalinas, caracterizadas por una disminución en el contenido de triptófano y un aumento en la fluorescencia de otros fluoróforos (Muranov *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2013; Schafheimer & King, 2013).

Bajo estas condiciones de estrés, aunque las α -cristalinas actúan como chaperonas moleculares, su propia oxidación compromete esta función. Los fragmentos derivados de cristalinas oxidadas no solo interfieren con la función de las α -cristalinas, sino que pueden actuar como anti-chaperonas, uniéndose a proteínas parcialmente desplegadas y promoviendo su agregación (Andley, 2007; Schafheimer & King, 2013). En este mismo marco, la HyS al igual que las otras proteínas del cristalino sufre modificaciones inducidas por oxidación, la exposición a radiación UVB induce cambios estructurales que favorecen la formación de estados parcialmente desplegados que se comportan como monómeros modificados con alta tendencia a formación de agregados irreversibles (Muranov *et al.*, 2011).

Es importante señalar que la mayoría de los estudios sobre daño inducido por radiación en cristalinas se han realizado en proteínas aisladas. Sin embargo, en el cristalino, estas proteínas se encuentran en un medio altamente concentrado donde las interacciones entre distintas familias de proteínas son esenciales para mantener la transparencia. Se ha propuesto que la

transparencia depende de interacciones proteínas-proteínas débiles, cuando estas interacciones cambian por envejecimiento, mutaciones o modificaciones postraduccionales, se favorece la agregación y con ello la formación de las cataratas (Takemoto & Sorensen, 2008).

En este contexto, las β -cristalinas presentan una marcada tendencia a formar homo y heteroligómeros estables entre subunidades ácidas y básicas, siendo generalmente más favorables las interacciones entre subunidades distintas (Liu & Liang, 2007). Por ejemplo, mezclas como β B1/ β A3 forman heterotetrámeros en equilibrio con heterodímeros, mientras que complejos como β A3/ β B2 pueden estabilizarse mediante la participación de extensiones N y C terminales. Estas asociaciones no solo promueven estructuras de orden superior, sino que también modulan la estabilidad de las subunidades individuales (Bateman *et al.*, 2003). Asimismo, aunque hay pocos estudios, existen evidencias de que las interacciones entre diferentes clases de cristalinas son relevantes para mantener la transparencia del cristalino. Por ejemplo, sistemas binarios como β B1 y HyD pueden presentar separación de fases dependiente de la intensidad relativa de las interacciones entre proteínas, lo que indica que la respuesta de una cristalina no solo depende de su estabilidad intrínseca sino también del entorno proteico en que se encuentre (Wang *et al.*, 2010).

Justificación

En este sentido, el daño inducido por radiación no ocurre en un sistema de proteínas aisladas, sino en una red compleja de interacciones donde una cristalina dañada puede alterar la estabilidad, solubilidad o capacidad de asociación de las otras. A pesar de la relevancia de estas interacciones, aún no se comprende cómo modulan la respuesta de las cristalinas frente al daño inducido por radiación UV, particularmente en sistemas que involucran múltiples familias de proteínas. Por lo tanto, resulta fundamental estudiar cómo la interacción entre distintas cristalinas influye en su estabilidad estructural y en su propensión a la agregación bajo condiciones de estrés. Por ello, este trabajo se centra en el análisis de la β A1 cristalina humana y su interacción con HyS, evaluando su comportamiento frente a la radiación UV con el objetivo de comprender los mecanismos moleculares asociados a la formación de cataratas.

2. Hipótesis

La interacción de la proteína β A1 con la proteína HyS favorecerá su estabilidad estructural, lo que se traducirá en una mayor resistencia frente a los efectos dañinos de la radiación ultravioleta.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar cómo la interacción con la HyS modula la estabilidad estructural y la propensión a la agregación de la β A1 bajo condiciones de exposición a radiación UV.

3.2 Objetivos específicos

- Expresar y purificar las proteína cristalinas humanas β A1 y HyS.
- Caracterizar la estabilidad individual de la proteína β A1 bajo diferentes exposiciones a radiación UV.
- Evaluar el efecto de la interacción con HyS sobre la estabilidad estructural y la agregación de la β A1 en presencia de radiación UV.
- Comparar la respuesta de la β A1 en sistemas aislados y en sistemas binarios, para determinar el papel del entorno proteico en su susceptibilidad al daño fotoinducido.

4. Metodología

4.1 Expresión de las proteínas en *Escherichia coli* BL21(RIL)

Las proteínas se expresaron en la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL, la cual contiene el plásmido pRIL que codifica tRNAs para codones raros y confiere resistencia a Cloranfenicol. Las células fueron transformadas con los plásmidos pE-SUMO-CRYA1 y pE-SUMO-CRYGS, cada una codificando la proteína correspondiente fusionada a una etiqueta SUMO con cola de histidinas en el extremo N-terminal; estos plásmidos confieren resistencia a Ampicilina.

Las transformaciones se realizaron por choque térmico adicionando 1-5 µg de DNA plasmídico a 50 µL de células competentes. Las mezclas se incubaron durante 30 minutos en hielo, seguida de un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se mantuvo nuevamente en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se adicionaron 450 µL de medio SOC y las células se incubaron por 1 hora a 37 °C. Las células se sembraron en placas de LB-agar con Ampicilina (100 µg/mL) y Cloranfenicol (30 µg/mL), seleccionando así las colonias transformadas y asegurando el plásmido auxiliar pRIL.

Para la expresión de proteínas, se inoculó una colonia en 1 litro de medio LB suplementado con los antibióticos mencionados y se incubó a 37 °C con agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (DO 600 nm) de 0.6. La expresión se indujo con 0.33 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se continuó la incubación por 12 horas a 18 °C y 200 rpm.

Finalmente, el cultivo se centrifugó a 1600 x g durante 30 minutos. El precipitado celular se resuspendió en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, Imidazol 10 mM, pH 7.6). La lisis celular se realizó mediante sonicación en hielo, aplicando 30 ciclos consistentes en 1 minuto de pulsos y 1 minuto de descanso. El lisado resultante se centrifugó a 20 000 x g durante 45 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.22 µm como paso previo a la purificación cromatográfica.

4.2 Purificación de β A1 y HyS cristalinas

La purificación de las proteínas se llevó a cabo en tres etapas sucesivas: dos cromatografías de afinidad a quelatos metálicos y una cromatografía de intercambio aniónico.

Cromatografía de afinidad I

El sobrenadante filtrado se cargó en una columna HisTrap™, previamente cargada con Sulfato de Níquel (NiSO_4 , 100 mM) y equilibrada con tampón de carga (Tris-HCl 50 mM, Imidazol 10 mM, pH 7.6). Durante el proceso, se colectaron las fracciones no unidas (*flow-through*) y se procedió a realizar dos etapas de lavado para eliminar contaminantes inespecíficos: 5 volúmenes de columna (V_c) con el tampón de equilibrio y 5 V_c adicionales con un tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, 50 mM de Imidazol, pH 7.6).

La elución de la proteína fusionada a la etiqueta SUMO se realizó mediante un aumento escalonado en la concentración de Imidazol. Se observó que la proteína β A1 eluyó mayoritariamente a una concentración de 200 mM de Imidazol, mientras que HyS eluyó principalmente a 100 mM. Tras la elución de interés, se aplicó un pulso final de 500 mM de Imidazol para remover cualquier proteínas unidas a la matriz.

Las fracciones recolectadas se analizaron mediante SDS-PAGE al 15 %. Aquellas fracciones que presentaron la banda correspondiente a la proteína de interés y un alto grado de pureza fueron unificadas para proceder al corte enzimático de la etiqueta.

Eliminación de la etiqueta SUMO

La eliminación de la etiqueta His-SUMO se llevó a cabo mediante el uso de la proteasa específica Ulp1, empleando en relación molar 1:17 (proteasa:proteína). La reacción de proteólisis se incubó durante 12 horas a 30 °C y la eficiencia del corte se verificó mediante SDS-PAGE al 15 %.

Posteriormente, la muestra se dializó para eliminar el Imidazol residual utilizando una membrana con un límite de exclusión de 3-12 kDa frente a un tampón de diálisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.6), realizando cuatro cambios de solución cada 30 minutos para asegurar el equilibrio.

Cromatografía de afinidad II

La muestra dializada se aplicó nuevamente a una columna HisTrap™ previamente equilibrada con tampón (50 mM de Tris-HCl, pH 7.6). En esta segunda etapa de afinidad, las proteínas β A1 y HyS, ya libres de la etiqueta SUMO, no se unieron a la resina y se colectaron en las fracciones no unidas. Por el contrario, la etiqueta SUMO, la proteasa Ulp1 y otras impurezas remanentes

con afinidad por el Níquel que se fijaron a la matriz, eluyeron posteriormente a concentraciones de 200 y 500 mM de Imidazol. La presencia y pureza de las proteínas de interés se verificó nuevamente por SDS-PAGE al 15 %.

Cromatografía de intercambio aniónico

Como paso final de purificación, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones que contenían la proteína de interés se unificaron y se cargaron en una columna HiLoad 6/60 con matriz Q-Sepharosa, previamente equilibrada con 2 Vc de tampón (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH7.6). La elución se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de NaCl (desde 100 mM hasta 500 mM). La pureza final de las cristalinas se confirmó mediante SDS-PAGE al 15 %.

Determinación de la concentración de las proteínas

La concentración de cada proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Agilent), empleando una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. El cálculo de la concentración se realizó mediante la Ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon c l$), donde A es absorbancia, ϵ el coeficiente de extinción molar, c la concentración y l la longitud del paso óptico. Los coeficientes de extinción molar teóricos se calcularon a partir de la secuencia primaria de cada proteína utilizando la herramienta ProtParam (ExPASy). Se empleó un ϵ de 46 410 $M^{-1}cm^{-1}$ para la $\beta A1$ y de 42 860 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ para HyS.

4.3 Análisis de estabilidad estructural por temperatura en ausencia de UV.

Para evaluar la estabilidad térmica de $\beta A1$ en ausencia de radiación, las muestras se sometieron a un incremento térmico progresivo de temperatura desde 25 hasta 85 °C, empleando intervalos de 10 °C para el registro de datos. En cada punto de equilibrio térmico, se evaluó la estructura terciaria mediante espectros de fluorescencia intrínseca. De manera complementaria, se realizaron mediciones por dispersión dinámica de luz (DLS) con el objetivo de monitorear cambios en el tamaño hidrodinámico en función de la temperatura. En estos experimentos, el calentamiento se llevó a cabo en el equipo de DLS, y las mediciones de fluorescencia se realizaron retirando la muestra del sistema térmico para su posterior análisis.

4.4 Ensayos de estabilidad térmica en mezcla β A1:HyS

Para evaluar el comportamiento del sistema bajo condiciones de estrés térmico, se analizó la mezcla β A1:HyS en proporción 1:1 en un rango de temperatura de 25 a 85 °C. En este caso, los experimentos se realizaron mediante un enfoque cinético, permitiendo el seguimiento continuo de los cambios estructurales durante el proceso de calentamiento, sin retirar la muestra del sistema de medición.

4.5 Ensayos de irradiación UVB de la β A1 y la mezcla

Para evaluar el efecto de la radiación UVB en la estabilidad de las proteínas, se trabajó tanto con la β A1 individual como con las muestras β A1:HyS. Todas las muestras se prepararon a una concentración final de 25 μ M y se sometieron a irradiación empleando una lámpara UV de amplio espectro, con un rango de emisión de 280-320 nm. Este intervalo abarca principalmente la región del UVB, aunque incluye una pequeña contribución de la banda UVA en el límite de los 315-320 nm. Durante todos los experimentos, se mantuvieron constante el pH y la temperatura.

En el caso de la β A1 individual, se realizó un seguimiento del daño inducido en función del tiempo de exposición, empleando periodos de 15, 30, 45 y 120 minutos. Tras la irradiación, las muestras se incubaron 12 horas a 37 °C, con el fin de evaluar la evolución del proceso de agregación.

Para el estudio de las mezclas, se combinaron β A1 con HyS en diferentes proporciones molares (1:1, 1:0.75, 1:0.5 y 1:0.25), ajustando los volúmenes de cada componente para mantener una concentración final de 25 μ M en todas las muestras. Estas mezclas se sometieron a un tiempo fijo total de 2 horas de irradiación UVB, parámetro definido con base en estudios previos realizados en el laboratorio en los cuales se observaron cambios significativos bajo esas condiciones. Finalmente, tanto las muestras individuales como las mezclas se analizaron inmediatamente después de la irradiación y tras 12 horas de incubación para evaluar la evolución del proceso de agregación.

4.6 Técnicas de análisis y criterios de interpretación

Para evaluar los cambios estructurales y procesos de agregación en las proteínas, se emplearon espectroscopia de fluorescencia intrínseca, dispersión dinámica de luz (DLS), fluorescencia de Tioflavina T (ThT) y mediciones de turbidez. Estas técnicas se aplicaron de manera consistente en todos los experimentos descritos en este trabajo.

4.6.1 Fluorescencia intrínseca de triptófano

Se midió utilizando un fluorómetro Cary Eclipse (Agilent), empleando una longitud de onda de excitación de 295 nm y registrando la emisión en un rango de 300 a 800 nm. El análisis se basó en la posición del máximo de emisión (λ_{max}) y en la intensidad de fluorescencia. Un corrimiento hacia longitudes de onda mayores se interpretó como evidencia de exposición de los triptófanos a un entorno más polar, mientras que cambios en la intensidad se asociaron tanto a modificaciones estructurales como a efectos de dispersión de la luz en presencia de agregados. Para la determinación precisa del máximo de emisión (λ_{max}) y de intensidad, los espectros de fluorescencia intrínseca se analizaron mediante un ajuste log-normal (o función log-gaussiana). Este procedimiento permite considerar la asimetría intrínseca de las bandas de emisión del triptófano, obteniendo valores de λ_{max} con mayor reproducibilidad que la simple inspección visual del pico.

4.6.2 Fluorescencia de Tioflavina T (ThT)

La formación de estructuras tipo amiloides se evaluó mediante fluorescencia de Tioflavina T (ThT). Las muestras se incubaron con ThT y se registraron espectros con una longitud de onda de excitación de 440 nm y emisión en el rango de 460 a 600 nm. Incrementos en la intensidad de fluorescencia se consideraron indicativos de la formación de este tipo de estructuras.

4.6.3 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

El tamaño hidrodinámico se determinó utilizando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern). Las muestras se filtraron previamente a través de membranas de 0.22 μm y se analizaron en celdas de cuarzo. El análisis se realizó a partir de las funciones de correlación de intensidad, las cuales describen el movimiento de las partículas en solución. En sistemas con proteínas monoméricas o de menor tamaño, estas funciones presentan un decaimiento rápido. En contraste, la presencia de especies de mayor tamaño se refleja como un desplazamiento del decaimiento hacia tiempos más largos. Adicionalmente, se obtuvieron distribuciones de radio hidrodinámico (Rh), donde la aparición de poblaciones con radios elevados y cambios en la contribución relativa de estas poblaciones se interpretaron como evidencia de formación de agregados.

Los datos de dispersión de luz se procesaron mediante un ajuste multiexponencial de la función

de autocorrelación. Este análisis permite descomponer la señal en diferentes poblaciones de tamaños moleculares y es fundamental para detectar la presencia de especies polidispersas o agregados en solución, transformando el decaimiento de la intensidad en una distribución de radios hidrodinámicos (R_h).

4.6.4 Mediciones de turbidez

Finalmente la agregación proteica se evaluó mediante mediciones de turbidez a 405 nm, registradas antes de la irradiación, inmediatamente después de la irradiación y posterior a 12 horas de incubación a 37 °C. Los aumentos en la absorbancia se emplearon como indicador del desarrollo de agregados insolubles.

5. Resultados

5.1 Expresión y purificación de β A1 cristalina humana

La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo exitosamente en la cepa *E. coli* BL21(DE3)RIL. En la figura 3, se presenta el análisis por electroforesis SDS-PAGE del lisado celular tras la inducción con IPTG. Se observa una banda intensa y predominante alrededor de 43 kDa en la fracción soluble, la cual concuerda con el peso de la proteína β A1 fusionada a la etiqueta SUMO.

Al comparar las fracciones soluble e insoluble (carriles 2 y 3, respectivamente), se aprecia que la proteína de interés se localiza mayoritariamente en el sobrenadante (SDI). Este resultado confirma no solo una expresión eficiente de la proteína recombinante, sino también su correcta solubilidad bajo las condiciones de cultivo y lisis empleadas, lo cual es fundamental para los procesos de purificación posteriores.

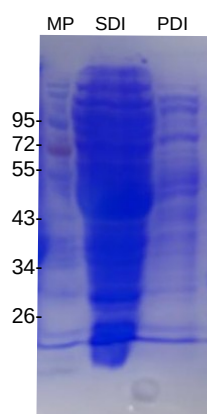


Figura 3. SDS-PAGE al 15 % de la expresión de la proteína β A1 en *E. coli* (BL21RIL). Carril 1 (MP): Marcador de masa molecular, Carril 2 (SDI): Sobrenadante del lisado tras la inducción. Carril 3 (PDI): Fracción insoluble (pellet) tras la inducción.

5.1.1 Cromatografía de afinidad I

El sobrenadante obtenido tras la ruptura celular y centrifugación, se aplicó a una columna de afinidad a Níquel para la purificación de la proteína fusionada a la etiqueta SUMO. En la figura 4, se presenta el perfil de elución monitoreado a 280 nm (línea azul), donde se observa el comportamiento de la proteína frente el gradiente escalonado de Imidazol (línea roja).

Durante la etapa de carga y lavado inicial, se observa un pico de absorbancia correspondiente a las proteínas propias de la bacteria que no presentan afinidad por la matriz. La elución selectiva de la β A1-SUMO se logró mediante el incremento de la concentración de Imidazol, obteniéndose un pico definido. La presencia y pureza de la proteína en las fracciones recolectadas se verificó mediante SDS-PAGE al 15 %, donde se aprecia una banda predominante a la altura esperada (~43 kDa), confirmando la captura eficiente de la proteína de interés y la eliminación de la mayoría de los contaminantes celulares en este primer paso cromatográfico.

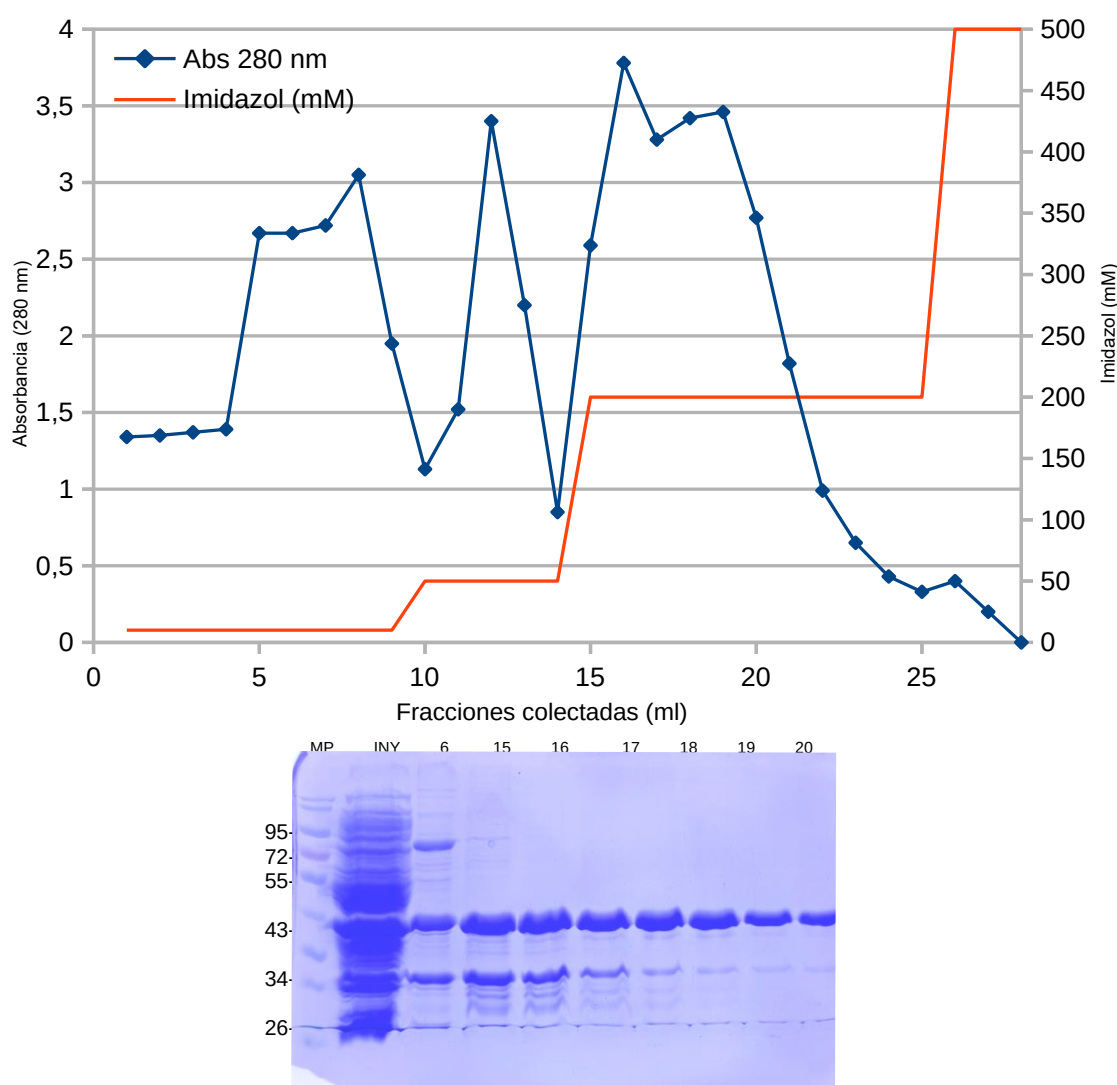


Figura 4. Cromatograma de elución con un gradiente escalonado de Imidazol (línea roja) y análisis por SDS-PAGE al 15 % de las fracciones recolectadas. Se observa una banda predominante correspondiente a la β A1-SUMO. MP: marcador de masa molecular. INY: muestra inyectada (lisado). Fracciones 6-20: muestras colectadas durante la elución.

