

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y  
APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Papel de los triptófanos en la protección al daño por la  
radiación UV de la cristalina gamma D Humana

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. YISSELL BORGES RODRÍGUEZ

DIRECTOR: DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO

CO-DIRECTOR: DR. RODRIGO MORALES CUETO

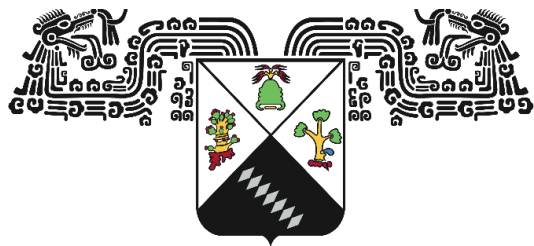
SINODALES: DRA. CARMEN NINA CARMEN PASTOR COLÓN

DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ

DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y  
APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Papel de los triptófanos en la protección al daño por la  
radiación UV de la cristalina gamma D Humana

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. YISSELL BORGES RODRÍGUEZ

DIRECTOR: DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO

CO-DIRECTOR: DR. RODRIGO MORALES CUETO

SINODALES: DRA. CARMEN NINA CARMEN PASTOR COLÓN

DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ

DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2023

## RESUMEN

Las cristalinas son las proteínas más abundantes del cristalino del ojo humano y se clasifican en alfa, con función de chaperona, y las beta y gamma que presentan función estructural. La función estructural de las cristalinas se basa en que están empacadas de un modo estable y ordenado en las células fibrilares del cristalino, de tal modo que permiten que este sea un medio transparente. La catarata es la pérdida de transparencia del cristalino; es la causa más frecuente de ceguera reversible en el mundo y es causada por la agregación de las cristalinas. La cristalina gamma D humana (HgD) es una de las cristalinas presentes en cataratas, además es la segunda gamma cristalina más abundante en el núcleo del cristalino y presenta cuatro triptófanos altamente conservados con respecto a otros verberados, en las posiciones 42, 68, 130 y 156.

Existen múltiples factores de riesgo para el desarrollo de cataratas, la radiación ultravioleta (UV) es considerada uno de los principales. Se ha planteado que los residuos de triptófanos altamente conservados absorben la radiación UV recibida, sugiriendo que la fotooxidación del triptófano inducida por la radiación UV puede ser un primer paso en la desestabilización de las proteínas del cristalino. En el caso de la HgD, los cuatro triptófanos presentes funcionan como un embudo de la radiación UV, mediante un proceso que involucra la transferencia de energía y la conversión interna del estado excitado, protegiendo a la proteína de la cascada fotoquímica iniciada por la radiación. Teniendo en cuenta que los mecanismos de apagamiento de la fluorescencia son muy sensibles a cambios en la conformación como al número de triptófanos presentes, es importante analizar y comprender los mecanismos de fotoionización y de apagamiento de su señal en una proteína fotosensible como la HgD.

*Dedicatoria*

*A mi esposo Héctor, mi motivación y mi compañero de aventuras.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada con CVU 1143055.

A la Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo, directora de este proyecto, por aceptarme en su laboratorio, por su tiempo, por los conocimientos transmitidos y las aportaciones para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Rodrigo Morales Cueto por sus aportaciones al proyecto de investigación y conocimientos compartidos.

A la Dra. Liliana Quintanar Vera por los comentarios aportados en los tutorales.

A mi jurado revisor por el tiempo dedicado a la revisión de este proyecto, por las correcciones y recomendaciones realizadas.

Al Dr. Carlos Amero Tello por permitirme usar los equipos de su laboratorio, por su tiempo, por su apoyo y sus consejos invaluable.

Al Dr. Carlos Muñoz Garay por permitirme usar los equipos de su laboratorio y al Dr. Pablo Hernández y el Dr. Brandt Bertrand por el apoyo ofrecido.

A la Lic. Erika Meneses Romero por su tiempo y conocimientos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo ofrecido y hacer mi estancia más amena.

A mis amigos, a los que están cerca gracias por el cariño y los momentos compartidos; y a los que están lejos gracias por el apoyo ofrecido a pesar de la distancia.

A mi familia por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi madre por su amor, por nunca dejar de creer en mí, por ser mi motor impulsor, por enseñarme a ser fuerte y a luchar por mis sueños.

A mi esposo Héctor por darme la fuerza que necesitaba cada día para seguir adelante, por decirme cada segundo que sí podía lograrlo y por siempre sacarme una sonrisa hasta en los días más difíciles, gracias por tanto amor.

A todos, gracias.

## ÍNDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaturas

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Proteínas del cristalino .....	3
1.2 Gamma D cristalina humana.....	5
1.3 Agregación de proteínas .....	6
1.4 Agregación de la gamma D cristalina humana.....	7
1.5 Factores de riesgo para la agregación de cristalinas .....	8
1.6 Radiación ultravioleta como factor de riesgo .....	10
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 Objetivo general .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>20</b>
4.1 Determinación de la intensidad de la luz emitida por la lámpara ultravioleta .....	20
4.2 Sobreexpresión de HgD y sus variantes .....	21
4.3 Purificación de HgD y sus variantes.....	22
4.4 Cinéticas de agregación.....	22
4.5 Evaluación de cambios en la estructura secundaria .....	23
4.6 Evaluación de cambios conformacionales .....	24
4.7 Evaluación de cambios covalentes .....	24
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
5.1 Determinación de la intensidad de la luz emitida por la lámpara ultravioleta .....	25
5.2 Sobreexpresión y purificación de HgD y sus variantes .....	26
5.3 Optimización de los parámetros de las cinéticas de agregación.....	28
5.4 Efecto de las mutaciones en la estructura secundaria y la cinética de agregación de proteínas .....	29
5.5 Efecto de la radiación ultravioleta en la estructura secundaria y la cinética de agregación de las proteínas.....	31
5.6 Efecto de la radiación ultravioleta en la estructura terciaria de las proteínas.....	34
5.7 Efecto de la radiación ultravioleta en la cinética de agregación de las proteínas en ausencia de oxígeno.....	36

5.8 Efecto de la radiación ultravioleta en la estructura terciaria de las proteínas en ausencia de oxígeno.....	37
5.9 Cambios covalentes en HgD después de su exposición a la radiación UV en presencia y ausencia de oxígeno.....	39
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## Índice de figuras

**Figura 1** Estructura del cristalino.

**Figura 2** Representación de la estructura tridimensional de las proteínas  $\alpha$ B-cristalina, la  $\beta$ B-cristalina y la  $\gamma$ S-cristalina.

**Figura 3** Representación de la estructura tridimensional de la proteína HgD.

**Figura 4** Representación de la estructura tridimensional de la proteína HgD señalando sus residuos aromáticos F11/Y6, Y16/Y28, Y50/Y45, Y92/Y97, Y138/Y133 y F117/F115.

**Figura 5** Representación de la estructura tridimensional de la proteína HgD señalando sus residuos de cisteína.

**Figura 6** Absorción de la radiación por las diferentes estructuras del ojo.

**Figura 7** Enzimas y antioxidantes que participan en el balance del estado redox.

**Figura 8** Mecanismo de fotooxidación del triptófano por absorción directa de la radiación UV y vías mediadas por  $^1\text{O}_2$ .

**Figura 9** Oxidación de aminoácidos inducida por ROS.

**Figura 10** Mecanismo de fotoformación del complejo Fe(II) con ortofenantrolina.

**Figura 11** Espectros de absorción de la formación del complejo Fe(II)-ortofenantrolina con diferentes tiempos de exposición y gráfica de absorbancia a 511 nm contra el tiempo de radiación.

**Figura 12** Electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la sobreexpresión y purificación de HgD.

**Figura 13** Electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la sobreexpresión y precipitación de las mutantes de triptófano.

**Figura 14** Cromatograma de las fracciones colectadas y electroforesis SDS-PAGE de las mutantes de triptófano.

**Figura 15** Cinéticas de agregación de HgD.

**Figura 16** Espectros de dicroísmo circular y cinéticas de agregación de las proteínas sin irradiar.

**Figura 17** Gráfico representativo del ajuste de Boltzmann y ajuste  $\ln[A]$  vs t para las proteínas sin irradiar.

**Figura 18** Espectros de dicroísmo circular y cinéticas de agregación de las proteínas sin irradiar e irradiadas.



**Figura 19** Gráfico representativo del ajuste de decaimiento exponencial y ajuste  $\ln[A]$  vs  $t$  para las proteínas irradiadas.

**Figura 20** Espectros de emisión de fluorescencia de la HgD con diferentes dosis de radiación y tendencia de los máximos de emisión.

**Figura 21** Espectros de emisión de fluorescencia de las mutantes de triptófano con diferentes dosis de radiación y tendencia de los máximos de emisión.

**Figura 22** Cinéticas de agregación de las proteínas sin irradiar e irradiadas en presencia y ausencia de oxígeno.

**Figura 23** Espectros de emisión de fluorescencia de la HgD con diferentes dosis de radiación UV, en presencia y ausencia de oxígeno.

**Figura 24** Espectros de emisión de fluorescencia de las mutantes de triptófano con diferentes dosis de radiación UV en ausencia de oxígeno.

**Figura 25** Espectro *full scan* de los iones precursores y luego de la deconvolución para la proteína HgD sin irradiar.