5.1.2 Digestión enzimática y cromatografía de afinidad II

Previo a la segunda etapa de purificación, se realizó la digestión enzimática de la proteína de fusión empleando la proteasa Ulp1 para remover la etiqueta SUMO y la cola de histidinas. La eficiencia del corte se evaluó mediante SDS-PAGE al 15 % (figura 6), donde se observó la desaparición de la banda de 43 kDa (correspondiente a la proteína fusionada) y la aparición de una nueva banda de menor masa molecular cercana a los 23 kDa que concuerda con el peso de β A1 libre de etiquetas.

Posteriormente, la mezcla de reacción se aplicó a una segunda cromatografía de afinidad a Níquel. Bajo este esquema de purificación, la β A1 que ya carece de la etiqueta de histidina, no presenta afinidad a la matriz y se recupera en las fracciones no fijadas, mientras que SUMO-His y la proteasa Ulp1 permanecen retenidas en la columna.

Como se observa en el cromatograma de la figura 5, la proteína de interés eluye en un pico inicial de gran volumen. La pureza de estas fracciones se confirmó por electroforesis (figura 6, carriles 3-11), mostrando una banda limpia a 23 kDa. Finalmente, los componentes remanentes (SUMO y Ulp1) fueron eluidos incrementando la concentración de Imidazol, lo cual se evidencia en las fracciones tardías (carriles 16-17).

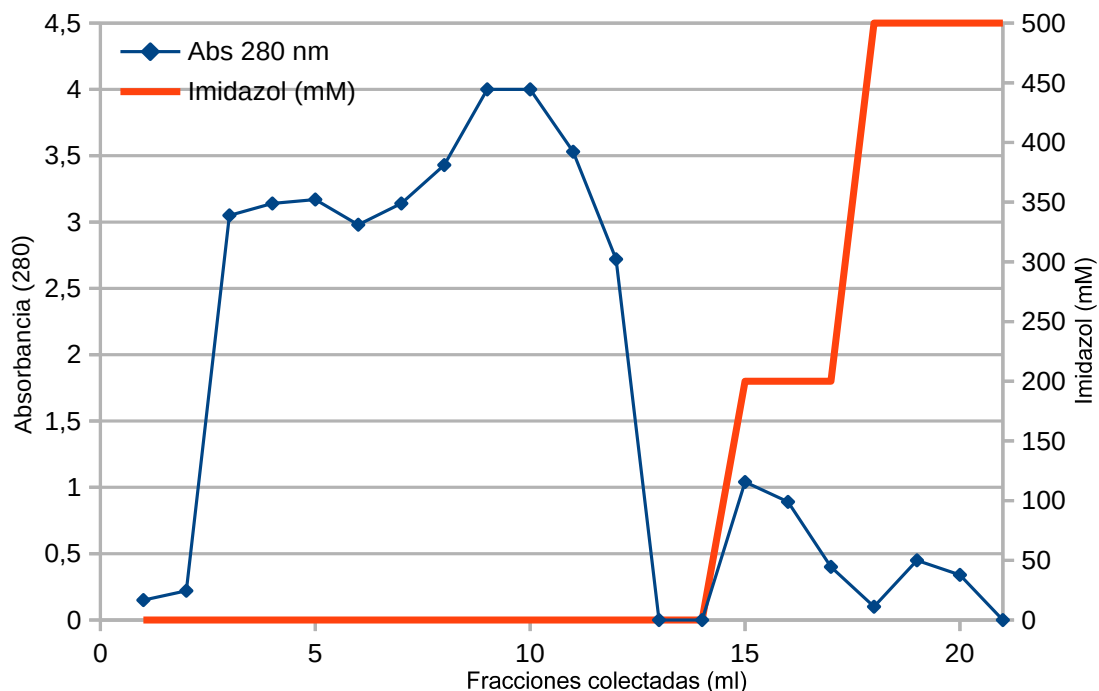


Figura 5. Cromatograma de elución correspondiente a la segunda cromatografía de afinidad.

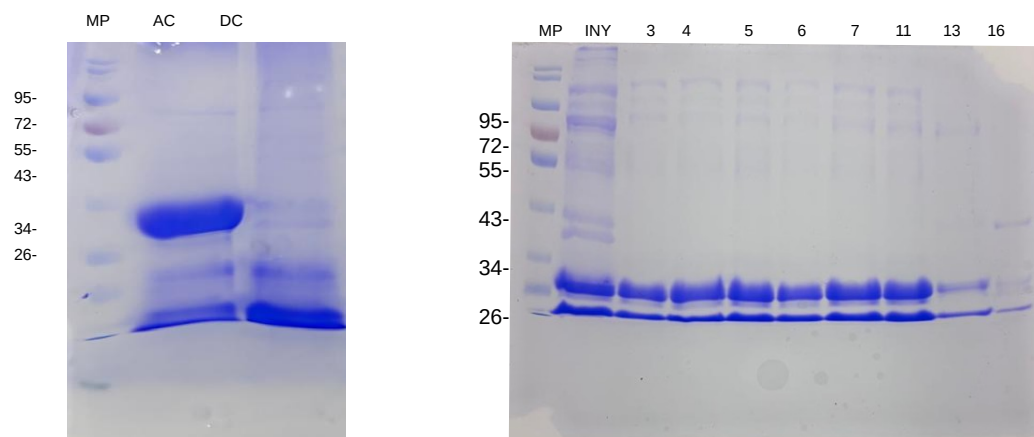


Figura 6. SDS-PAGE al 15 % del proceso de digestión enzimática: muestra antes de cortar (AC) y después de cortar (DC) (izquierda). SDS-PAGE al 15 % de las fracciones recolectadas. INY: muestra inyectada, 3-13: fracciones no fijadas y 13-1 fracciones eluídas con Imidazol (derecha).

5.1.3 Cromatografía de intercambio aniónico

Como paso final de purificación, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico con el objetivo de eliminar contaminantes cargados negativamente. En la figura 8, se presenta el perfil de elución obtenido mediante la aplicación de un gradiente de NaCl.

El cromatograma muestra un pico principal definido que eluye a una fuerza iónica específica. Las fracciones correspondientes fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15 %, confirmando la presencia de una única banda intensa a 23 kDa. Aquellas fracciones con mayor grado de homogeneidad (carriles 5-14) fueron seleccionadas, combinadas y concentradas para proceder con los análisis siguientes.

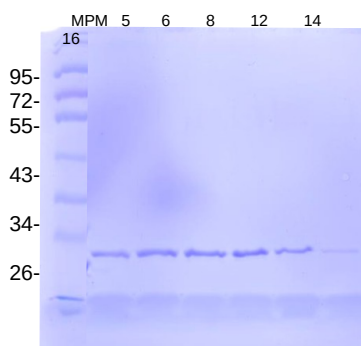


Figura 7. SDS-PAGE al 15 % correspondiente a la cromatografía de intercambio aniónico. MP: marcador de masa molecular. Fracciones 5-16: muestras eluídas.

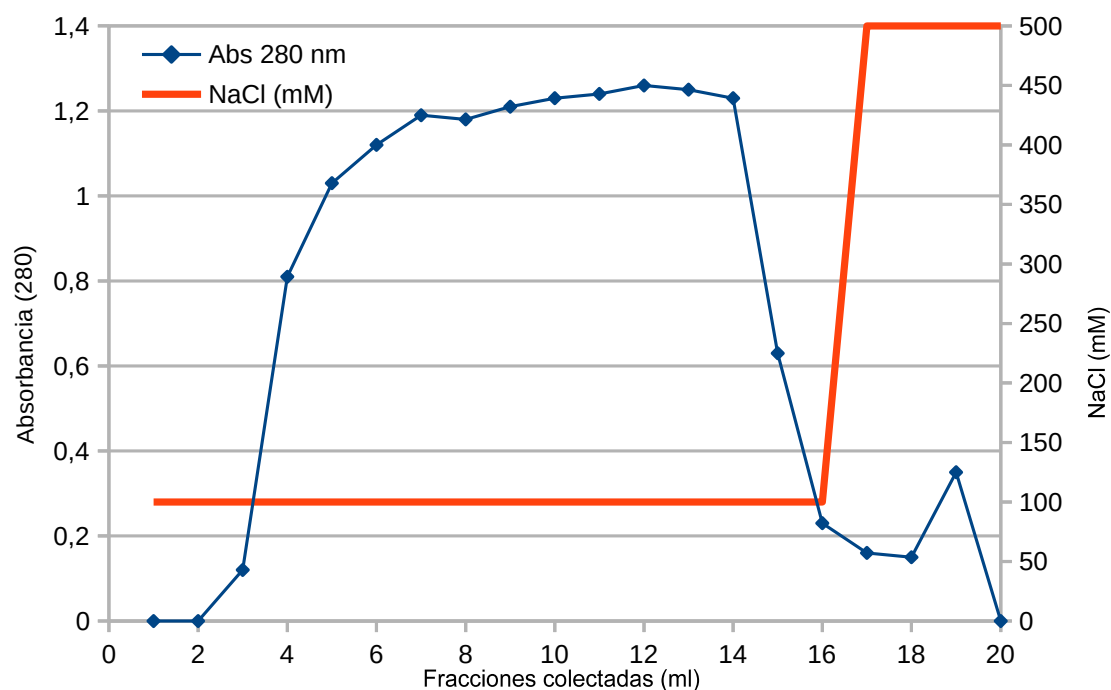


Figura 8. Cromatograma de elución correspondiente a la cromatografía de intercambio aniónico.

5.2 Expresión y purificación de HyS cristalina humana

5.2.1 Cromatografía de afinidad I

La proteína se expresó exitosamente en la cepa *E. coli*/BL21(DE3)RIL transformada con el plásmido pE-SUMO-CRYGS. El análisis del lisado celular mediante SDS-PAGE al 15 % mostró una banda intensa cercana a 35 kDa, la cual corresponde a la masa molecular de la proteína fusionada a la etiqueta SUMO-His confirmando su expresión.

Al igual que en el caso anterior, la proteína se localizó mayoritariamente en la fracción soluble (SS), lo que permitió proceder directamente con la purificación por afinidad a Níquel. En la figura 9, se observa el perfil de elución registrado a 280 nm, donde el incremento en la concentración delmidazol permitió obtener un pico de elución en la proteína de interés. La correspondencia entre el pico del cromatograma y la banda de 35 kDa en el gel de poliacrilamida (fracciones 3-17) confirma la captura eficiente de la HyS.

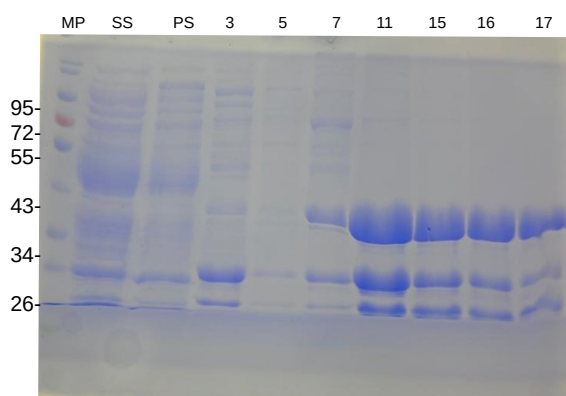
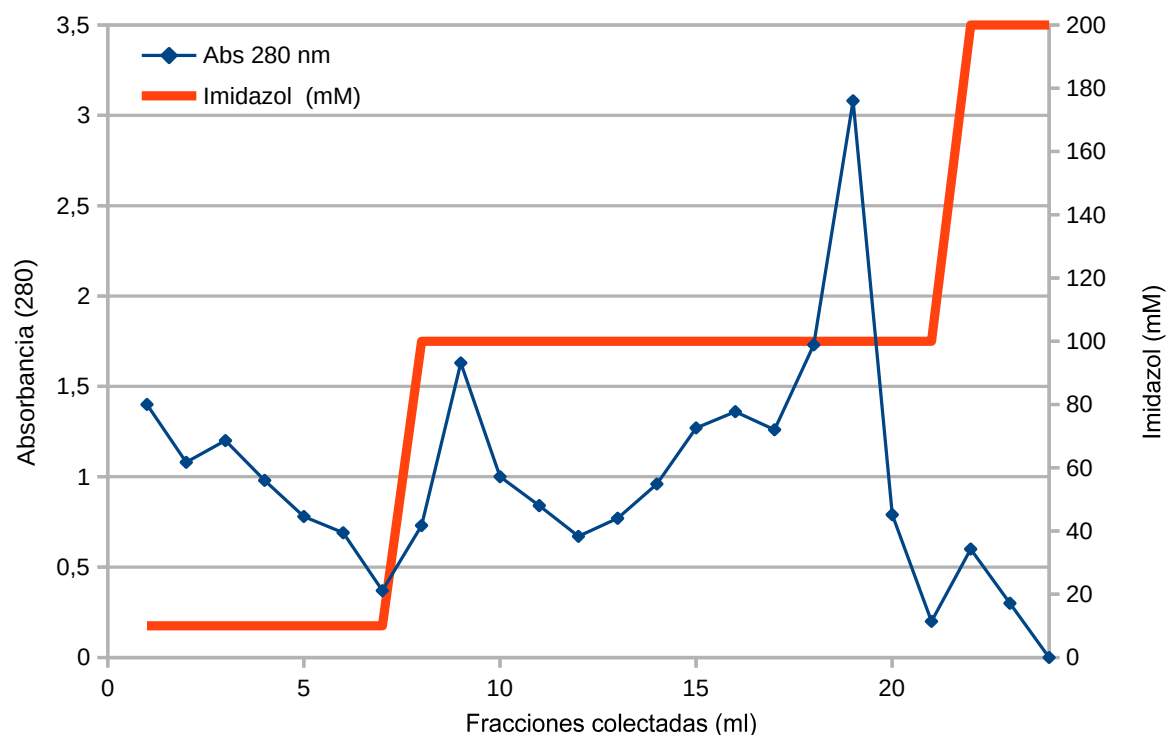


Figura 9. Expresión y purificación de la proteína HyS fusionada a SUMO. Cromatograma de elución monitoreado a 280 nm (línea azul) junto con el gradiente de Imidazol (línea roja).

SDS-PAGE al 15 % de la expresión y a las fracciones recolectada MP: marcador de masa molecular; SS: sobrenadante tras la inducción; PS: fracción insoluble (pellet); 3–17: fracciones de elución.

5.2.2 Digestión enzimática y Cromatografía de afinidad II

Tras la incubación con la proteasa Ulp1, se evaluó la eficiencia mediante SDS-PAGE al 15 % (Fig. 11). En el carril correspondiente a la muestra después de cortar (DC), se observó la desaparición de la banda ~35 kDa y la aparición de una banda principal alrededor de 20 kDa

correspondiente a la proteína HyS libre de etiquetas. Este resultados confirmó la eficiencia del corte enzimático.

Posteriormente, la mezcla de reacción se aplicó a una segunda cromatografía de afinidad a Níquel para separar la proteína de interés de los componentes de la fusión. Bajo este esquema, la HyS se recuperó en las fracciones no retenidas a la matriz debido a que ya no posee la etiqueta de histidinas, mientras que SUMO-His y la proteasa Ulp1 permanecieron unidas a la membrana. Como se muestra en el cromatograma la de la figura 10, el pico inicial de flujo continuo contiene la proteína purificada, cuya homogeneidad fue verificada por electroforesis (figura 11), mostrando una banda única y limpia a 20 kDa. Finalmente, los componentes retenidos fueron eluídos de la columna mediante la aplicación de 200 mM de Imidazol.

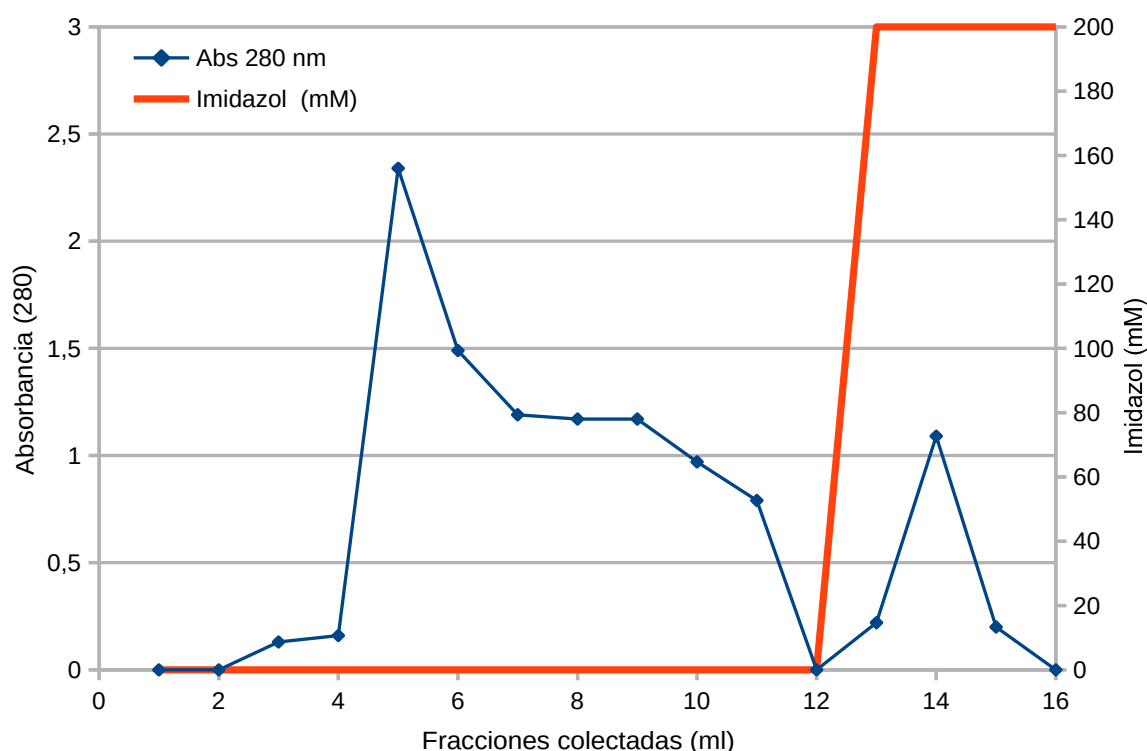


Figura 10. Segunda cromatografía de afinidad posterior al corte. Cromatograma de elución.

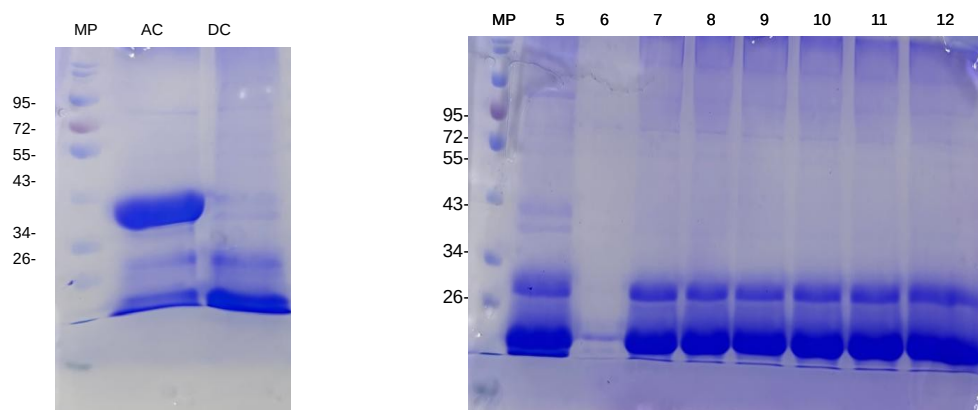


Figura 11. SDS-PAGE al 15 % antes (AC) y después del corte enzimático (DC) (izquierda). SDS-PAGE al 15 % de las fracciones recolectadas donde se observa la proteína HyS (~20 kDa) en las fracciones no fijadas. MP: marcador de masa molecular (derecha).