**Figura 26** Espectros de masas deconvolucionados de HgD con diferentes dosis de radiación UV en presencia y ausencia de oxígeno.

**Figura 27** Espectros de masas deconvolucionados de HgD irradiada 30 minutos en presencia y ausencia de oxígeno.

**Figura 28** Espectros de masas deconvolucionados de HgD irradiada 60 minutos en presencia y ausencia de oxígeno.

.

## **Índice de tablas**

**Tabla 1** Lesiones oculares causadas de acuerdo con el tipo de radiación empleada.

**Tabla 2** Concentraciones del complejo Fe(II)-ortofenantrolina.

**Tabla 3** Porcentajes de estructura secundaria de las proteínas estimados por BeStSel a partir de los espectros de dicroísmo circular.

**Tabla 4** Valores cinéticos de la agregación de las proteínas sin irradiar.

**Tabla 5** Porcentaje de estructura secundaria de las proteínas sin irradiar e irradiadas estimados en BeStSel.

**Tabla 6** Valores cinéticos de la agregación de las proteínas irradiadas y sin irradiar.

**Tabla 7** Valores cinéticos de la agregación inducida por radiación UV de HgD y sus mutantes de triptófano.

## **Abreviaturas**

**HgD** cristalina gamma D humana

**Trp** triptófano

**UV** ultravioleta

**Phe** fenilalanina

**Cys** cisteína

**Tyr** tirosina

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**ATP** adenosín trifosfato

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**ROS** especies reactivas de oxígeno

**IPTG** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**FPLC** cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad

**SDS-PAGE** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**D.O.** densidad óptica

**T<sub>in</sub>** tiempo de intercepción

**T<sub>1/2</sub>** tiempo de vida media

**k** constante de velocidad

**LC-MS** cromatografía líquida-espectrometría de masas

**K** quinurenina

**NFK** N-formilquinurenina

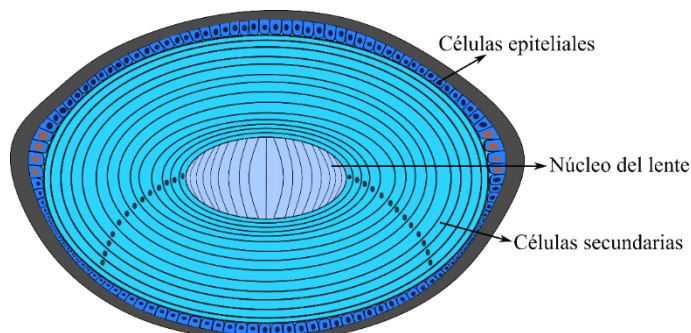
## 1. INTRODUCCIÓN

Las cataratas son la principal causa de ceguera reversible en el mundo. Es considerado un problema de salud pública pues afecta a 94 millones de personas a nivel global (OMS 2023). Su tratamiento consiste en reemplazar quirúrgicamente el lente dañado por un lente sintético. Este es un tratamiento sencillo, pero fuera del alcance de millones de personas en países en desarrollo (González et al. 2011; IAPB 2020; NEI 2020; OMS 2023). Según la Secretaría de Salud del Gobierno de México, en 2023 esta cirugía tiene un costo aproximado de \$30,000 (MX) (<https://www.gob.mx/>).

La catarata se define como la opacidad no fisiológica del cristalino. Es decir, es la pérdida de transparencia del cristalino (Brian and Taylor 2001; Sturmer 2009). En el momento en el que la opacidad en el cristalino se evidencia clínicamente, se presuponen alteraciones irreversibles que incluyen la agregación de proteínas, la hidratación tisular de las células del cristalino que conduce a su hinchamiento y ruptura, la acumulación de componentes moleculares, la ruptura de membranas celulares y cambios en la estructura del citoesqueleto (Artigas 2015). Lo anterior ha motivado el estudio de la agregación de diversas proteínas del cristalino, y su participación en la ocurrencia de cataratas. Las cataratas son una enfermedad degenerativa, pues los daños en las proteínas se acumulan durante años. Por esta razón, las cataratas más comunes son las seniles; sin embargo, también existen cataratas juveniles, causadas principalmente por mutaciones específicas en las proteínas del cristalino, lo que las hace menos estables y conduce a su agregación temprana (Karri et al. 2013; Pande et al. 2015; Pande et al. 2010; Vendra et al. 2012; Vendra et al. 2016). Por ejemplo, en la HgD se ha descrito la sustitución de la arginina 14 por una cisteína, lo que provoca un cambio de polaridad en el sitio específico de la mutación que afecta la forma en que esta proteína interacciona con otras, incrementando su tendencia a la autoasociación. Por otro lado, en condiciones oxidantes, el nuevo residuo de cisteína expuesto permite la formación de enlaces disulfuro intermoleculares (Stephan et al. 1999; Francis et al. 2000).