5.2.3 Cromatografía de intercambio aniónico

Como etapa final del proceso, la proteína se purificó mediante una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de Q-Sepharosa. Este paso se empleó para separar la proteína de interés de cualquier traza residual de la etiqueta SUMO, la proteasa Ulp1 o otros contaminantes.

En la figura 12, se presentan los perfiles de elución obtenidos mediante la aplicación de un gradiente de sal. El análisis por SDS- PAGE al 15 % de las fracciones correspondientes al pico principal, evidenció una banda única intensa aproximadamente 19 kDa. La ausencia de bandas adicionales o señales detectables de la etiqueta SUMO (que eluye a una fuerza iónica distinta) confirma la alta pureza y homogeneidad.

Las fracciones seleccionadas fueron colectadas y concentradas para su posterior caracterización y estudio con la β A1.

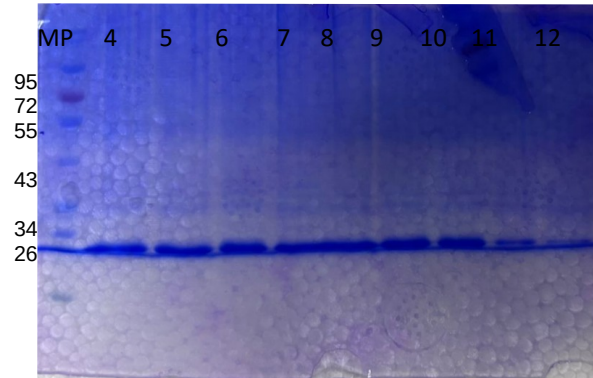
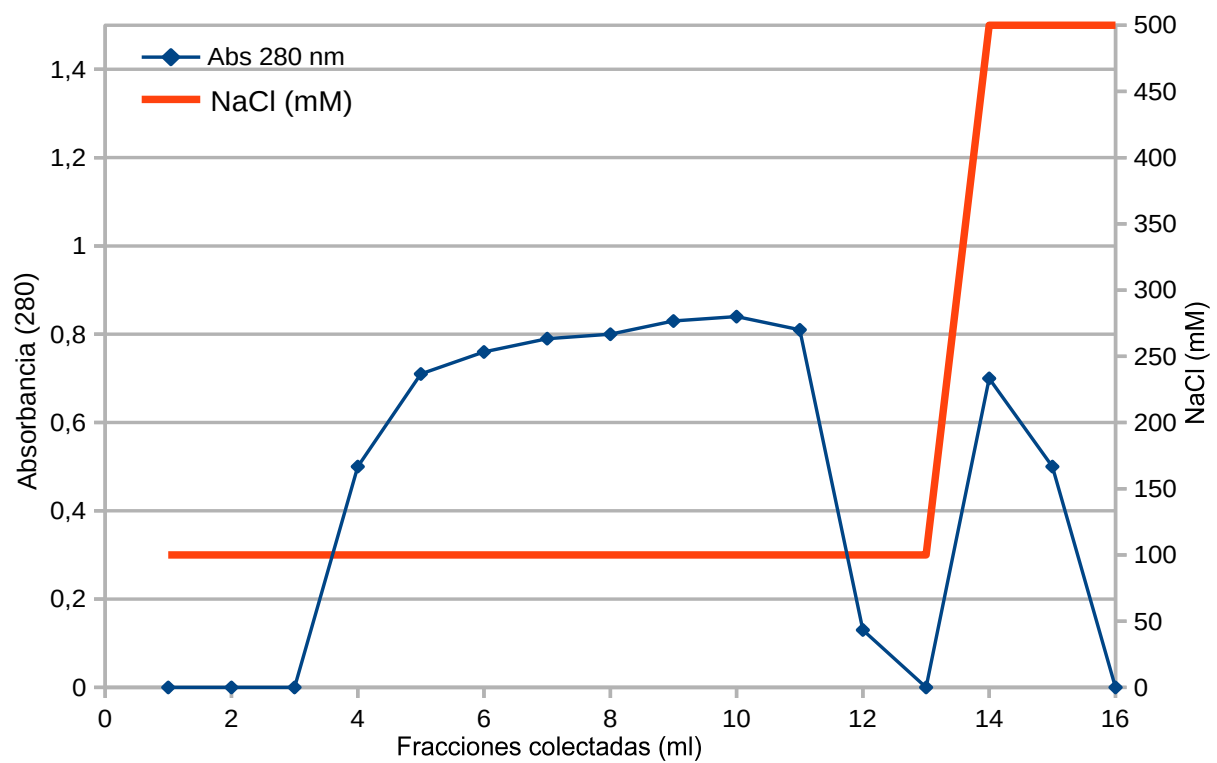


Figura 12. Cromatograma de elución con un gradiente de sal y análisis por SDS-PAGE al 15 % de las fracciones recolectadas. Se evidencia una banda única alrededor de ~19–20 kDa correspondiente a la proteína HyS.

5.3 Caracterización de las proteínas en estado nativo.

Una vez obtenidas las proteínas puras, se procedió a caracterizar su comportamiento mediante espectroscopía de fluorescencia y dispersión dinámica de luz (DLS). Estos parámetros permitieron establecer el perfil de referencia para interpretar los cambios observados en los experimentos posteriores de estrés térmico e irradiación.

5.3.1 Caracterización de la β A1 nativa

El estado conformacional de la β A1 purificada, se evaluó inicialmente mediante espectroscopía de fluorescencia intrínseca de triptófano (λ_{exc} 295 nm). En condiciones nativas (25 °C), la proteína presenta un espectro con máximo de emisión (λ_{max}) de 349 nm. Este valor es consistente con una estructura plegada, donde los residuos de triptófano se encuentran parcialmente protegidos del solvente en un entorno hidrofóbico interno, confirmando la integridad estructural de la proteína purificada.

Complementariamente, el análisis por DLS mostró que en condiciones iniciales la proteína presenta una distribución de tamaño dominada por una población mayoritariamente monodispersa. El radio hidrodinámico (R_h) determinado experimentalmente fue de 2.86 nm, representando el 89.1 % de intensidad total de dispersión (Figura 13).

Para validar este valor experimental, se obtuvieron predicciones teóricas utilizando el servidor HullRad, el cual arrojó un valor de 2.7 nm para el estado dimérico. La estructura proporcionada al servidor para representar el estado dimérico (figura 14) consiste en un modelo por homología compuesto por dos unidades de β A1 coordinadas espacialmente según la geometría de la cristalina β A4 dada su alta identidad de secuencia. La concordancia entre el valor experimental del DLS y la predicción de HullRad ratifica que la población mayoritaria observada en solución corresponde al ensamblaje dimérico nativo de la β A1.

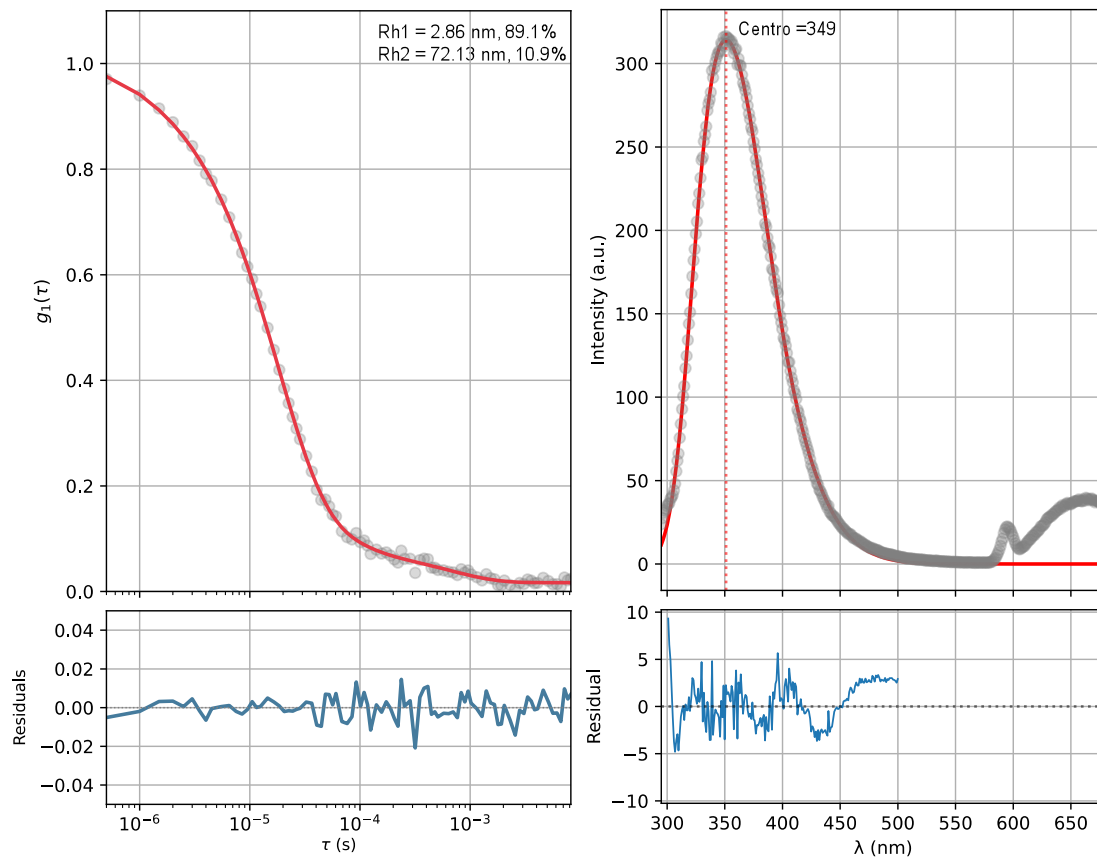


Figura 13. Curva de función de correlación obtenida por DLS (izquierda) y espectro de fluorescencia con λ_{exc} a 295 nm (derecha). En ambas, los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea roja al ajuste realizado. En la parte inferior de cada gráfica se muestran los residuales del ajuste.

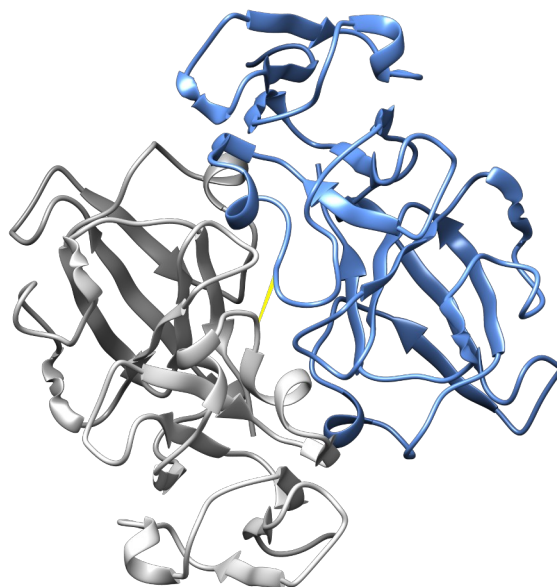


Figura 14. Modelo dimérico de $\beta A1$ cristalina. Estructura generada por homología en SWISS-MODEL. Las cadenas A (azul) y B (gris) se representan de forma independiente.

5.3.2 Caracterización de la HyS nativa

Para la proteína HyS, el espectro de fluorescencia intrínseca (λ_{exc} 295 nm) mostrado en la figura 15 presenta un máximo de emisión (λ_{max}) cercana a 331 nm. Este valor es característico de la proteína en su estado nativo plegado y sugiere que sus residuos de triptófano se encuentran en un entorno significativamente más apolar y resguardado del solvente en comparación con la $\beta A1$.

En cuanto al análisis por DLS, se observa una distribución de tamaño dominada por una población mayoritariamente monodispersa, con un Rh de 1.52 nm, el cual representa el 78 % de intensidad de la dispersión total (fig 15). Este resultado experimental muestra concordancia con el valor teórico calculado en HullRad a partir de la estructura experimental de RMN (pdb 2M3T), confirmando que la proteína se encuentra correctamente plegada y en un estado monomérico tras su purificación (Figura 16).

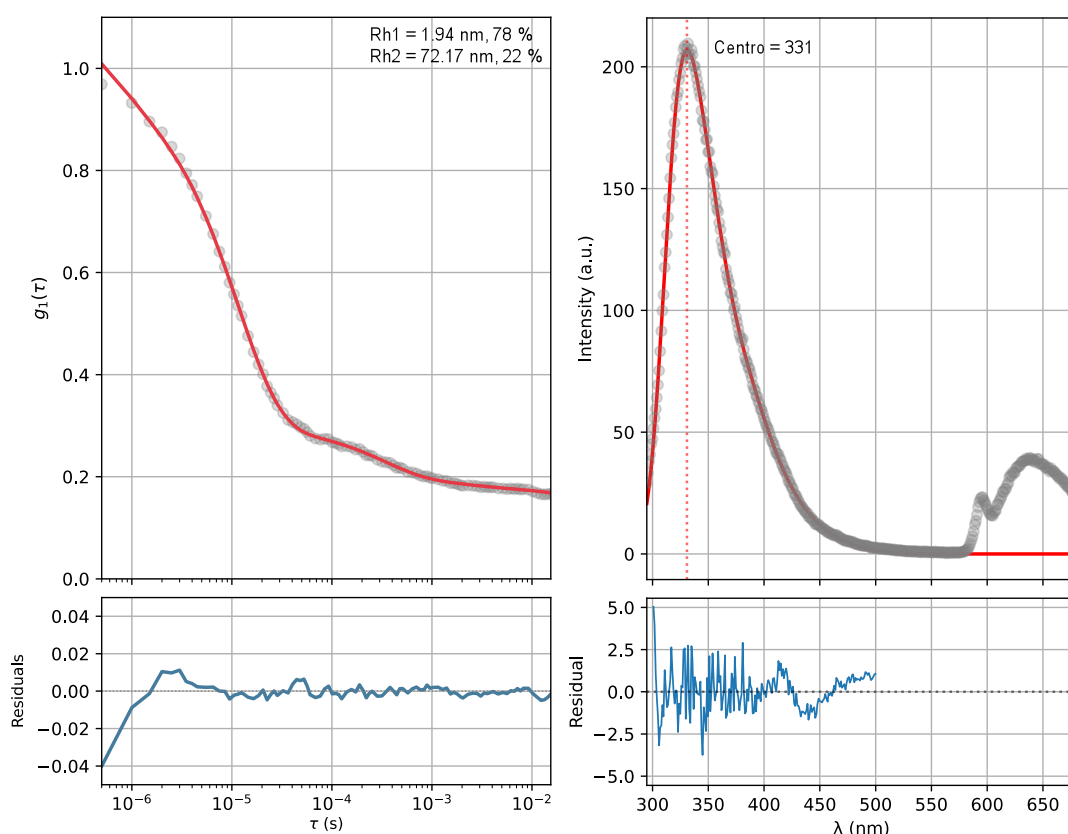


Figura 15. A la izquierda se muestra la curva de correlación obtenida por DLS y a la derecha el espectro de emisión de fluorescencia λ_{exc} 295 nm. En ambas gráficas, los puntos representan los datos experimentales y la línea roja corresponde al ajuste correspondiente. En el panel inferior de cada gráfica se muestran los residuales del ajuste.

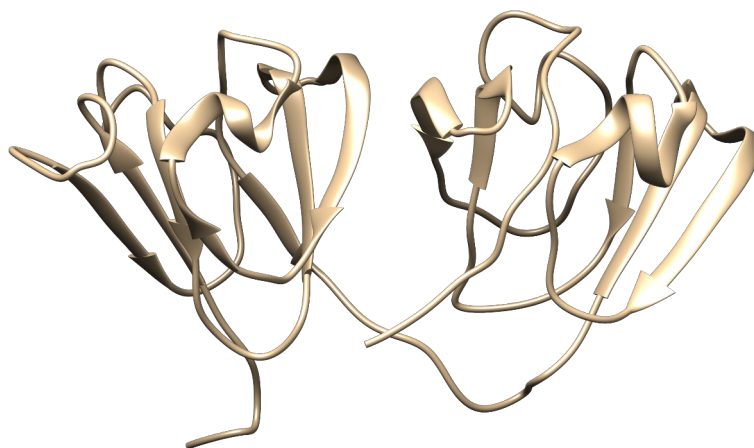


Figura 16. Estructura terciaria de HyS. Representación de la conformación monomérica a partir de modelo de RMN (pdb 2MT3). Esta estructura fue utilizada como referencia para el cálculo del radio hidrodinámico teórico en HullRad.

5.3.3 Variabilidad en el estado de asociación de la HyS

A pesar de obtener perfiles de pureza consistentes por electroforesis, durante la caracterización inicial se observaron variaciones en el comportamiento hidrodinámico de la HyS entre distintas preparaciones. Con el fin de explorar estas diferencias se compararon distintas preparaciones de la proteína por DLS, revelando una sensibilidad intrínseca del estado de asociación de esta cristalina a las condiciones de manejo o almacenamiento.

Como se muestra en la figura 17, las curvas de correlación presentan perfil de decaimiento distintos, lo que refleja cambios en la distribución de tamaño. En algunas preparaciones, la señal está dominada por una población con Rh de 2.8 a 3.0 nm, consistentes con la forma monomérica/dimérica de la proteína. Sin embargo, en otros casos se observa un desplazamiento hacia tiempos más largos, lo que indica una disminución en la fracción de especies pequeñas y un aumento en la contribución de poblaciones de mayor tamaño.

Este incremento en la polidispersidad sugiere que la HyS puede presentar procesos de asociación incluso en condiciones iniciales, un factor que debe tenerse en cuenta al interpretarse su papel en la estabilidad de la mezcla con β A1.

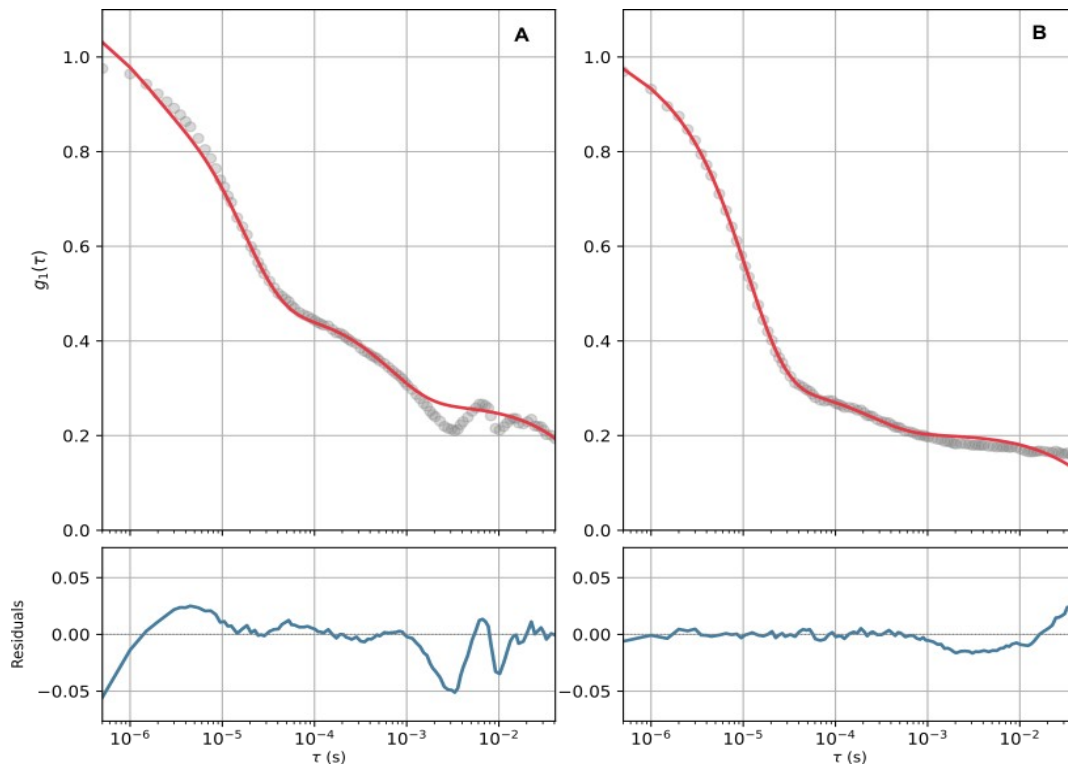


Figura 17. Comparación del perfil hidrodinámico por DLS. Los datos experimentales (gris) fueron ajustados a un modelo multiexponencial (rojo). En los paneles inferiores de cada gráfica se muestran los residuales del ajuste correspondiente.

5.4 Análisis de estabilidad por temperatura en ausencia de UV

Con el fin de caracterizar la estabilidad de la proteína la β A1, se evaluaron los cambios inducidos por un gradiente de temperatura (25-85 °C) mediante espectroscopía de fluorescencia intrínseca y DLS. La proteína se mantuvo a una concentración de 25 μ M para asegurar la reproducibilidad de los fenómenos asociados.