Como ya se mencionó, la catarata se produce en el cristalino (Figura 1), el cual es una estructura intraocular, transparente, con morfología de lente biconvexa, situada en el eje

visual, por detrás del iris y suspendida por la zónula que no contiene nervios ni aporte sanguíneo.



**Figura 1:** Estructura del cristalino.

El cristalino, o lente, se nutre a través del humor acuoso y el humor vítreo. Posee una consistencia blanda y elástica, y sufre un progresivo endurecimiento con la edad (Honrubia 2002). Su función es fundamentalmente refractiva, actuando como una lente de dioptrías variables que tiene la habilidad de enfocar la luz en la retina (Fielding et al. 2015). Desempeña un papel esencial en la capacidad de adaptación, permitiendo la percepción nítida a diferentes distancias y la modificación rápida e involuntaria del punto de enfoque. Este fenómeno se logra mediante la alteración de su curvatura para lograr la focalización adecuada de los objetos, ya se encuentren cercanos o distantes. La elasticidad del cristalino le confiere la facultad de modificar su forma, ajustándose así a las diversas distancias focales. El cristalino ostenta una transparencia excepcional que permite el paso ininterrumpido de la luz a través de él, constituyendo un elemento esencial para la obtención de una visión nítida (Rama et al. 2003; Galvis et al. 2008; Artigas 2015). También tiene una función importante como filtro natural de radiación ultravioleta (UV), ya que absorbe una parte significativa de la radiación UV presente en la luz solar antes de que llegue a la retina (Artigas 2015; Fielding et al. 2015). Es uno de los tejidos del cuerpo humano con menos porción de agua en su composición (66 %); asimismo, está compuesto por proteínas y pequeñas cantidades de lípidos, iones inorgánicos, carbohidratos, ácido ascórbico, glutatión y aminoácidos libres (Gum et al. 2007).

Las células del cristalino son fibrilares, se acomodan de manera concéntrica (Figura 1) y no poseen organelos, pues luego de la formación del lente y la expresión de sus

proteínas, inicia la degradación de éstos para garantizar la transparencia del tejido. Por lo tanto, sus proteínas no pueden ser reparadas ni resintetizadas (Donaldson and Lim 2008; Artigas 2015; Fielding et al. 2015).

### 1.1 Proteínas del cristalino

Las proteínas lenticulares suelen agruparse en dos categorías, según su solubilidad en agua: hidrosolubles y no hidrosolubles. La fracción hidrosoluble del cristalino joven da cuenta del 80 % de las proteínas lenticulares y se compone sobre todo de un grupo de proteínas denominadas cristalinas (Sánchez 2009). Las cristalinas son las proteínas más abundantes del cristalino y son termodinámicamente estables (Bloemendal and de Jong 1991; Andley 2007; Sharma and Santhoshkumar 2009). Su función estructural se basa en estar empacadas de un modo estable y ordenado en las células fibrilares del cristalino, de tal modo que permitan que sea un medio transparente a la luz visible (Delaye and Tardieu 1983). Están divididas en tres familias atendiendo a su tamaño molecular, las  $\alpha$ , las  $\beta$  y las  $\gamma$  cristalinas (Figura 2), y están presentes en todos los cristalinos de vertebrados (Hoenders and Bloemendal 1983; Bloemendal and de Jong 1991; Slingsby et al. 2013; Artigas 2015).



**Figura 2:** Representación de la estructura tridimensional de las proteínas  $\alpha$ B-cristalina en azul (PDB: 3L1G), la  $\beta$ B-cristalina en rojo (PDB: 1YTQ) y la  $\gamma$ S-cristalina en verde (PDB: 7N36) empleando el software VMD.

Las  $\alpha$ -cristalinas son las de mayor masa molecular y representan el 50 % o más de las proteínas solubles en los cristalinos de mamíferos. La estructura secundaria de la  $\alpha$ -cristalina incluye muchas láminas  $\beta$  (95 %) y pocas hélices  $\alpha$  (5 %). En la estructura terciaria (Figura 2) se distinguen dos dominios: Dominio N-terminal y Dominio C-terminal

(con un brazo C-terminal expuesto) (Wistow et al. 1981). Por otra parte, la estructura cuaternaria es objeto de controversia y se ha sugerido que podrían existir más de 1000 heterooligómeros distintos de la  $\alpha$  cristalina (Siezen and Hoenders 1979; Bloemendal and Hockwin 1982; de Jong et al. 1998).

Las  $\alpha$ -cristalinas pueden actuar como chaperonas evitando que las proteínas se agreguen cuando son sometidas a distintos tipos de estrés, sea térmico, oxidativo, fotoquímico, u otros. Son consideradas como miembros de la familia de proteínas de tipo choque térmico que las células sintetizan para neutralizar los efectos de la temperatura.