El espectro de emisión inicial a 25 °C muestra un máximo a 349 nm, lo cual es consistente con una proteína correctamente plegada. Al aumentar la temperatura los espectros registrados muestran una disminución de la intensidad, sin embargo, al alcanzar los 45 °C, se detectaron cambios grandes que incluyen una alteración notoria en la intensidad de fluorescencia y aparición de señales a longitud de onda mayores (550-600 nm) las cuales no corresponden a la emisión característica del triptófano (Figura 18).

Interesantemente, a pesar de estas variaciones no se observó un corrimiento significativo en la longitud de onda de emisión máxima (λ_{max}), lo que sugiere que el entorno local de los residuos de triptófano se mantienen relativamente estables en el rango de temperatura evaluado. Sorpresivamente, después de 45 °C, la intensidad de fluorescencia comenzó a aumentar

nuevamente, alcanzando valores incluso mayores a los registrados a los 25 °C, sin mostrar cambio en el máximo de emisión, mientras que el segundo pico a longitudes de onda mayores se incrementó progresivamente con el calor.

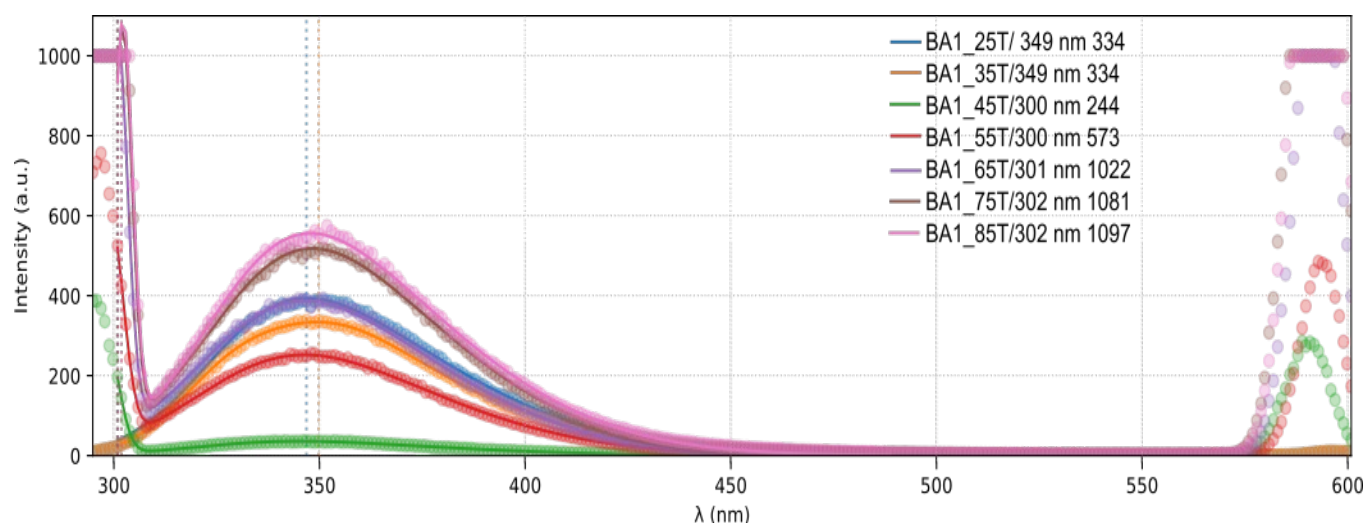


Figura 18. Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína β A1 a diferentes temperaturas (25-85 °C) con excitación 295 nm. Se muestran los valores de longitud de onda máxima de emisión y intensidad máxima.

De manera paralela, los experimentos de DLS realizados bajo las mismas condiciones, mostraron un desplazamiento de las curvas de correlación hacia tiempos mayores conforme aumentó la temperatura, lo cuál es indicativo de un incremento en el tamaño hidrodinámico de las especies en solución.

En concordancia con los datos de fluorescencia, a los 45 °C se observó un cambio notorio en el correlograma (figura 19), marcando el inicio de una transición hacia estados de agregación. Al final del experimento (85 °C), la inestabilidad de la proteína fue evidente de forma macroscópica, registrándose una solución turbia y con presencia de precipitado. En conjunto, estos resultados indican que la proteína β A1 presenta cambios estructurales progresivos con la temperatura que favorecen procesos de agregación con un umbral térmico de desestabilización de 45 °C.

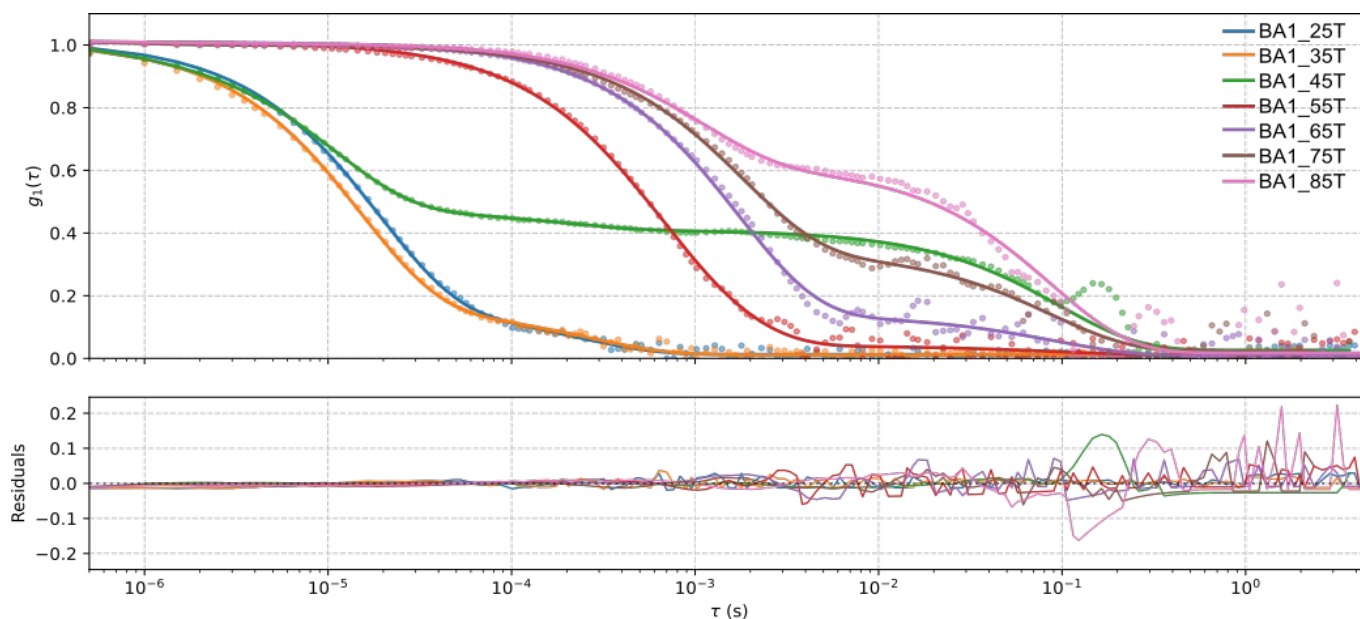


Figura 19. Curvas de correlación de intensidad de la β A1 a diferentes temperaturas (25-85 °C) obtenidas por DLS. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas al ajuste realizado. El panel inferior muestra los residuales del ajuste.

5.5 Análisis del efecto de la radiación UVB sobre la β A1 individual

A continuación, se evaluó el efecto de la radiación UV sobre la estabilidad de β A1 mediante la exposición a diferentes tiempos de irradiación 15, 30, 45 y 120 minutos, monitoreando los cambios mediante espectroscopia de fluorescencia, DLS y mediciones de turbidez.

En la figura 20 se presentan los espectros de fluorescencia registrados, como se puede observar, no existe un corrimiento significativo en la longitud de onda de emisión máxima, la cual se mantiene constante en torno a los 348 nm. No obstante, se observa una variación progresiva en la intensidad de fluorescencia conforme aumenta el tiempo de irradiación, destacando la aparición de señal a longitudes de onda mayores (590 nm) a las 2 horas de irradiación. Este comportamiento es notablemente similar al observado en los experimentos de estabilidad térmica previos, sugiriendo rutas de agregación comparables.

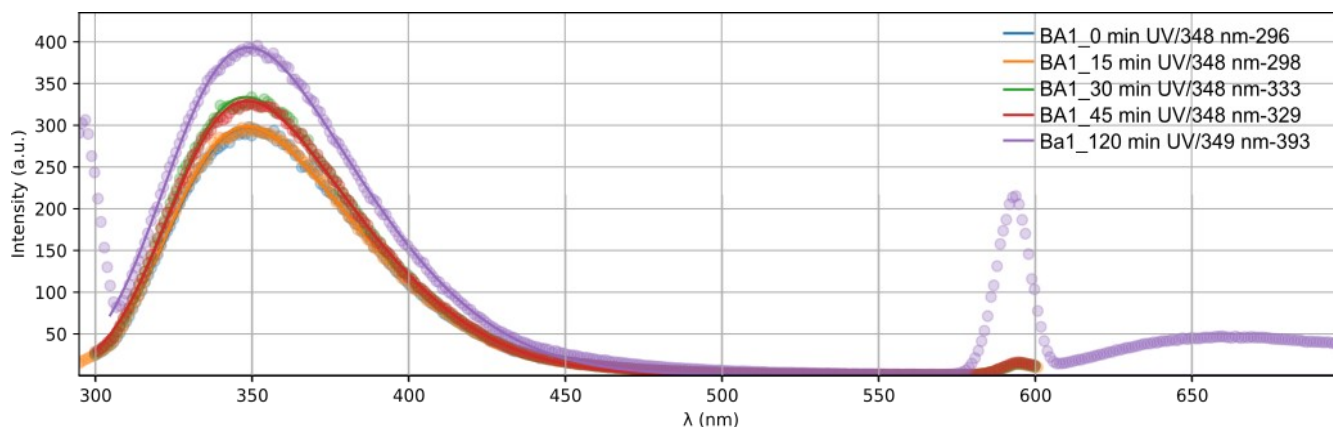


Figura 20. Espectros de fluorescencia de la proteína β A1 a diferentes tiempos de irradiación UVB (0, 15, 30, 45, 120 minutos) con excitación a 295 nm. Se muestran los valores de longitud de onda máxima de emisión y intensidad máxima.

Por otro lado, los datos de DLS (figura 21) muestran que las funciones de correlación presentan un desplazamiento progresivo hacia tiempos de decaimiento más largos conforme aumenta el tiempo de irradiación UVB, lo cual es indicativo de un incremento del radio hidrodinámico.

Durante este proceso, se evidencia la pérdida del comportamiento monoexponencial y la aparición de múltiples poblaciones de mayor tamaño. Tras dos horas de irradiación, la distribución cambia notablemente a poblaciones con un radio de 344 nm (que contribuye el 73 % de la intensidad de dispersión), confirmando que la radiación induce un reordenamiento estructural que promueve la formación de agregados de alta masa molecular.

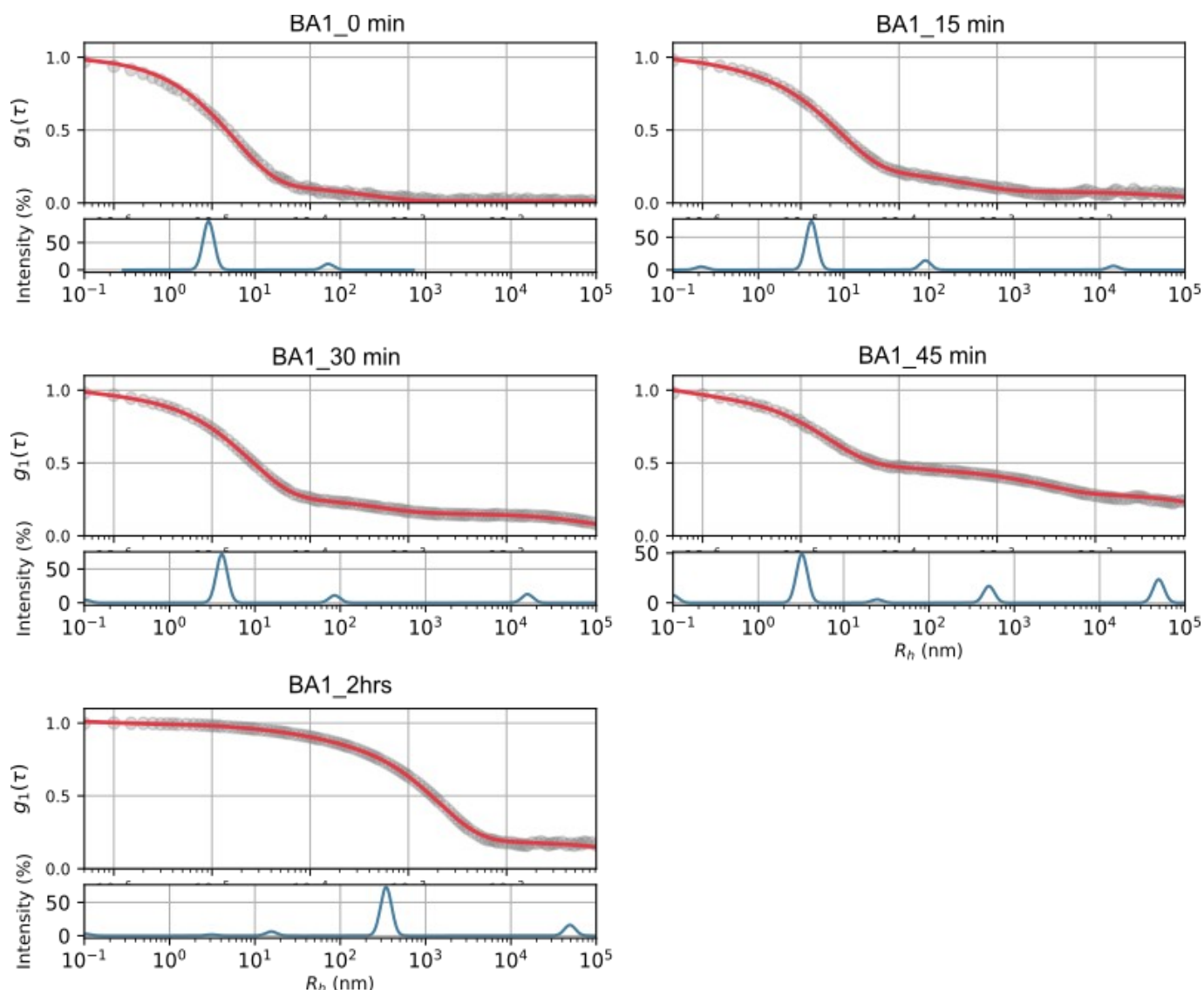


Figura 21. Curvas de correlación de intensidad de la $\beta A1$ obtenidas por DLS tras la exposición a UVB. Se observa el desplazamiento hacia tiempos de decaimiento largos y la transición hacia un comportamiento polidisperso indicativo de agregación. Los puntos grises corresponden a los datos y la línea roja al ajuste correspondiente. En los paneles inferiores de cada gráfica se muestran las distribuciones de radio hidrodinámico por intensidad.

Para precisar la magnitud de estos cambios, se compararon los radios hidrodinámicos (R_h) obtenidos mediante el ajuste multiexponencial antes y después del estrés por radiación (figura 22). Los resultados muestran que mientras la proteína nativa mantiene una población dominante del 89.1 % con un R_h de 2.86 nm, la exposición a la UVB por 2 horas provoca un colapso del estado inicial. En su lugar, emerge una población de agregados masivos con un R_h de 344 nm que representa el 73 % de la intensidad de dispersión.

Esta transición hacia especies de gran tamaño molecular se correlaciona directamente con el incremento en la turbidez observado en las muestras irradiadas (Figura 22, derecha), donde la solución pasa de ser completamente transparente a turbia, confirmando visualmente la formación de agregados macroscópicos que dispersan la luz de forma eficiente.

β A1	β A1 2hrs (UV)
Rh1= 2.86 nm (89.1 %)	Rh1= 344 nm (73 %)
Rh2= 72.12 nm (10.9 %)	Rh2= 15.53 nm (6.3 %)
	Rh3= 3.10 nm (2.9 %)

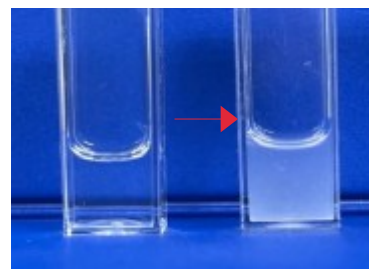


Figura 22. Análisis comparativo de la agregación de β A1 inducida por UVB. A la izquierda, se detallan los radios hidrodinámicos (Rh) y sus contribuciones relativas (%) obtenidos mediante el ajuste multiexponencial para la proteína nativa y tras dos horas de irradiación. A la derecha, se presenta la comparación visual del incremento en la turbidez en la celda de lectura.

5.6 Análisis de estabilidad estructural del β A1:H γ S

Durante el desarrollo experimental, se evaluaron diversas condiciones de irradiación, concentraciones y proporciones de mezclas para identificar aquellas que permitieran observar de manera más clara los cambios inducidos en la estabilidad de las proteínas. Tras este proceso de optimización, se seleccionó la mezcla β A1:H γ S (1:1) como sistema representativo debido a la consistencia y reproducibilidad de sus resultados tanto en estrés térmico como por radiación UVB.

5.6.1 Efecto de la temperatura en β A1, H γ S y sus mezclas

Para explorar los efectos del estrés térmico en sistemas binarios, se evaluó la estabilidad de la mezcla β A1:H γ S mediante cambios en el tamaño hidrodinámico y en fluorescencia intrínseca en un rango de temperatura de 25 a 85 °C. A diferencia de los experimentos iniciales, este enfoque cinético permitió monitorear los cambios estructurales de manera continua durante el proceso de calentamiento.

Tomando como referencia el umbral de agregación de la β A1 individual (50 °C), se comparó el comportamiento de los tres sistemas a esta temperatura crítica para evaluar su propensión a la

asociación. Como se muestra en la figura 23, a 25 °C todas las muestras presentan curvas de correlación con decaimientos rápidos, consistentes con especies monodispersas de menor tamaño. Sin embargo, al alcanzar los 50 °C se observa diferencias claras entre los sistemas. La β A1 individual, muestra un desplazamiento hacia tiempos de correlación más largos, indicativo de la formación de especies de mayor tamaño con radios de 62 nm (54 % intensidad) y 111 nm (40 % intensidad), evidenciando, una pérdida de la conformación nativa y el inicio de un proceso de agregación. En contraste, la HyS presenta una estabilidad significativamente mayor, manteniendo una mayor proporción de especies de menor tamaño y una contribución reducida de poblaciones agregadas bajo las mismas condiciones térmicas. Por su parte, la mezcla β A1:HyS (1:1), exhibe un comportamiento caracterizado por la coexistencia de múltiples poblaciones, pero manteniendo una fracción predominante de especies de menor tamaño (3.4 nm, 64 %). Aunque aparecen oligómeros (~12.8 nm, ~15 %) y algunos agregados, su contribución relativa es menor que la observada en la β A1 individual. Estos resultados sugieren que la presencia de la HyS ejerce un efecto estabilizador sobre la β A1, retrasando o modulando el crecimiento de los agregados masivos que caracterizan a la proteína individual a esta temperatura.

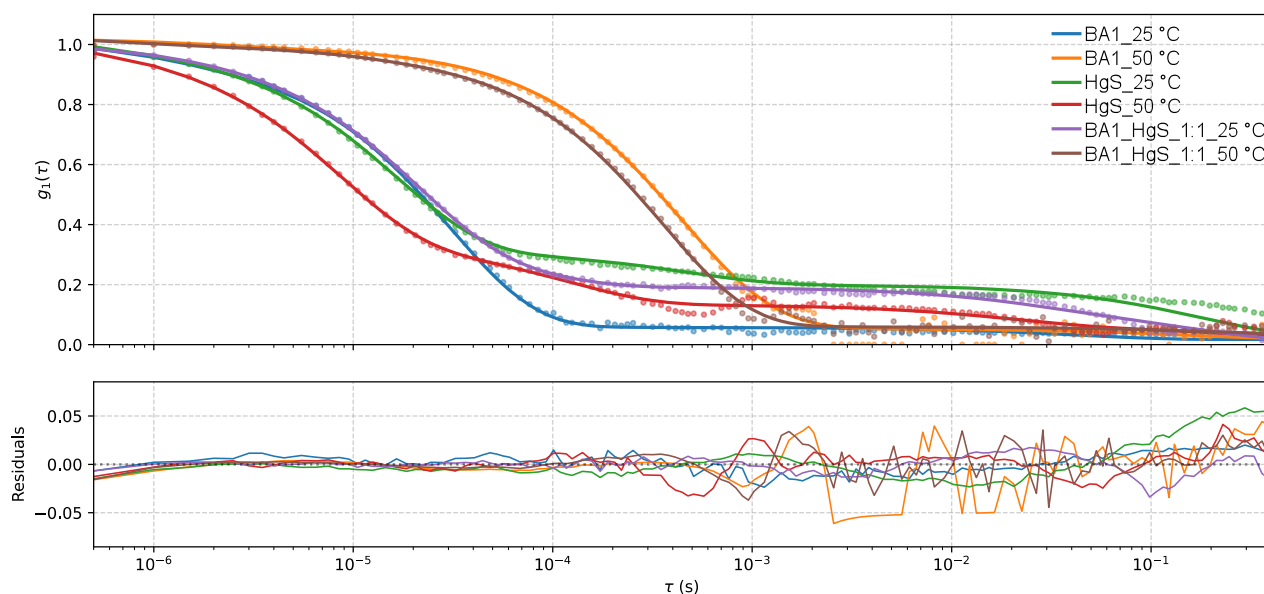


Figura 23. Curvas de correlación obtenidas por dispersión dinámica de la luz (DLS) para β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1) a 25 °C y 50 °C. Los puntos corresponden a los datos y las líneas continuas al ajuste correspondiente. Se muestran en el panel inferior los residuales de los ajustes.

5.6.2 Estado final del sistema: Agregación térmica a 85 °C

Para evaluar el impacto acumulado del estrés térmico, se compararon las curvas de correlación y los espectros de fluorescencia intrínseca (λ_{exc} 295 nm) entre el estado inicial (25 °C) y el punto final del experimento (85 °C).

A esta temperatura, tanto la β A1 como la HyS presentan un desplazamiento significativo hacia tiempos de correlación más largos en las pruebas de DLS, lo que confirma la formación de especies de mayor tamaño (figura 24). En el caso de la β A1 individual, este cambio es más pronunciado, observándose poblaciones dominantes en el rango de 180-430 nm junto con la presencia de agregados masivos. Por su parte, la HyS también muestra un incremento importante en su tamaño hidrodinámico con poblaciones predominantes alrededor de los 450 nm, lo que indica que aunque inicialmente presentaba una mayor estabilidad relativa, también experimenta procesos de agregación a temperaturas elevadas.

Respecto a la mezcla β A1:HyS (1:1), los resultados de DLS exhiben igualmente la formación de especies de gran tamaño, evidenciando que el sistema se encuentra altamente agregado al alcanzar los 85 °C. Sin embargo, resulta notable que el desplazamiento de las curvas de correlación en la mezcla sea menor en comparación con β A1 individual. Este comportamiento sugiere que la HyS ejerce un papel modulador en la extensión del proceso de agregación, manteniendo una distribución de tamaños ligeramente más desplazada hacia valores menores.

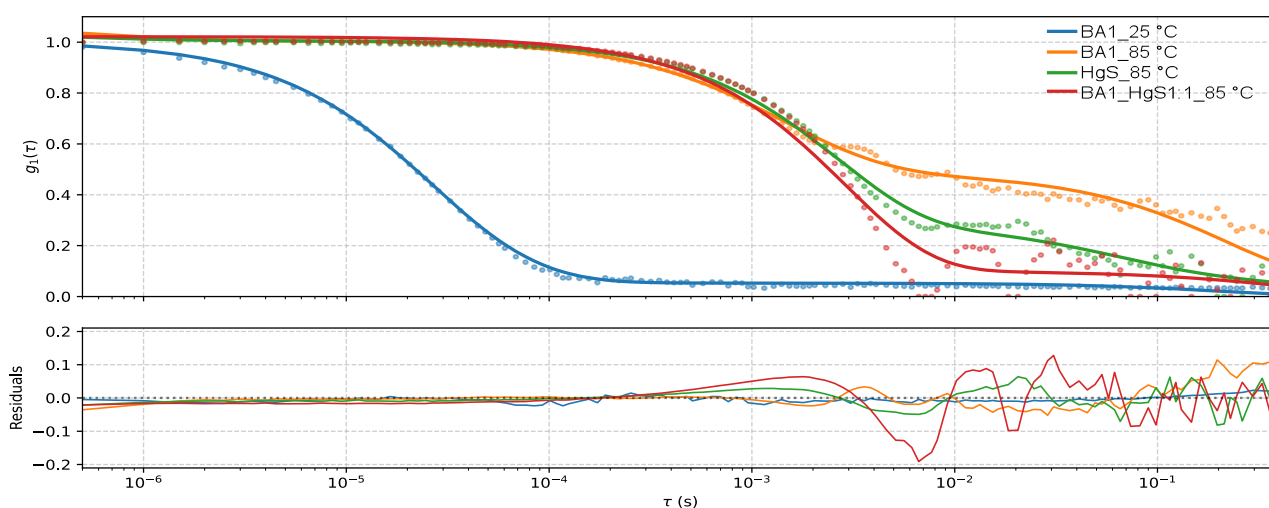


Figura 24. Curvas de correlación obtenidas por dispersión dinámica de la luz (DLS) para β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1) a 85 °C. Los puntos corresponden a los datos y las líneas continuas al ajuste correspondiente. Se muestran en el panel inferior los residuales de los ajustes.

Complementando estos hallazgos, los espectros de fluorescencia intrínseca a 85 °C, mostrados en la figura 25 muestran perturbaciones diferenciadas para cada sistema. La β A1 presenta un corrimiento del máximo de emisión desde 350 nm hasta los 382 nm, acompañado de una disminución de la intensidad y la aparición de señal en longitudes de onda mayores (600 nm), lo cual es característico de una exposición total de los triptófanos al solvente y una fuerte dispersión de luz por agregados. En contraste, la HyS muestra un corrimiento menor, de 329 a 348 nm, aunque con una contribución de señal a longitudes de onda mayores superior a la de β A1. El resultado más destacado proviene de la mezcla (1:1), la cual exhibe un corrimiento menor de 341 a 344 nm, sugiriendo que la interacción entre ambas proteínas protege la estructura terciaria y previene la exposición masiva de los residuos de triptófano a pesar de la formación de agregados detectada por DLS.

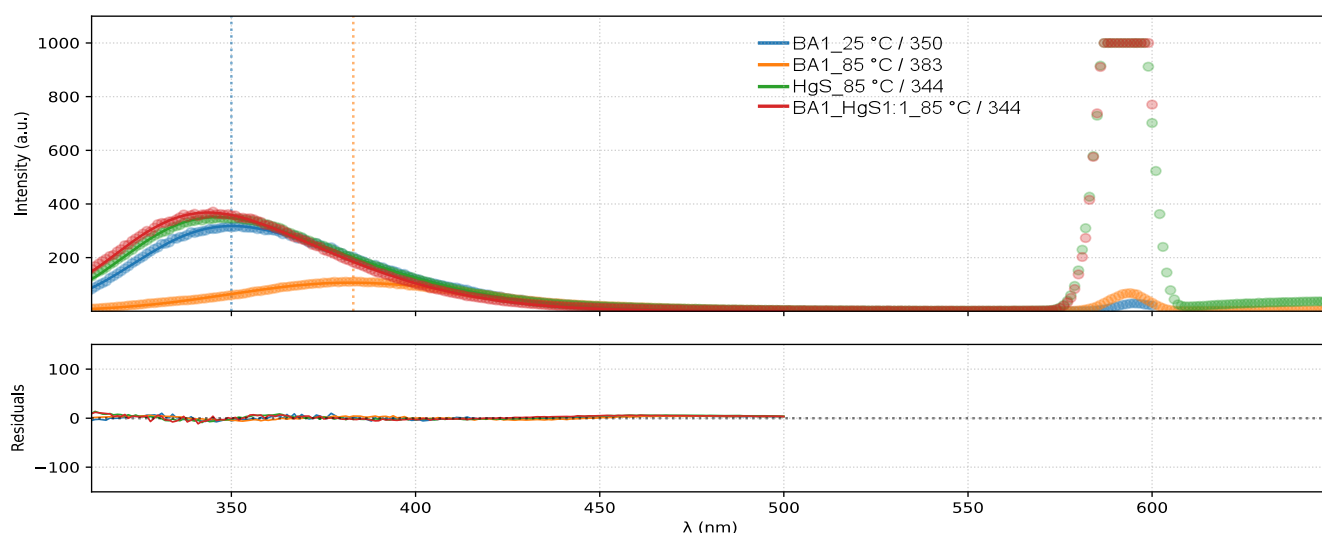


Figura 25. Espectros de fluorescencia intrínseca de β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1), registrados antes y al final del experimento térmico (85 °C), con λ exc 295 nm. Los puntos corresponde a los datos y las líneas continuas a los ajustes. En el panel inferior se muestran los residuales de los ajustes correspondientes.

5.7 Efecto de la radiación UV sobre β A1, HyS y sus mezclas

Con el objetivo de evaluar cómo la interacción entre proteínas modula el proceso de agregación inducido por luz ultravioleta, se estableció un tiempo de irradiación de 2 horas, tomando como referencia los resultados previos obtenidos para la proteína β A1 individual. La elección de las proporciones experimentales se fundamentó en estudios de proteómica del cristalino humano,

los cuales indican que las β -cristalinas es una de las especies más abundantes, mientras que las γ -cristalinas se encuentran en menor proporción (Hains & Truscott, 2007).

Bajo esta premisa, las mezclas β A1:H γ S se diseñaron manteniendo a la β A1 en concentraciones igual o superior a la H γ S (1:1, 1:0.75, 1:0.5 y 1:0.25), buscando aproximar condiciones experimentales a la organización proteica real del cristalino.

Como paso previo a la irradiación, se caracterizó el estado inicial de la H γ S para establecer un control basal. Los análisis de fluorescencia mostraron un máximo de emisión cercano a los 331 nm, mientras que los datos de DLS revelaron una población con Rh de 1.52 nm (78 % intensidad). Este perfil es consistente con un comportamiento mayormente monodisperso, indicando que la proteína se encuentra en su estado nativo y libre de agregados significativos antes del estrés.

La comparación de los sistemas en condiciones iniciales, presentada en la figura 26, permite observar que tanto las proteínas individuales como las distintas mezclas de β A1:H γ S comparten perfiles de correlación similares. Estos perfiles están dominados por poblaciones de menor tamaño, lo que demuestra que la formación de los sistemas binarios no induce una agregación inmediata por contacto. De este modo, el comportamiento mayormente monodisperso de todas las muestras asegura que cualquier cambio posterior en el tamaño o en las propiedades ópticas podrán ser atribuidos directamente al efecto de la radiación UVB y a la dinámica de interacción bajo estrés.

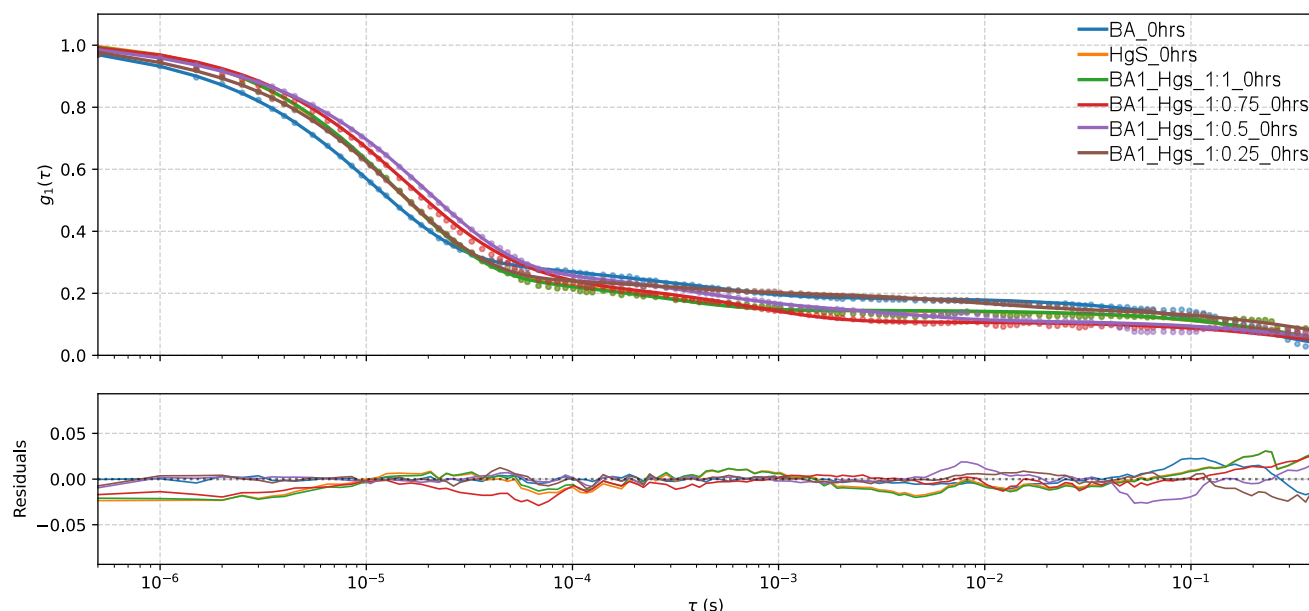


Figura 26. Curvas de correlación obtenidas por DLS para β A1, H γ S y las mezclas β A1:H γ S (1:1, 1:0.75, 1:0.5 y 1:0.25) en condiciones iniciales. Los puntos corresponden a los datos y las líneas al ajuste. En la parte inferior se muestran los residuales de cada ajuste.

En cuanto a la caracterización por fluorescencia intrínseca (λ_{exc} 295 nm), tanto la β A1 como la HyS en condiciones individuales presentan espectros con máximo de emisión característicos de estas proteínas en su estado nativo y plegado. Al analizar las mezclas β A1:HyS en sus distintas proporciones, no se observaron cambios significativos en la longitud de onda de emisión máxima respecto a las proteínas individuales, lo cual sugiere que el microambiente de los residuos de triptófano permanece inalterado tras la formación del sistema binario. Aunque se detectaron ligeras variaciones en la intensidad de fluorescencia entre las distintas relaciones molares evaluadas, los espectros mantienen perfiles generales muy similares (figura 27). Estos resultados indican que la interacción inicial entre la β A1 y la HyS no induce cambios estructurales evidentes ni promueve un desplegamiento proteico inicial, estableciendo así un punto de partida estructuralmente íntegro antes de someter a los sistemas al estrés por radiación UVB.

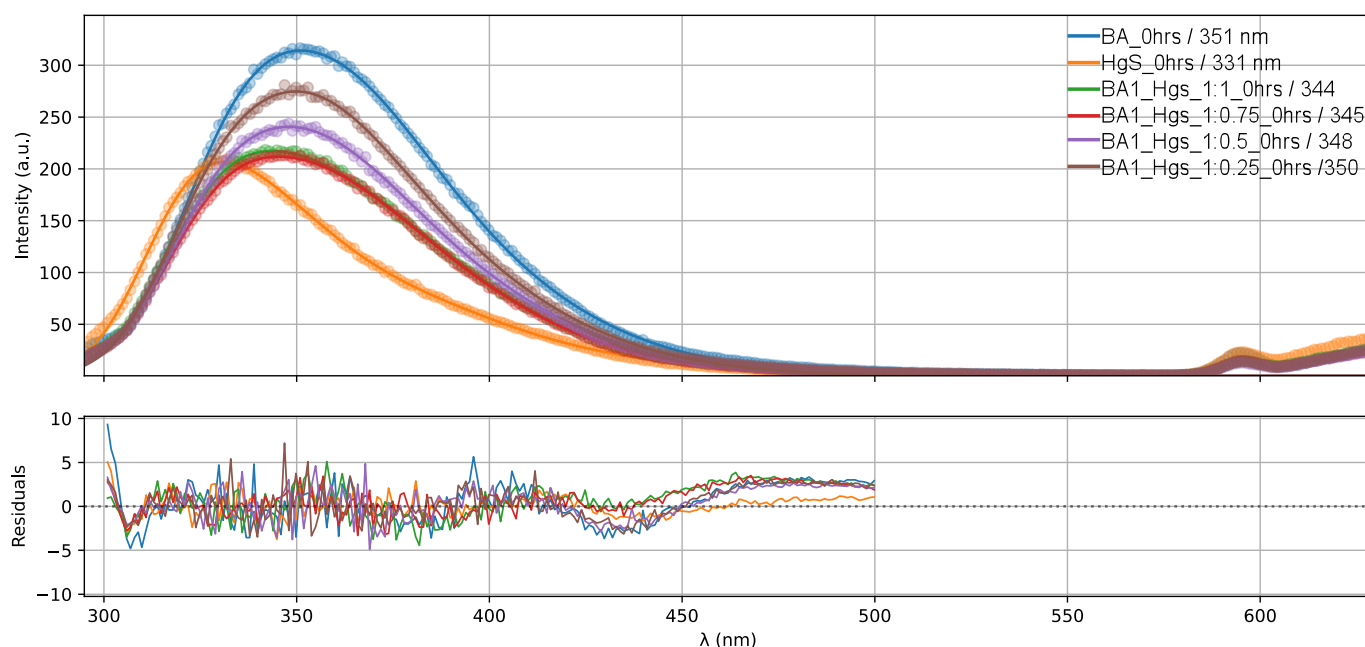


Figura 27. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de β A1, HyS y sus mezclas β A1:HyS (1:1, 1:0.75, 1:0.5 y 1:0.25) en condiciones iniciales. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas el ajuste. En la parte inferior se muestran los residuales de los ajustes.

5.7.1 Dinámica de agregación y cambios por irradiación UVB

Tras dos horas de irradiación UVB, se evaluó el efecto de la interacción proteica sobre el proceso de agregación mediante dispersión dinámica de luz y fluorescencia intrínseca. En la figura 28 se observa que la β A1 individual experimenta un desplazamiento hacia tiempos de decaimientos

más largos en comparación con su estado inicial, lo que confirma un incremento significativo en el tamaño de las especies presentes en la solución debido al daño por radiación UV. Al evaluar las mezclas con proporciones menores de HyS (1:0.25 a 1: 0.75), no se detectaron cambio en este proceso de agregación. Sin embargo, la mezcla en proporción 1:1 exhibió un comportamiento notablemente menos pronunciado, lo que sugiere que se requiere una concentración equimolar de HyS para modular eficazmente el crecimiento de las especies agregadas y favorecer la permanencia de poblaciones de menor tamaño.

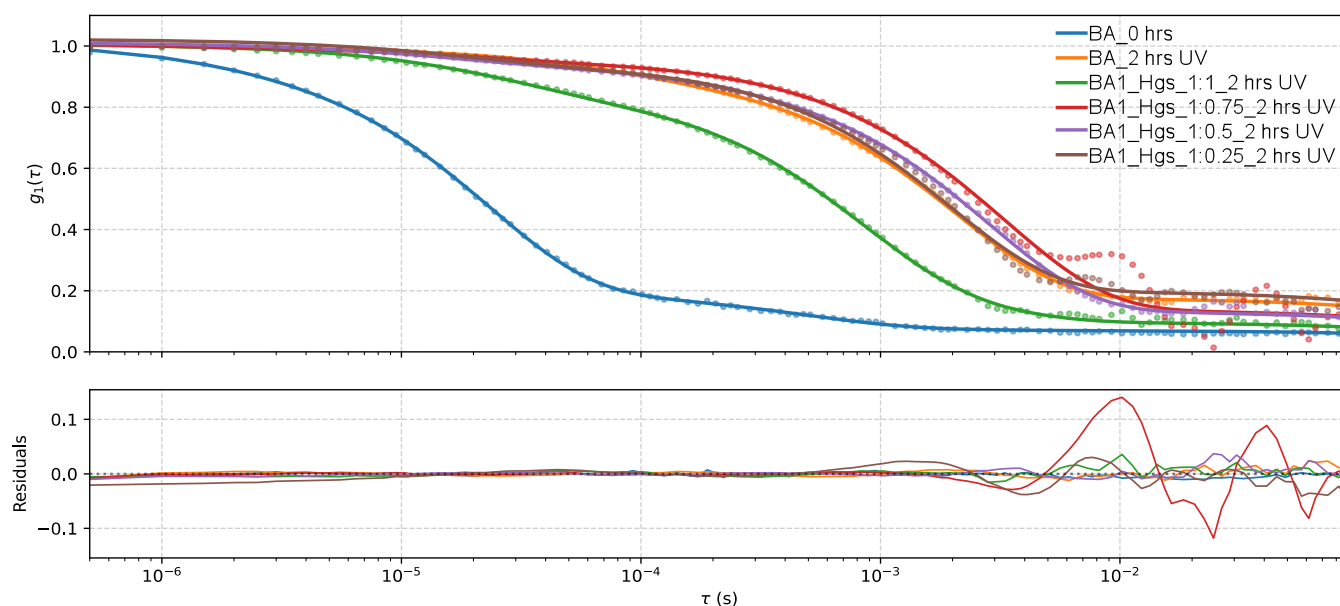


Figura 28. Curvas de correlación obtenidas por DLS para β A1, HyS y las mezclas β A1+HyS en las distintas proporciones molares tras dos horas de irradiación. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas al ajuste. En la parte inferior se muestran los residuales del ajuste.