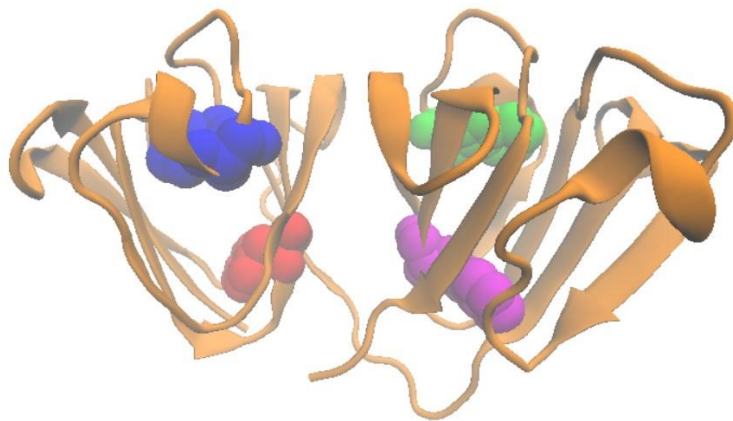
Las  $\beta$ -cristalinas forman agregados de bajo peso molecular (Sánchez 2009) y su estructura secundaria está formada por láminas  $\beta$  (Ortega 2001). La secuencia de aminoácidos de esta familia tiene 30 % de homología con la de la familia de las  $\gamma$ . Ambas,  $\beta$ - y  $\gamma$ -cristalinas, tienen un centro globular que está formado por dos dominios, los cuales están compuestos de cuatro estructuras en forma de hoja beta plegada denominados motivos de llave griega (Figura 2). Estos dominios contienen varios residuos aromáticos altamente conservados (Sean et al. 2013).

Las  $\gamma$ -cristalinas son las proteínas menos abundantes y las de menor peso molecular, son monoméricas y se localizan sobre todo en el núcleo del cristalino. Su estructura secundaria está formada por láminas  $\beta$  (Figura 2). Los dominios de las  $\gamma$ -cristalinas de una misma cadena interaccionan entre sí de modo simétrico, dejando entre ambos un conjunto de residuos hidrofóbicos (Ortega 2001).

Las llamadas cristalinas taxón-específicas, son otro tipo de cristalinas. Muchas de estas son oxidorreductasas que ayudan a mantener el ambiente reductor en el cristalino (Zigler and Rao 1991; Sánchez 2009). Además, hay proteínas citoesqueléticas, de membrana y enzimas. Las proteínas de la membrana, aunque no constituyen más del 1 % del peso del cristalino, son importantes para las funciones del cristalino, participando en procesos de osmorregulación y ayudando a mantener el ambiente intracelular propicio para su función biológica.

## 1.2 Cristalina gamma D humana

Las  $\gamma$ -cristalinas humanas se dividen en siete subgrupos en base a siete genes diferentes que están presentes en el genoma y codifican para cada subgrupo, las  $\gamma$ A-,  $\gamma$ B-,  $\gamma$ C-,  $\gamma$ D-,  $\gamma$ E-,  $\gamma$ F-, y  $\gamma$ S- (Bloemendal et al. 2004). La  $\gamma$ D-cristalina (HgD) es la segunda más abundante en el núcleo del cristalino, se sintetiza en los primeros estadios del desarrollo del lente (White et al. 1989) y presenta una masa molecular de 20,607 Da (Moreau and King 2012). Es codificada por el gen *CRYGD* (Nandrot et al. 2003) y su estructura ha sido resuelta por cristalografía de rayos X (Basak et al. 2003). Es una proteína monomérica, constituida por 173 aminoácidos con ocho hojas beta organizadas en dos motivos de llave griega (Figura 3). Está compuesta por un dominio N-terminal y otro C-terminal conectados entre sí por un *linker* de 10 aminoácidos; contiene dos triptófanos altamente conservados en cada dominio (Trp 42 y 68 en el dominio N-terminal y Trp 130 y 156 en el C-terminal) (Figura 3) (Norledge et al. 1997; Bask et al. 2003). La presencia de estos triptófanos hace que la proteína tenga un máximo de emisión de fluorescencia a 325 nm para el estado plegado y 348 nm para el estado desplegado (Kosinski and King 2002; Chen et al. 2008; Chen et al. 2009).