Este efecto protector se ve reflejado de manera consistente en los espectros de fluorescencia intrínseca para la mezcla 1:1 (figura 29). Mientras que la β A1 muestra variaciones importantes en la intensidad de fluorescencia tras la irradiación, la mezcla no presenta diferencias apreciables entre las condiciones irradiadas y no irradiadas, manteniendo su integridad estructural. Un hallazgo de particular interés, es la reaparición de la señal a 590 nm posterior a la irradiación, esta señal, asociada a la dispersión de luz por agregados de gran tamaño, es considerablemente más intensa en la β A1 sola, mientras que en el sistema binario su contribución es significativamente menor, reforzando la evidencia de una agregación contenida.

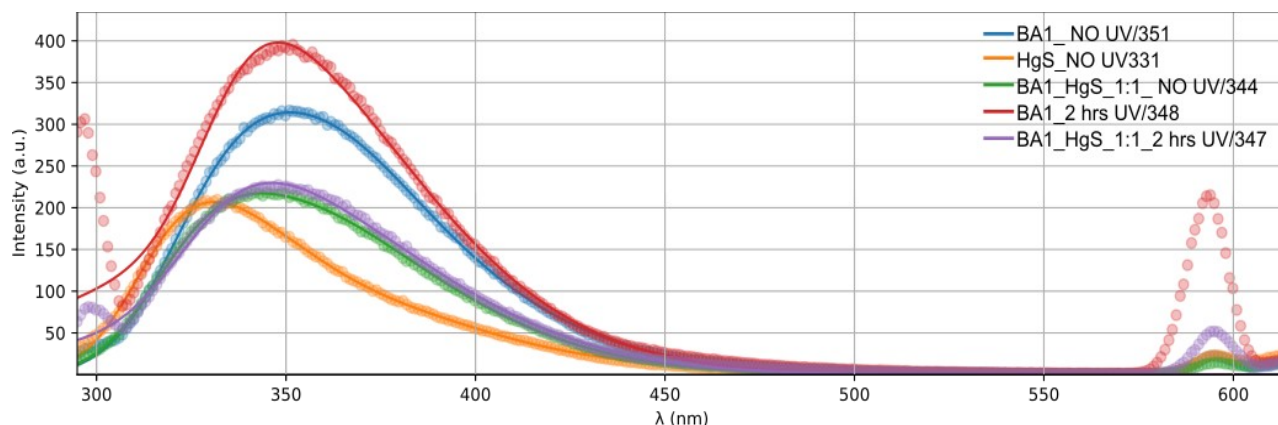


Figura 29. Espectros de fluorescencia intrínseca (λ_{exc} 295 nm) de β A1, HyS y la mezcla β A1+HyS (1:1) en condiciones no irradiadas y tras 2 horas de irradiación UVB.

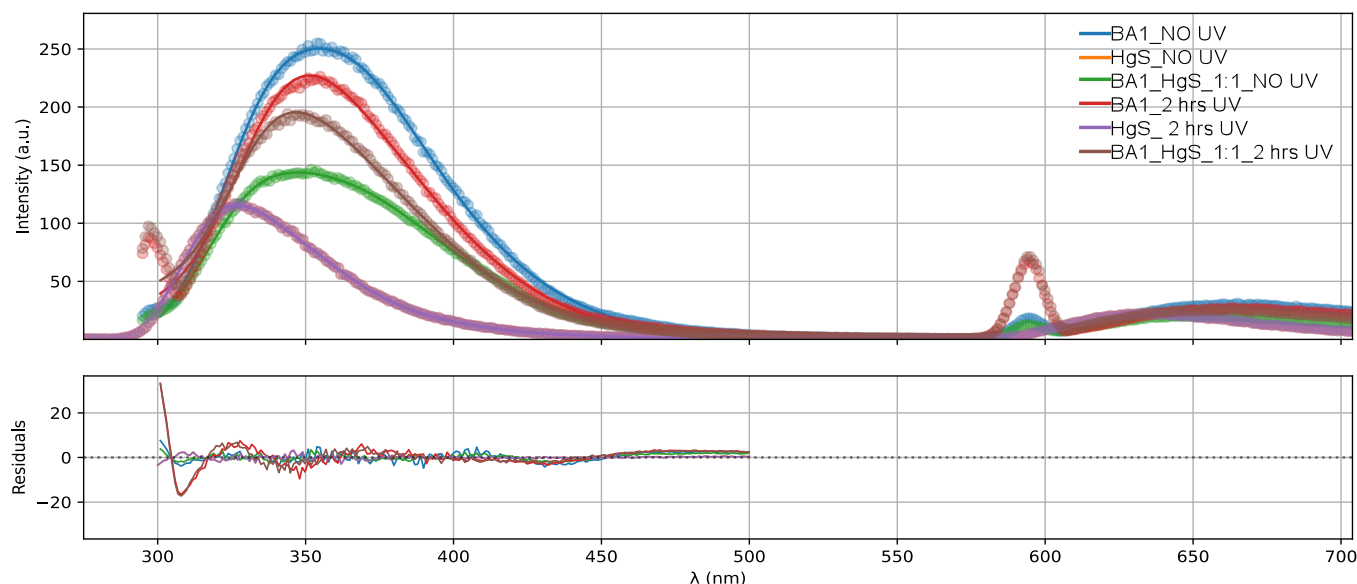


Figura 30. Réplica independiente del análisis por fluorescencia de β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1), en condiciones sin irradiar y tras 2 h de exposición a radiación UVB. Los puntos corresponden a los datos y las líneas continuas a los ajustes correspondientes. En el panel inferior se presentan los residuales de los ajustes.

Finalmente, el análisis detallado de las funciones de correlación (figura 31) permitió cuantificar la distribución de tamaños tras el estrés por UVB. En condiciones basales, los tres sistemas presentan perfiles asociados a especies pequeñas; no obstante, tras la irradiación, la β A1 transita de una población principal de 3.32 nm (82.6 %) a una población predominantemente agregada de 344 nm (74 %). En contraste, la HyS demostró una estabilidad fotoquímica, manteniendo poblaciones en rango similares de tamaños antes y después de la irradiación (1.52 nm (78 %) y 72.13 nm (22 %)).

Bajo este escenario, la mezcla β A1:H γ S (1:1) mostró un comportamiento superior frente a la radiación en comparación con la proteína aislada. Aunque en ausencia de irradiación la mezcla presenta poblaciones de 2.35 nm (86 %) y 410 nm (14,5 %), tras la exposición a UVB los cambios en la distribución de tamaño fueron menos pronunciados que la β A1 sola, siendo la población de 117 nm (47 %) la de mayor contribución. Estos resultados, consistentes en todas las réplicas experimentales (figuras 30 y 32), demuestra que la interacción con H γ S reduce a menos de la mitad el tamaño promedio de los agregados inducidos por luz UVB, actuando como un factor determinante en la preservación de la solubilidad del sistema proteico.

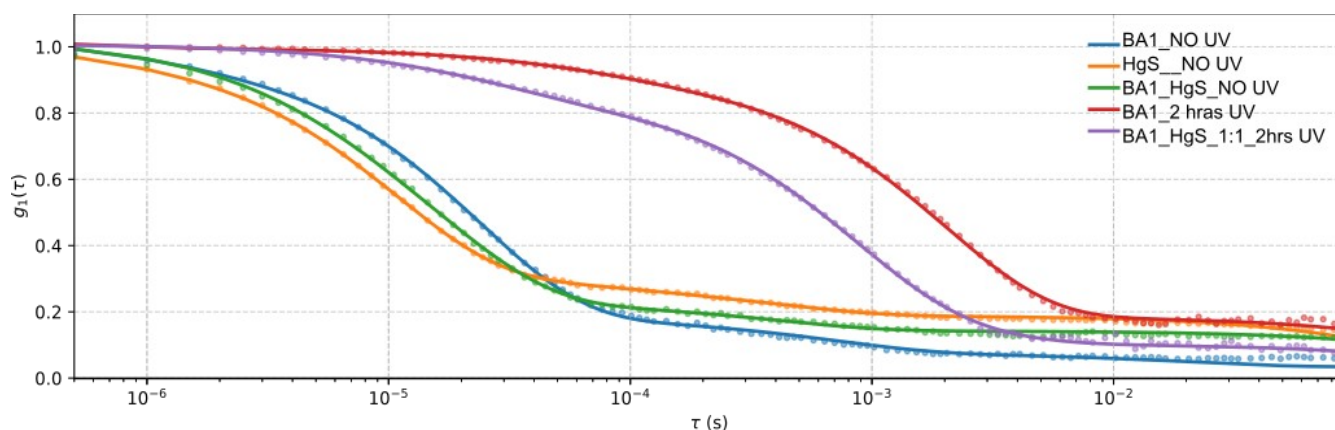


Figura 31. Funciones de correlación obtenidas por DLS para β A1, H γ S y la mezcla β A1+H γ S (1:1) en condiciones no irradiadas y tras 2 horas de irradiación UVB. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas sólidas corresponden al ajuste. El panel muestra el marcado desplazamiento de la β A1 irradiada (rojo) hacia tiempos de correlación largo, mientras que la mezcla irradiada (morado) mantiene un perfil de decaimiento significativamente más rápido, evidenciando un menor tamaño hidrodinámico promedio.

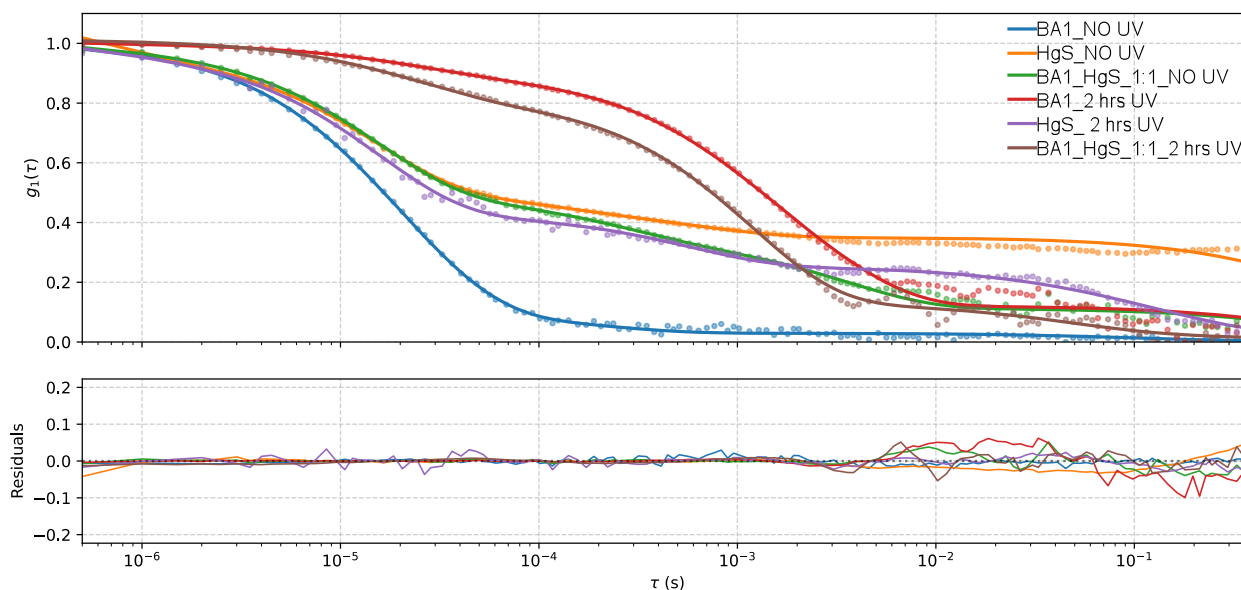


Figura 32. Réplica independiente del análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS) de β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1), en condiciones sin irradiar y tras 2 h de exposición a radiación UVB. Se muestran las funciones de correlación obtenidas experimentalmente (puntos) junto con los ajustes correspondientes (líneas continuas). En el panel inferior se presentan los residuales de los ajustes.

5.7.2 Evolución del sistema durante 12 horas de incubación

La formación de cataratas es un fenómeno dependiente del tiempo, en el cual tras el estímulo inicial que puede causar daño, el proceso de agregación continúa de manera progresiva. Con el fin de evaluar la estabilidad a largo plazo, se analizó el tamaño de las especies presentes tras 12 horas de incubación a 37 °C posterior al tratamiento con radiación UVB. Como control fundamental, primero se evaluaron las muestras en ausencia de radiación bajo las mismas condiciones de incubación, lo que permitió aislar el efecto del tiempo de incubación de los cambios inducidos por la radiación.

Los resultados presentados en la figura 33 muestran las funciones de correlación y las distribuciones de tamaño para β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1) comparando estado inicial (0 h) frente a las 12 horas de incubación. En el caso de la β A1, reveló la aparición de especies de mayor tamaño, evidenciada por el desplazamiento de la función de correlación y la presencia de nuevas poblaciones en la distribución hidrodinámica. Por su parte, la HyS mostró cambios menos pronunciados, manteniéndose en mayor proporción de las especies de menor tamaño, aunque

también se registró la aparición de nuevas poblaciones minoritarias de agregados. Interesantemente, el comportamiento de la mezcla resultó similar al de la β A1 individual. Estos hallazgos indican que el sistema es termodinámicamente inestable y presenta cambios dependientes del tiempo incluso en ausencia de radiación. Por tanto, el análisis de las muestras irradiadas tras 12 horas de incubación debe interpretarse considerando que el estado final de agregación es el resultado tanto del tiempo como el inducido por la radiación UVB.

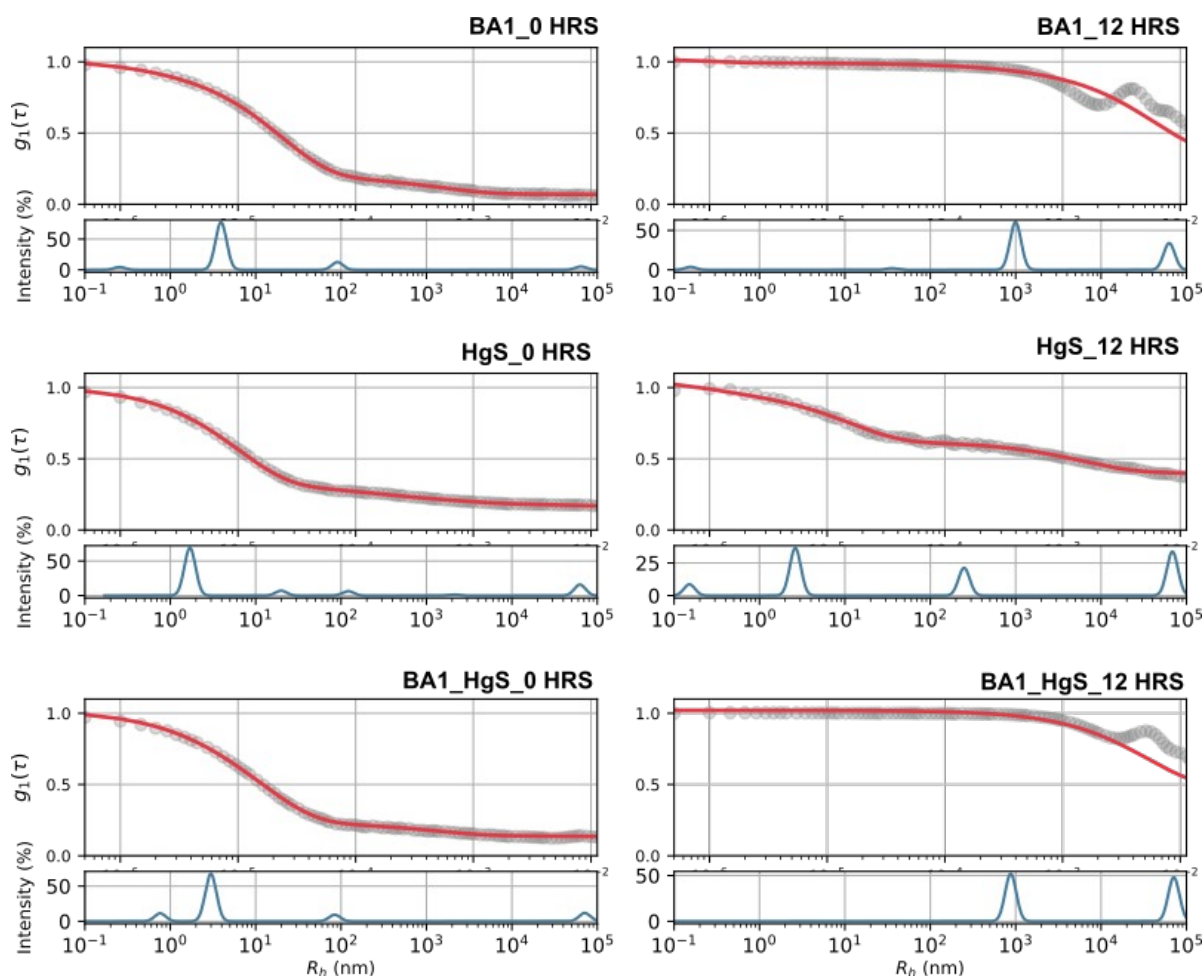


Figura 33. Funciones de correlación y distribuciones de tamaño para β A1, HyS y su mezcla (1:1) en ausencia de radiación UVB. En lado izquierdo representa el estado inicial (0 h), y el lado derecho el estado tras 12 horas de incubación a 37 °C. Los puntos corresponden a las datos experimentales y la línea roja representa el ajuste correspondiente.

5.7.3 Evolución del sistema tras radiación UVB y 12 h de incubación

A continuación, se evaluó el estado de las muestras tras la irradiación UVB seguida de 12 horas de incubación a 37 °C, simulando un proceso de agregación progresiva post estímulo. Como se

observa en la figura 34, la β A1 irradiada e incubada presenta un desplazamiento drástico en las curvas de correlación de DLS hacia tiempos de decaimiento más largos.

Este comportamiento es indicativo de la formación de especies de gran tamaño y una pérdida de monodispersidad. En el caso de la HyS bajo las mismas condiciones, aunque se detecta un incremento en el tamaño de las especies, este es menos pronunciado. Por su parte, la mezcla β A1+HyS (1:1) exhibe un comportamiento intermedio, sus curvas de correlación están menos desplazadas en comparación con β A1, aunque muestran una distribución de tamaños más heterogénea.

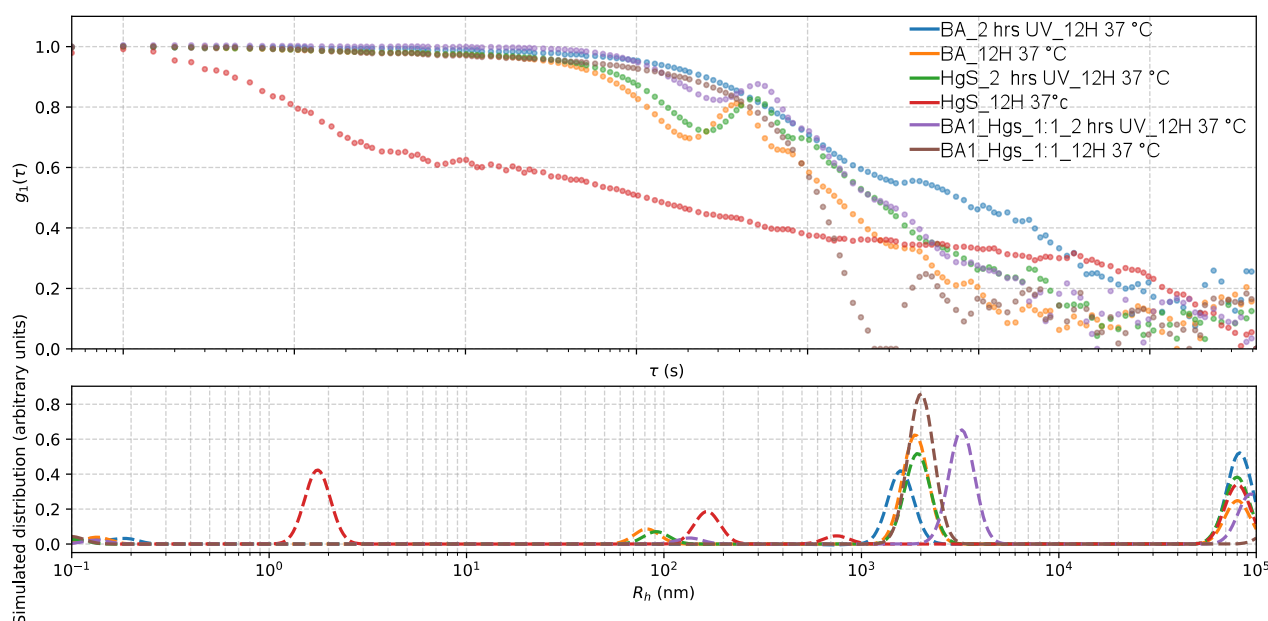


Figura 34. Curvas de correlación obtenidas por DLS y distribuciones de R_h tras 2 horas de UV y 12 h de incubación para β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1) . Se muestran únicamente los datos experimentales para facilitar la comparación entre condiciones.