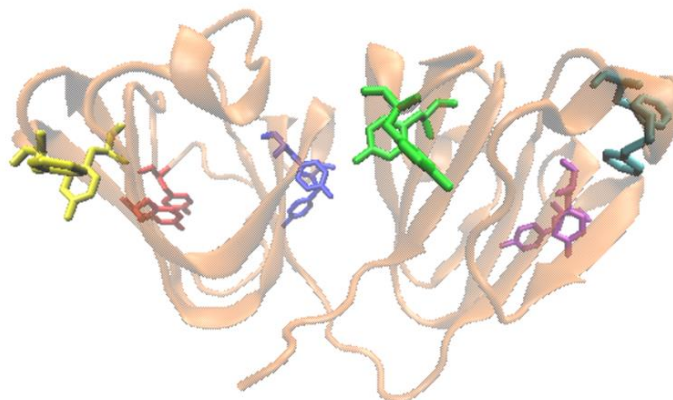


**Figura 3:** Representación de la estructura tridimensional de la proteína HgD (PDB: 1HK0) empleando el software VMD. Se muestra la traza de la cadena principal en listones y, usando esferas, los triptófanos 42 (rojo), 68 (azul), 130 (magenta) y 156 (verde).

Es una proteína altamente estable, con una  $T_m$  cercana a los 80 °C y además presenta un grupo de residuos aromáticos, F11/Y6, Y16/Y28, Y50/Y45, Y92/Y97, Y138/Y133 y F117/F115, distribuidos por toda la proteína que le confieren estabilidad (Figura 4). Por otra parte, presenta varios aminoácidos hidrofóbicos y polares en la interfaz que



conectan a los dominios N- y C-terminal (Kong and King 2011). Diferentes estudios evidencian que estos residuos juegan un papel relevante en el mantenimiento de la conformación nativa de la proteína (Hemmingsen et al. 1994; Basak et al. 2003; Flaugh et al. 2005; Yang et al. 2014; Venda et al. 2016).



**Figura 4:** Representación de la estructura tridimensional de la proteína HgD (PDB: 1HK0) empleando el software VMD. Se muestran los grupos de residuos aromáticos F11/Y6 (amarillo), Y16/Y28 (rojo), Y50/Y45 (azul oscuro), Y92/Y97 (púrpura), Y138/Y133 (verde) y F117/F115 (azul cian).

A pesar de su marcada estabilidad, la proteína HgD puede sufrir modificaciones postraduccionales como la desamidación de sus residuos N49, Q66, Q67 y N160 (Searle et al. 2005; Wilmarth et al. 2006), la metilación de la C110 (Searle et al. 2005) y la oxidación de la Y45 y el W156 (Searle et al. 2005; MacCoss et al. 2002).

### 1.3 Agregación de proteínas

La conformación nativa de una proteína se obtiene cuando se establecen un conjunto de interacciones no covalentes en el proceso de plegamiento, que conlleva a una conformación energéticamente favorable y estable. Durante este proceso de plegamiento se pueden generar conformaciones no deseadas como resultado de interacciones no nativas que incluso podrían ser más estables que las primeras (Eichner and Radford 2011). A pesar de que el estado nativo presenta un mínimo de energía favorable, pueden existir otras conformaciones con mínimos de energía aún más estables, como por ejemplo los agregados no fibrilares o las fibras amiloides (Hartl and Hayer-Hartl 2009; Vabulas et al. 2010; Agbas 2018). De manera general la agregación de las proteínas puede ocurrir como resultado de la asociación física entre moléculas sin

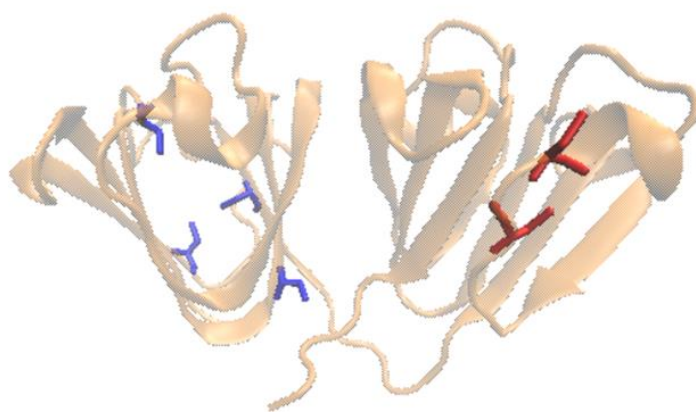
que ocurra un cambio en su estructura primaria o mediante la formación de interacciones covalentes (Finke et al. 2000). Por otra parte, dependiendo del sistema en cuestión y del estado del proceso de agregación puede ocurrir la formación de agregados solubles o insolubles (Darrington and Anderson 1995; Stroo et al. 2017; Nettleton et al. 2000; Mori et al. 2022).

En el caso de la agregación por interacciones físicas, diferentes estudios han demostrado que los intermediarios que se forman durante el desplegamiento o plegamiento de las proteínas son los precursores para la formación de agregados (Fink 1998; Moreau and King 2012; Shamsi et al. 2017). El paso inicial en que una proteína nativa pasa a formar agregados se ha denominado proceso de nucleación y constituye en muchas ocasiones, el paso limitante para la agregación (Wang 2005; Buell 2017). Posteriormente, el crecimiento de estos agregados puede ocurrir por dos vías: mediante la unión de monómeros a multímeros o a través de la unión entre multímeros. La agregación de las proteínas mediante la formación de enlaces covalentes puede ocurrir a partir de la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteínas (Toichi et al. 2013) y otros enlaces como los isopeptídicos (Kang and Baker 2011).

#### **1.4 Agregación de la cristalina gamma D humana**

La HgD es muy estable, aún a altas concentraciones de agentes desnaturizantes, 8 M de urea y 5.5 M de cloruro de guanidinio (Kosinski-Collins 2003). Al desplegarse, primero lo hace el dominio N-terminal y luego el C-terminal. El intermediario con el N-terminal desplegado y el C-terminal plegado presenta un tiempo de vida muy corto y se ha propuesto como el punto de partida para la formación de los agregados por intercambio de dominios (Kosinski-Collins et al. 2004). Este intercambio implica la unión del dominio N-terminal desplegado con el dominio C-terminal plegado de otra molécula de HgD, dando como resultado la formación de un dímero con dominios intercambiados (Das et al. 2011; Garcia-Manyes et al. 2016; Serebryan et al. 2016; Mondal et al. 2020). Esta interacción permite la formación de largas cadenas de oligómeros interconectados, los cuales pueden constituir como precursores de agregación (Bennett et al. 2006; Mondal et al. 2020).

La proteína HgD presenta seis cisteínas, dos en el dominio C-terminal y cuatro en el N-terminal (Figura 5), pero no se forman enlaces disulfuros en su estado nativo (Slingsby et al. 1997; Srikanthan et al. 2004). A pesar de esto, algunos estudios proponen que la agregación en variantes de la HgD, por ejemplo, W130Q y W42Q, está influenciada por conformaciones precursoras que presentan enlaces disulfuros no nativos (Serebryany et al. 2021). En este sentido, se propone que las Cys 32 y Cys 41 son las responsables de formar los puentes disulfuros y por lo tanto son las que más favorecen la agregación (Serebryany and King 2015; Serebryany et al. 2016).



**Figura 5:** Representación de la estructura tridimensional de la proteína HgD (PDB: 1HK0) empleando el software VMD. Se muestran en azul las cisteínas presentes en el dominio N-terminal y en rojo las del C-terminal.

Por otra parte, mutaciones realizadas a los Trps altamente conservados han evidenciado desestabilización del dominio N-terminal sin afectar al C-terminal (Flaugh et al. 2005). Además, si se realizan mutaciones de otros residuos, el efecto depende del dominio donde se encuentra el aminoácido mutado; es decir, si las mutaciones están en el dominio N-terminal se reduce la estabilidad de ese dominio, sin afectar al dominio C-terminal y viceversa. La disminución de la estabilidad da lugar a un incremento en la población de los intermediarios de desplegamiento (Kong and King 2011).

### **1.5 Factores de riesgo para la agregación de cristalinas**

La agregación y precipitación de las cristalinas es un proceso que toma años y que involucra el desplegamiento de las proteínas, la activación aberrante de proteasas de las

células fibrilares y saturación de la función chaperona de la alfa cristalina (Mills et al. 2007; Mizdrak et al. 2008).

Existen múltiples factores de riesgo para el desplegamiento y agregación de las cristalinas. Los más comunes son la exposición a radiación UV, el consumo de tabaco, factores genéticos, algunos fármacos, iones metálicos, entre otros (Hodge et al. 1995; West and Valmadrid 1995; Lam et al. 2015; Langford-Smith et al. 2016). También se ha planteado que algunas enfermedades como la diabetes mellitus pueden acelerar el desarrollo de cataratas (Klein et al. 1994; Lam et al. 2015; Thompson and Lakhani 2015), pues se han reportado alteraciones en los niveles de glutatión, electrolitos, galactosa o glucosa en cristalinos de personas con diabetes y galactosemia. En estos casos, la formación de alcoholes de azúcar a partir de glucosa o galactosa, mediada por la enzima aldosa reductasa, puede tener como consecuencia hiperósmosis en el cristalino, resultando en la hinchazón de las fibras del cristalino, formación de vacuolas y opacidad (West and Valmadrid 1995). También se ha reportado un incremento en la concentración de sorbitol en el cristalino (Srivastava et al. 2005; Patel et al. 2012; Singh Grewal et al. 2016). En estos pacientes, el exceso de glucosa en la sangre activa una vía alternativa que convierte a la glucosa en sorbitol (un alcohol de azúcar) como resultado de la saturación de su vía normal del metabolismo. El sorbitol se acumula en el cristalino, y atrae agua por ósmosis, causando un desbalance osmótico que provoca que las células del cristalino se hinchen y se rompan, alterando su estructura. Este desbalance osmótico también propicia la pérdida de solubilidad de las proteínas que componen el cristalino conduciendo a la formación de cataratas (Lechuga 2006, Díaz-Flores et al. 2004).