Estos hallazgos, se complementan con los espectros de fluorescencia intrínseca (figura 35). Si bien no se aprecia un cambio significativo en la posición de máximo de emisión, se detectan cambios a longitudes de onda mayores. Los espectros de la β A1 presentan un incremento notable en la señal a longitudes de onda mayores (600 nm), reflejando una alta dispersión de luz por la presencia de agregados insolubles. En contraste, la HyS no muestra un incremento significativo en esta región. La mezcla β A1:HyS (1:1) presenta un aumento en la señal a dicha longitud de onda, pero de magnitud considerablemente menor en comparación con β A1 sola. Además, resulta interesante que en la mezcla, no se observa una caída en la intensidad de fluorescencia, a diferencia de lo registrado en experimentos previos de estrés térmico, lo que sugiere una estabilización de la estructura terciaria en el sistema binario.

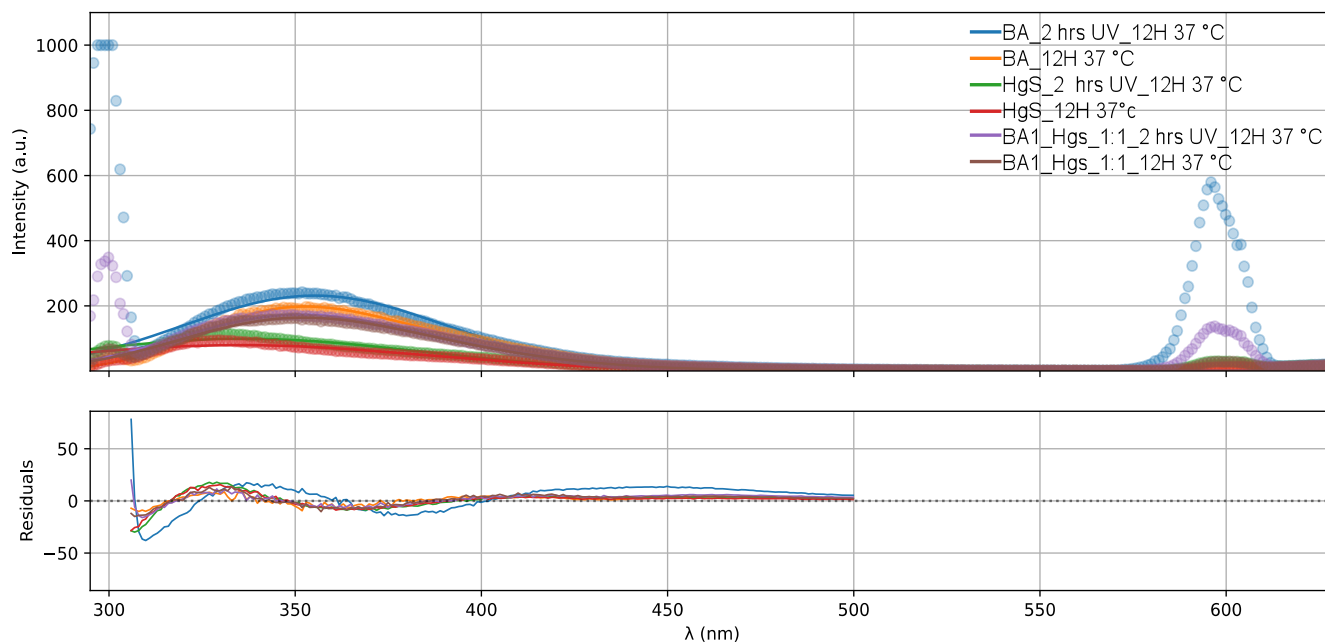


Figura 35. Espectros de fluorescencia (λ_{exc} 295 nm) de β A1, HyS y la mezcla β A1+HyS (1:1), tras 12 horas de incubación sin irradiación y después de irradiación UV (2 horas) seguida de 12 horas de incubación.

Para consolidar estos resultados, se midió la turbidez mediante absorbancia a 405 nm durante todo el experimento (figura 36). Los datos muestran un incremento para la β A1 tras el tratamiento (1.29), mientras que la HyS mantiene valores cercanos a la línea base (0.05). La mezcla muestra un incremento intermedio de 0.57, lo que representa menos de la mitad de la opacidad generada por la proteína individual.

	0 h (sin UV)	2 h UV	2 h UV+ 12 h
BA1	-3.92E-02	0.21	1.29
HyS	-2.72E-02	-2.93E-02	5.42E-02
BA1_HyS 1:1	-3.59E-02	-4.27E-02	0.57

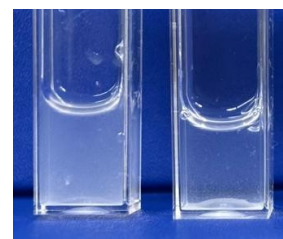


Figura 36. Valores de absorbancia a 405 nm para β A1, HyS y la mezcla β A1:HyS (1:1) en condiciones iniciales, tras irradiación UVB (2 h) y después de 12 horas de incubación a 37 °C. A la derecha, la comparación visual del incremento en la turbidez tras la irradiación de β A1 y la mezcla.

Finalmente, al comparar estos resultados con las muestras incubadas durante 12 horas en ausencia de radiación, se confirma que las muestras previamente irradiadas presentan un desplazamiento mucho mayor en las funciones de correlación y una contribución predominante de poblaciones de gran tamaño. Esta consistencia entre el aumento de la turbidez macroscópica, la señal de dispersión en fluorescencia y los cambios en DLS, demuestra de manera definitiva que la interacción con la HyS ejerce un papel protector fundamental, mitigando el impacto de la radiación UVB.

5.8 Evaluación de la interacción de Tioflavina (ThT)

Con el fin de caracterizar la naturaleza de los agregados y determinar si estos poseen una organización secundarias de tipo lámina β , se empleó el ensayo de fluorescencia con ThT. La unión de ThT a motivos de lámina β resulta en un incremento en la intensidad de fluorescencia, siendo un método ampliamente usado para detectar la presencia de estructuras fibrilares (Hawe *et al.*, 2008). Dado que la β A1 cristalina presenta un alto contenido de láminas β en su estado nativo, la señal de fluorescencia de la muestra no sometida a tratamiento se utilizó como línea base para la comparación, evaluando la interacción mediante espectros con una λ_{exc} 445 nm bajo condiciones de estrés térmico y radiación UVB.

5.8.1 Respuesta al estrés térmico

Tras la adición de ThT a las muestras sometidas a tratamiento térmico, los espectros de emisión mostraron un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia en la región de 480 nm en comparación con el control (figura 37). Este aumento en la señal es indicativo de una interacción de ThT con estructuras agregadas ricas en láminas β organizadas, sugiriendo que el calor promueve una transición hacia estados agregados con cierto grado de orden estructural o carácter amiloide en la β A1.

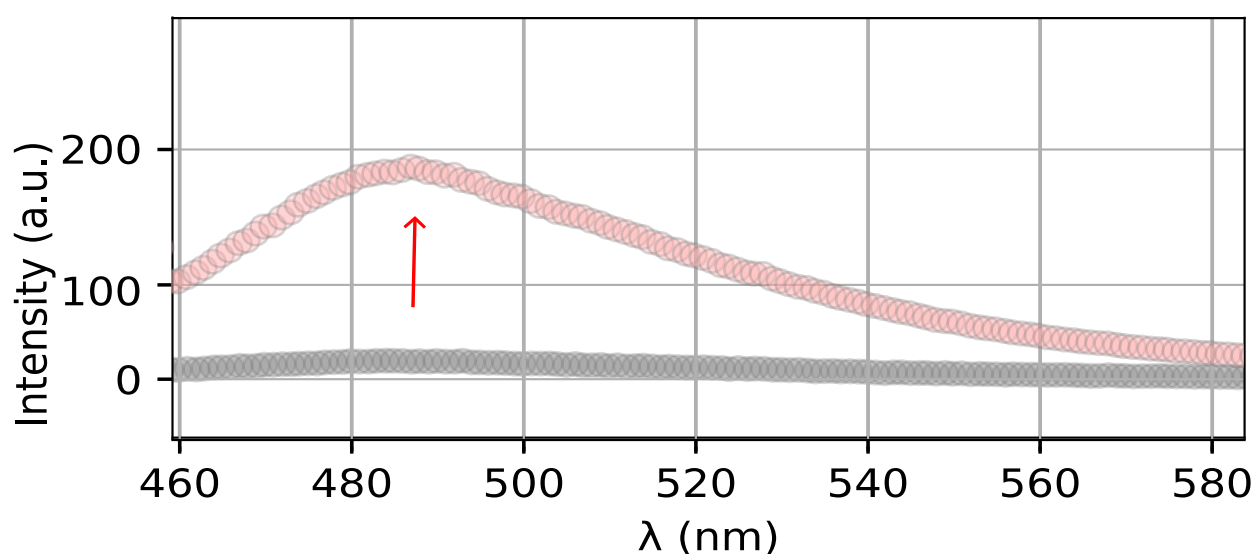


Figura 37. Espectros de fluorescencia de β A1 en presencia de tioflavina T (ThT) al inicio y al final del experimento de estabilidad térmica. La flecha roja indica el aumento de la señal asociado a la interacción de ThT con estructuras agregadas ricas en lámina β . La curva en color gris corresponde a las condiciones iniciales, mientras que la curva en color rosa representa las condiciones finales.

5.8.2 Respuesta a la radiación UVB

En contraste, los resultados obtenidos tras la exposición a radiación UVB presentan un comportamiento marcadamente distintos. Como se observa en la figura 38, las muestras sometidas a 2 horas de irradiación seguidas de 12 horas de incubación a 37 °C no mostraron cambios significativos en la intensidad de fluorescencia de ThT en comparación con la muestra control. La ausencia de un incremento en la región característica sugiere que los agregados formados bajo condiciones de fotooxidación no presentan el tipo de organización en láminas β detectables por este ensayo. Este hallazgo es fundamental, ya que indica que la agregación inducida por UV genera especies desordenadas o de tipo "agregado amorfo", diferenciándose claramente de la ruta de agregación térmica.

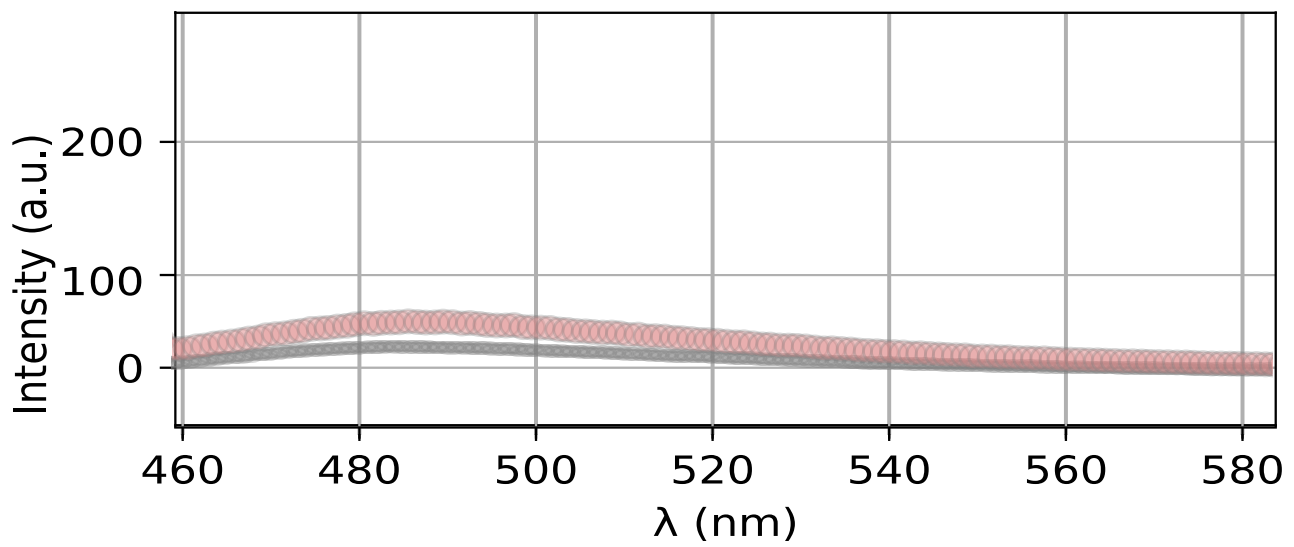


Figura 38. Espectros de fluorescencia de β A1 en presencia de tioflavina T (ThT) bajo condiciones de 2 horas de irradiación UVB seguidas de 12 horas de incubación a 37 °C. La curva en color gris corresponde al control, mientras que la curva en color rosa representa la muestra irradiada.

6. Discusión

Este estudio investigó como el estrés térmico y la radiación UVB comprometen la estabilidad de β A1 cristalina y como su interacción con la HyS modula su proceso de agregación. Dado que la transparencia del cristalino depende de un sistema proteico altamente concentrado y estable, resulta fundamental comprender como el daño ambiental altera estas proteínas para dar lugar a la formación de cataratas. En su estado nativo, la β A1 presenta un plegamiento caracterizado por un máximo de fluorescencia cercana a 348 nm y un tamaño hidrodinámico compatible con un estado dimérico. Sin embargo, tras la exposición a radiación UVB o estrés térmico, se observaron cambios significativos en la fluorescencia del triptófano, el tamaño hidrodinámico y la turbidez, indicando alteraciones en su estabilidad estructural.

Un hallazgo crítico en la evaluación de la estabilidad térmica fue la diferencia entre la intensidad y el máximo de emisión de fluorescencia, lo cual revela la complejidad del proceso de agregación. Durante el experimento, la intensidad mostró un comportamiento bifásico: una disminución progresiva inicial seguida de un aumento tras alcanzar un valor mínimo. Este patrón sugiere que la caída inicial de la señal refleja una desestabilización estructural temprana, mientras que el incremento posterior no corresponde a cambios en el microambiente del triptófano, sino a efectos de dispersión de luz provocado por la formación de agregados de gran tamaño (Lakowicz, 2006).

Esta interpretación se ve reforzada al analizar el desplazamiento del máximo de emisión (λ_{max}). En experimentos de calentamiento continuo hasta 85 °C se observó un corrimiento marcado hacia longitudes de onda mayores, confirmando una desnaturalización global de la proteína. En contraste, en mediciones realizadas tras retirar el estrés térmico, así como aquellas sometidas a radiación UVB, el máximo de emisión se mantuvo cercano a 348 nm. Esta discrepancia indica que la β A1 no necesariamente requiere un desplegamiento completo para iniciar su agregación, sino que este proceso puede originarse a partir de estados parcialmente plegados donde los residuos aromáticos quedan protegidos dentro del núcleo del agregado.

En concordancia con lo anterior, los experimentos de DLS mostraron un desplazamiento de las curvas de correlación hacia tiempos más largos tanto con temperatura como con radiación UVB. Particularmente, durante el estrés térmico, el cambio más significativo se observó a 45 °C, punto donde la disminución de la intensidad de fluorescencia coincide con el incremento en el tamaño hidrodinámico y la turbidez visible. Aunque la β A1 ha sido reportada como una proteína

térmicamente estable con una T_m cercana a 78 °C (Martínez Seoane, 2022), nuestros resultados demuestran que a 45 °C ya ocurre una agregación detectable. Esto no sugiere necesariamente que la T_m reportada sea incorrecta, sino que resalta que la agregación y la desnaturalización global son procesos distintos. Mientras que la T_m describe el punto donde la mitad de la población se despliega, la agregación puede iniciarse a temperaturas mucho menores a partir de perturbaciones estructurales que exponen regiones hidrofóbicas, promoviendo la asociación intermolecular mucho antes de que la proteína se desnaturalice por completo.

En el caso específico de la irradiación UVB, la formación de poblaciones con un radio hidrodinámico de 344 nm y la presencia de precipitados confirman un proceso de agregación irreversible. Al igual que bajo estrés térmico, el máximo de emisión permaneció prácticamente sin cambios, sugiriendo que el entorno de los triptófanos se mantiene parcialmente protegido. Esta aparente estabilidad espectral puede explicarse por la presencia de 9 triptófano en la $\beta A1$, donde la exposición de ciertos residuos al solvente puede ser compensada por aquellos que permanecen en entornos hidrofóbicos protegidos, neutralizando el cambio en el espectro total.

Adicionalmente, no se puede descartar la contribución de procesos de apagamiento (*quenching*) similares a los descritos para la γD -cristalina. Según el modelo propuesto por Chen y colaboradores, un triptófano de cada dominio es apagado por su par debido a una transferencia de energía que funciona como mecanismo de defensa ante los rayos UV. Dado que la $\beta A1$ posee los cuatro triptófanos conservados en los motivos II y IV, es muy probable que la transferencia de energía logre disipar la radiación absorbida. Este fenómeno explicaría porqué a pesar de la agregación evidente, el entorno de estos residuos permanece protegido, evitando así un desplazamiento significativo en el máximo de emisión.

Un fenómeno de particular interés fue la aparición de una señal en 590 nm. Esta señal, ausente en el estado nativo y que aumenta su intensidad en correlación directa con la turbidez, no corresponde a fluorescencia intrínseca, sino a un artefacto óptico de difracción de segundo orden (2λ). Bajo el efecto Tyndall, los agregados de $\beta A1$ actúan como centros de dispersión que desvían la luz de excitación (295 nm), provocando que el equipo registre una armónica en el doble de longitud de onda (Lakowicz, 2006). Por lo tanto, el seguimiento de la señal a 590 nm constituye una herramienta diagnóstica de gran valor para identificar el inicio de la formación de especies agregadas.

A pesar de que tanto el estrés térmico como la radiación UVB inducen agregación de la β A1, la naturaleza de los agregados es diferente. Los ensayos con ThT indicaron que el incremento de temperatura favorece la reorganización de la proteína en estructuras ordenadas de tipo fibrilar, mientras la radiación UVB conduce a la formación de agregados estructuralmente desordenados o amorfos. El incremento de temperatura podría inducir estados parcialmente desplegados que permiten la reorganización estructural observada en este trabajo, un comportamiento que ya ha sido descrito para la yD cristalina, donde se ha observado la formación de estructuras tipo amiloides bajo condiciones de pHs ácidos (Papanikolopoulou *et al.* 2008). El mecanismo propuesto para la formación de estas estructuras involucra cambios conformacionales que conducen a la pérdida de la conformación nativa de llave griega (Schafheimer & King, 2014).

Una vez establecido que la β A1 es susceptible a la agregación, el análisis se extendió a la mezcla β A1:HyS (1:1), la cuál presentó una mayor estabilidad. Bajo estrés térmico a 50 °C, la β A1 sola ya forma poblaciones de 111 nm (40 % de intensidad), mientras que la mezcla mantuvo una población mayoritaria (92% de intensidad) de apenas 61.73 nm. A temperaturas finales (85 °C), la mezcla mostró un menor desplazamiento en las curvas de correlación en comparación con β A1 individual, lo que sugiere una limitación en el crecimiento de los agregados. De manera consistente ante UVB, la mezcla redujo la proporción de agregados grandes de 344 nm (74% de intensidad) a solo 117 nm (47%). La similitud de los espectros de fluorescencia antes y después del daño apoya la idea de una estabilidad estructural mejorada indicando que el entorno de los triptófanos permanece parcialmente conservado. Este comportamiento sugiere que la HyS actúa modulando el crecimiento de los agregados, aunque no prevenga completamente la alteración química inicial de la β A1.

Dado que en este trabajo no se evaluaron interacciones directas entre proteínas, no podemos afirmar inequívocamente la formación de complejos entre proteínas, pero podríamos proponer tres escenarios para este efecto modulador. En primer lugar la radiación UVB podría alterar las extensiones N y C terminales de la β A1, la cuales son críticas para su auto-asociación oligomérica (Liu *et al.*, 2007) favoreciendo una agregación descontrolada en ausencia de otras proteínas. En segundo lugar, la presencia de la HyS en proporción 1:1 podría limitar el modo en que β A1 dañada contacta consigo misma.

Finalmente, el último escenario es que HyS interactué directamente con las primeras asociaciones de moléculas de β A1 que empiezan a pegarse debido al daño. En este modelo la HyS se uniría a los parches hidrofóbicos expuestos inicialmente en la β A1 actuando como un escudo que limita la superficie de unión al bloquear estos sitios, la HyS detiene la propagación

del agregado, impidiendo que especies oligoméricas pequeñas escalen hacia agregados masivos insolubles.

Este efecto modulador es fundamental en el contexto biológico del cristalino, sugiriendo que la transparencia no depende de la invulnerabilidad individual de las proteínas, sino de una cooperación donde las γ -cristalinas preservan la solubilidad del sistema frente al daño ambiental acumulado.

7. Conclusiones

1. El incremento de la temperatura y la radiación UVB inducen agregación en la β A1.
2. Para los ensayos con UVB, la ausencia de señal de Tioflavina T sugiere que la agregación no sigue una ruta amiloide.
3. Bajo estrés térmico, la respuesta positiva de ThT indica la formación de especies con estructura rica en láminas- β .
4. Se identificaron dos eventos cinéticos distintos durante el monitoreo de la fluorescencia del triptófano: disminución inicial de la intensidad y aumento posterior.
5. La aparición de señales en 590 nm corresponde a la formación de agregados observado por DLS.
6. La presencia de HyS en el entorno modula la agregación de la β A1.

8. Perspectivas

1. Analizar si la irradiación UVB induce cambios en estructura secundaria de β A1 individual mediante técnicas como FTIR o dicroísmo circular.
2. Caracterizar con más detalles la naturaleza de los agregados formados.
3. Evaluar la posible interacción entre ambas proteínas.

10. Bibliografía

- Agbas, A. (2018). Trends of protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Neurochemical Basis of Brain Function and Dysfunction*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81224>
- Artigas C. (2015). "Efectos de la radiación ultravioleta sobre la transmisión espectral del cristalino del cerdo común." Universidad Cardenal Herrera CEU, Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Valencia, España, pp. 46-60. <http://hdl.handle.net/10637/7213>
- 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK476171/>
- Alvarez Fontanet, E. (1995). Consecuencias del estrés oxidativo de la piel por radiaciones ultravioleta. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1), 0–0. <http://ref.scielo.org/dkg738>
- Andley, U. P. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26(1), 78–98. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.10.003>
- Andley U. and Clark B. (1989). "The Effects of Near-UV Radiation on Human Lens β -Crystallins: Proteins Structural Changes and the Production of O₂⁻ and H₂O₂." *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 50, No. 1, pp. 97-105. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1989.tb04134.x>
- Bagneris, C., Bateman, O. A., Naylor, C. E., Cronin, N., Boelens, W. C., Keep, N. H., & Slingsby, C. (2009). Crystal structures of α -crystallin domain dimers of α B-crystallin and Hsp20. *Journal of molecular biology*, 392(5), 1242-1252. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.069>
- Basak, A., et al. (2003). High-resolution X-ray crystal structures of human γ D-crystallin (1.25 Å) and the R58H mutant (1.15 Å) associated with aculeiform cataract. *Journal of Molecular Biology*, 328(5), 1137–1147. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00375-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00375-9)
- Bari, K. J. (2021). The structural biology of crystallin aggregation: challenges and outlook. *The FEBS Journal*, 288(20), 5888-5902. <https://doi.org/10.1111/febs.15684>
- Bateman, O. A., et al. (2003). The stability of human acidic β -crystallin oligomers and hetero-oligomers. *Experimental Eye Research*, 77(4), 409–422. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00173-8)
- Bhattacharyya, J., Padmanabha Udupa, E. G., Wang, J., & Sharma, K. K. (2006). Mini- α B-crystallin: a functional element of α B-crystallin with chaperone-like activity. *Biochemistry*, 45(9), 3069-3076. <https://doi.org/10.1021/bi0518141>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012>
- Bochow, T. W., West, S. K., Azar, A., Munoz, B., Sommer, A., & Taylor, H. R. (1989). UV light exposure and risk of posterior subcapsular cataracts. *Archives of Ophthalmology*, 107, 369–372. <https://doi.org/10.1001/archopht.1989.01070010379027>
- Buell, A. (2017). The nucleation of protein aggregates—From crystals to amyloid fibrils. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 329, 187–226.

<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.08.014>

- Cetinel, S., Semenchenko, V., Cho, J. Y., Sharaf, M. G., Damji, K. F., Unsworth, L. D., & Montemagno, C. (2017). UV-B induced fibrillization of crystallin protein mixtures. *PloS one*, 12(5), e017799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177991>
- Chen, J., et al. (2006). Mechanism of the highly efficient quenching of tryptophan fluorescence in human γ D-crystallin. *Biochemistry*, 45(38), 11552–11563. <https://doi.org/10.1021/bi060988v>
- Chen, J., Callis, P. R., & King, J. (2009). Mechanism of the very efficient quenching of tryptophan fluorescence in human γ D-and γ S-crystallins: the γ -crystallin fold may have evolved to protect tryptophan residues from ultraviolet photodamage. *Biochemistry*, 48(17), 3708-3716. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19358562/>
- Chuang, E., Hori, A. M., Hesketh, C. D., & Shorter, J. (2018). Amyloid assembly and disassembly. *Journal of Cell Science*, 131, Article jcs189928. <https://doi.org/10.1242/jcs.189928>
- Delcourt C, Cougnard-Grégoire A, Boniol M, Carrière I, Doré JF, Delyfer MN, Rougier MB, Le Goff M, Dartigues JF, Barberger-Gateau P, Korobelnik JF. Lifetime exposure to ambient ultraviolet radiation and the risk for cataract extraction and age-related macular degeneration: the Alienor Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Oct 21;55(11):7619-27. doi: 10.1167/iovs.14-14471. PMID: 25335979. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14471>
- Diffey, B. L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(02\)00204-9](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(02)00204-9)
- Donaldson, P., & Lim, J. (2008). Membrane transporters: New roles in lens cataract. In *Ocular Transporters in Ophthalmic Diseases and Drug Delivery*. Humana Press, New Jersey, NJ, USA. https://catalog.nlm.nih.gov/permalink/01NLM_INST/93h1c8/alma9914704273406676
- Downard, K. M., Kokabu, Y., Ikeguchi, M., & Akashi, S. (2011). Homology-modeled structure of the bB2B3-crystallin heterodimer studied by ion mobility and radical probe MS. *FEBS Journal*, 278(23), 4044–4054. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08309.x>
- Eichner, T., & Radford, S. (2011). Understanding the complex mechanisms of β 2-microglobulin amyloid assembly. *The FEBS Journal*, 278(20), 3868–3883. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08186.x>
- 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), 0-0. <http://ref.scielo.org/jyx6yd>
- Fielding, J. (2015). Lens biology and biochemistry. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 134. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.007>
- Finke, J. M., Roy, M., Zimm, B. H., & Jennings, P. A. (2000). Aggregation events occur prior to stable intermediate formation during refolding of interleukin 1 β . *Biochemistry*, 39(3), 575-583. <https://doi.org/10.1021/bi991518m>
- Frederik J. (1991). "Effects of Ultraviolet Light on the Eye: Role of Protective Glasses." *Health Perspectives* Vol. 96, pp. 177-184. <https://doi.org/10.2307/3431229>
- Graw, J. (2009). Genetics of crystallins: Cataract and beyond. *Experimental Eye Research*, 88(2), 173–189. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.10.011>

- Hains PG, Truscott RJ. Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses. *J Proteome Res.* 2007 Oct;6(10):3935-43. doi: 10.1021/pr070138h. Epub 2007 Sep 7. PMID: 17824632. <https://doi.org/10.1021/pr070138h>
- Hawe, A., Sutter, M., & Jiskoot, W. (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical research*, 25(7), 1487-1499. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9516-9>
- Hejtmancik, J. F., & Smaoui, N. (2003). Molecular genetics of cataract. *Developments in Ophthalmology*, 37, 67-82. <https://doi.org/10.1159/000072039>
- Hoehenwarter, W., Klose, J., & Jungblut, P. R. (2006). Eye lens proteomics. *Amino acids*, 30(4), 369-389. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0283-9>
- Horwitz, J. (2003). Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research*, 76(2), 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(02\)00278-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00278-6)
- Javitt, J. C., & Taylor, H. R. (1995). Cataract and latitude. *Documenta Ophthalmologica*, 88(3-4), 307–325. <https://doi.org/10.1007/bf01203684>
- 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. <https://doi.org/10.1080/20014091074237>
- Jedziniak, J., Arredondo, M., & Andley, U. (1987). Oxidative damage to human lens enzymes. *Current eye research*, 6(2), 345-350. <https://doi.org/10.3109/02713688709025186>
- Kang, H., & Baker, E. (2011). Intramolecular isopeptide bonds: Protein crosslinks built for stress? *Trends in Biochemical Sciences*, 36(4), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.007>
- Karri S, Kasetti RB, Vendra VP, Chandani S, Balasubramanian D. Structural analysis of the mutant protein D26G of human γ S-crystallin, associated with Coppock cataract. *Mol Vis.* 2013 Jun 5;19:1231-7. PMID <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3675056/>
- Kuszak, J. R., & Costello, M. J. (1992). Embryology and anatomy of human lenses. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. <http://www.oculist.net/downat0502/prof/ebook/duanes/pages/v1/v1c071a.html#ref>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.14>
- Lampi, K. J., et al. (1997). Sequence analysis of β A3, β B3, and β A4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens. *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), 2268–2275. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2268>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Le Grand, Y., & El Hage, S. G. (1980). *Physiological Optics: Springer Series in Optical Sciences*. https://discovery.hw.ac.uk/permalink/f/vr3qe7/44hwa_alma2125464440003206
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.06.015>

- Liu, B. F., & Liang, J. J. N. (2007). Protein–protein interactions among human lens acidic and basic β -crystallins. *FEBS letters*, 581(21), 3936-3942. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.022>
- Lovicu, F. J., & McAvoy, J. W. (2005). Growth factor regulation of lens development. *Developmental Biology*, 280(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.020>
- Mafia, K., et al. (2008). UV-A-induced structural and functional changes in human lens deamidated α B-crystallin. *Molecular Vision*, 14, 234. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18334940/>
- Martínez Seoane, J. A. (2022). *Estudios de agregación de la proteína cristalina humana β A1 y búsqueda de inhibidores*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Micun, Z., Falkowska, M., Młynarczyk, M., Kochanowicz, J., Socha, K., & Konopińska, J. (2022). Levels of trace elements in the lens, aqueous humour, and plasma of cataractous patients—a narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(16), 10376. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36012010/>
- Moran, S. D., Zhang, T. O., Decatur, S. M., & Zanni, M. T. (2013). Amyloid fiber formation in human γ D-crystallin induced by UV–B photodamage. *Biochemistry*, 52(36), 6169-6181. <https://doi.org/10.1021/bi4008353>
- Moreau, K. L., & King, J. A. (2012). Cataract-Causing Defect of a Mutant γ -Crystallin Proceeds through an Aggregation Pathway Which Bypasses Recognition by the α -Crystallin Chaperone. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(3), 203–211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037256>
- Mori, W., Kawakami, R., Niko, Y., Haruta, T., Imamura, T., Shiraki, K., & Zako, T. (2022). Differences in interaction lead to the formation of different types of insulin amyloid. *Scientific Reports*, 12(1), 8556. https://doi.org/10.1038/s41598-022-12212-6?urlappend=%3Futm_source%3Dresearchgate.net%26utm_medium%3Darticle
- Muranov, K. O., Maloletkina, O. I., Poliansky, N. B., Markossian, K. A., Kleymenov, S. Y., Rozhkov, S. P., & Kurganov, B. I. (2011). Mechanism of aggregation of UV-irradiated β L-crystallin. *Experimental Eye Research*, 92(1), 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.11.005>
- Nagaraj, R. H., Nahomi, R. B., Mueller, N. H., Raghavan, C. T., Ammar, D. A., & Petrash, J. M. (2016). Therapeutic potential of α -crystallin. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(1), 252-257. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.012>
- Nakajima, E., et al. (2007). Role of the unfolded protein response in ultraviolet-induced apoptosis of human lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(7), 3121–3129. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.033>
- Ostrovsky, M. A., Sergeev, Y. V., Atkinson, D. B., Soustov, L. V., & Hejtmancik, J. F. (2002). Comparison of ultraviolet induced photo-kinetics for lens-derived and recombinant beta-crystallins. *Mol Vis*, 8, 72-8. <http://www.molvis.org/molvis/v8/a10/>

- Papanikolopoulou, K., Mills-Henry, I., Thol, S. L., Wang, Y., Gross, A. A., Kirschner, D. A., & King, J. (2008). Formation of amyloid fibrils in vitro by human γ D-crystallin and its isolated domains. *Molecular vision*, 14, 81. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2267726/>
- Pande, A., Pande, J., Asherie, N., Lomakin, A., Ogun, O., King, J., & Benedek, G. B. (2001). Crystal cataracts: Human genetic cataract caused by protein crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6116–6120. <https://doi.org/10.1073/pnas.101124798>
- Pande, A., Mokhor, N., & Pande, J. (2015). Deamidation of human γ S-crystallin increases attractive protein interactions: implications for cataract. *Biochemistry*, 54(31), 4890–4899. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26158710/>
- Pascolini D, Mariotti SP (2012) Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 96:614-618. <https://translate.google.com/website?sl=en&tl=es&hl=es&client=srp&u=https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2011-300539>
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S., & Davies, M. J. (2012). Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(1), 38–53. <https://doi.org/10.1039/c1pp05164d>
- Rivillas-Acevedo, L., Fernández-Silva, A., & Amero, C. (2015). Function, structure and stability of human gamma d crystallins: A review. *Physical Biology of Proteins and Peptides: Theory, Experiment, and Simulation*, 81–98. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21687-4_5
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.05.002>
- Sergeev, Y. V., Soustov, L. V., Chelnokov, E. V., Bituryn, N. M., Backlund, P. S., Wingfield, P. T., ... & Hejtmancik, J. F. (2005). Increased Sensitivity of Amino-Arm Truncated β A3-Crystallin to UV-Light-Induced Photoaggregation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(9), 3263–3273. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0112>
- Schafheimer, N., & King, J. (2013). Tryptophan Cluster Protects Human γ D-Crystallin from Ultraviolet Radiation-Induced Photoaggregation In Vitro. *Photochemistry and photobiology*, 89(5), 1106–1115. <https://doi.org/10.1111/php.12096>
- Shamsi, T. N., Athar, T., Parveen, R., & Fatima, S. (2017). A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.116>
- Sharma, K. K., & Santhoshkumar, P. (2009). Lens aging: effects of crystallins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.008>
- Slingsby, C., & Clout, N. J. (1999). Structure of the crystallins. *Eye*, 13(Pt 3b), 395–402. <https://doi.org/10.1038/eye.1999.113>
- Spector, A. (1995). Oxidative stress-induced cataract: Mechanism of action. *FASEB Journal*, 9(12), 1173–1182. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7672510>
- Sun, Y., & MacRae, T. H. (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(21), 2460–2476. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5190-4>

- 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18567786/>
- Takemoto, L., & Sorensen, C. M. (2008). Protein–protein interactions and lens transparency. *Experimental eye research*, 87(6), 496-501. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.08.018>
- Truscott, R. J. (2005). Age-related nuclear cataract—oxidation is the key. *Experimental Eye Research*, 80(5), 709–725. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.12.007>
- Toichi, K., Yamanaka, K., & Furukawa, Y. (2013). Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 4970-4980. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.414235>
- Vendra, V. P. R., Khan, I., Chandani, S., Muniyandi, A., & Balasubramanian, D. (2016). Gamma crystallins of the human eye lens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(1), 333-343. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.007>
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International journal of pharmaceutics*, 289(1-2), 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>
- Wang, Y., Lomakin, A., McManus, J. J., Ogun, O., & Benedek, G. B. (2010). Phase behavior of mixtures of human lens proteins Gamma D and Beta B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30), 13282-13287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008353107>
- Xi, Y. B., Zhang, K., Dai, A. B., Ji, S. R., Yao, K., & Yan, Y. B. (2014). Cataract-linked mutation R188H promotes β B2-crystallin aggregation and fibrillization during acid denaturation. *Biochemical and biophysical research communications*, 447(2), 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.119>
- Xu, J., Wang, S., Zhao, W. J., Xi, Y. B., Yan, Y. B., & Yao, K. (2012). The congenital cataract-linked A2V mutation impairs tetramer formation and promotes aggregation of β B2-crystallin. *PLoS One*, 7(12), e51200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051200>
- Zhou, H. X., & Pang, X. (2018). Electrostatic interactions in protein structure, folding, binding, and condensation. *Chemical Reviews*, 118(4), 1691–1741. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00305>
- <https://www.gob.mx/salud/prensa/estrategia-nacional-de-cirugia-de-catarata-ver-por-mexico#:~:text=34%25%20de%20los%20casos%20de,cirug%C3%ADa%20por%20falta%20de%20recursos>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 2 de mayo de 2026

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Efectos de la radiación UV en la estructura y estabilidad de la proteína β A1 cristalina humana y su interacción con otras proteínas oculares que presenta la L. B. Laura Pérez Rodríguez (10078276), para obtener el título de Maestría en Ciencias.

Dirección de tesis: Dr. Carlos Daniel Amero Tello
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN
Dr. Carmen Nina Pastor Colón CIDC - UAEM	APROBADO
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC - UAEM	APROBADO
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT - UNAM	APROBADO
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB - UAEM	APROBADO
Dra. Paloma Columba Gil Rodríguez IBT - UNAM	APROBADO





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2026-05-05 12:42:42 | FIRMANTE

dSg95hq63gDqJWOZ/DKgnCbdVnPhLujyYiiYRyBRJ/HUwp1CF3veCtsCy1qDhvKTdomxphASrb8C6NNQLh0sr91zam8uxY6QFSww+simo2hMKPyPO7+P6ZNGmPWRcHqhJ36CKjc9TnCBUJFP7v4FqFIG5F0rcxZjHdHSIIEW9NK/ORqKIA+DNClRpuEz0SoulBEjJBfYxG3NKoaYHpo7bHDIIISfDiRw+/pOkNESS7DNLsmI9KxQqVCD/92n/6vhaqjiiE396BfnGkwlTKIn5Z10t/PIBEBNhzVlPkAqy9FUwcHVv70k71IPMCoEG3QjbELizcimebEYUnKIhV62G5A==

ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA | Fecha:2026-05-05 13:53:15 | FIRMANTE

ZJiNRzjxeyZjD6IT5jRPMIzZBKJd6qB+RJR1nJlQ+pLgVfm1Gf3VhpZqpVB32cFn7TgfUzu+LauUYltG+ysr3HnSWCp2ENS5wkaDM0qNXnFBT647B0cfe9XmvlG6aQOZeYw1zl9R5TRg/he2/dr2vEWILS2I8kiP3yXMwh1j2EtenNNazmmidikyAN/SI9E/9OYsjLheg4n0jAwoyzLWHgzooS7cRS9oV0VdppK6USmATFjGfH+J6DNW+eh1WKQ0KEuEQ7iars0Ls215/O+aT9VyQASenHcG/hQeUenwVOoilDqgNVbAyPP/d0XqQkJ/WJ1MrCdsF0XSsyOJaig==

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2026-05-05 16:42:23 | FIRMANTE

JeTvjYnNPR6ZWnjYt1T4H1T4euyf1zdKzrOswAb28+Md8cY4bQJ155kB1hmRA6HCRXsE9Xiue1cS/l7qeSevo5tOUf6aHdws516BQOO/d4pwwzQ86aQzVYCi6l+aaj9Zb/A8czGRgFNpUbl95I+/ualQ+PF1XcRf0cKBqqH5XDTiaVEfMyvTKqJ8sancaElo9IHHg/FRH8dX1mLYcX/Umx4immtXXpbSOG8GDqAeAMiK7ehfBLF0Dpb7HD5mviTYbq3cM6buHo9XQvUeZ+G0HkzdV+NNjyBRm3m2HzMUrG7x50Ue8fKQzt2YA4TgDgh+ufSUApdswCCLyZLrUp0g==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2026-05-05 17:10:06 | FIRMANTE

OBentifRBLmbR0MGOrbyGwAg/6lN28awoGYiZea27487GmD3OjefyuW9CXdfc3cDqS650oevaYWH7bM9/cG1nAcipr5uSQQMfnWaT21ktxJJINO0qLmXKuczAtWvaRvZ8DiG5XZCxtPjTijzJa2jrtXIi67cYuLgJahoivpETslcSgen+yM8Mx3o/3N8M0PDjaWPRmd+H5a2TfOjPTR5YKI6dULERijBuGTDCf/6AiGcwNSCbqm84saYB6yKX6eZBanb+sLosxHW2KGLYB55xGtNW4BhYD58TUTdP8uzjnKpoSSkr9qM/ZZfUtwmAvHvPxE585QEPymE3N6g==

PALOMA COLUMBA GIL RODRÍGUEZ | Fecha:2026-05-11 11:00:00 | FIRMANTE

ZyZzPspBzR71o7KSdGG7X/THwlSeaf3SkOWca84URes/6+Xpc6tYI/DwzeRLbxu5aWTdieK7vKPMqLG0jmvFli3Is3hEbaLHm1QktapMV4yFh8Lfpz8ZkSPNsxoRx96ZCEe9Q8O6ncNXDSTgMDvcLDE4bd9ch/NbU9aw5WyYwYHJDauCNm8FbbhT4eUkki7YI/IgeBGE97WjwwN02db6Q5/zPjCrGzGx1xfnv7ighOp3sRI4DbGHYNOiMWvsGQv0szjFo33AyQzS40QMt7AZ+6F9D1xsODgWBUONYDr0agNKBRI/j2O4IPkPVNPxw7GcbFuy5stTX5nX2KS05Q==

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



PfNwKzOr3

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vV7Wok2OHKC8Q91EKx1AMyGvJZHvzkJz>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029