La formación de cataratas y el envejecimiento están muy relacionados debido a la acumulación de daños en las proteínas de la lente a lo largo de la vida. Muchos de estos daños incluyen modificaciones postraduccionales que conducen a cambios conformacionales que terminan en la agregación de las proteínas (Takemoto and Sorensen 2008). De los factores de riesgo listados, la exposición a radiación UV es uno de los más graves. Se ha evidenciado en múltiples investigaciones la relación directa entre la exposición a la radiación UV y la formación de cataratas (Delcourt et al. 2000; Roberts 2001; Truscott 2005; Ji et al. 2015).

## 1.6 Radiación ultravioleta como factor de riesgo

La luz ultravioleta (UV) se clasifica en: UV-C (de 100 a 280 nm, longitud de onda corta), UV-B (de 280 a 315 nm, longitud de onda media) y UV-A (de 315 a 380 nm, longitud de onda larga) (Sapkota and Pardhan 2016). Estas radiaciones son emitidas en grandes cantidades por el sol pero no toda la radiación UV incide en la superficie de la Tierra. Toda la radiación UV-C y el 90 % de la UV-B es absorbida por gases como el ozono, vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono, mientras que la radiación UV-A es débilmente absorbida en la atmósfera. Por lo tanto, la radiación UV que alcanza la superficie de la tierra está compuesta en gran parte por la radiación UV-A y en menor grado por la UV-B (González 2007).

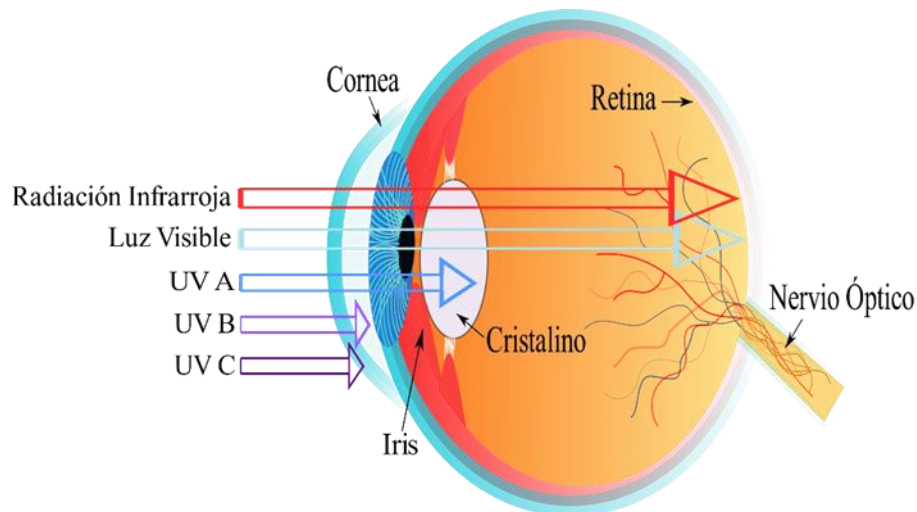
El ojo, después de la piel, es el órgano más expuesto a los efectos de la radiación UV y dicha radiación puede ocasionar problemas o enfermedades en los ojos. El daño causado en la estructura ocular será mayor cuanto más energética sea la radiación. Por esta razón las radiaciones UV (entre 598.13 kJ/mol y 299.07 kJ/mol) son más nocivas que la luz visible (entre 299.07 kJ/mol y 157.40 kJ/mol) o infrarroja (entre 157.40 kJ/mol y 11.96 kJ/mol). La Tabla 1 muestra las lesiones oculares causadas por la exposición a la radiación (Andrade et al. 2003).

**Tabla 1:** Lesiones oculares causadas de acuerdo con el tipo de radiación empleada.

	Ultravioleta			Visible	Infrarrojo		
Tipo de onda	UV-C	UV-B	UV-A				
Longitud de onda (nm)	200	290	320	400	760	1400	10000
Lesión ocular	Queratitis					Cataratas	
	Cataratas					Quemadura Corneal	
	Lesiones de Retina						

Cada uno de los elementos del ojo absorbe un porcentaje de radiación UV (Figura 6). La córnea filtra prácticamente toda la radiación UV-C y UV-B que llega al ojo (Andrade et al. 2003), mientras que la radiación UV-A es absorbida parcialmente por el cristalino (Artigas 2015; Sapkota and Pardhan 2016). Esta radiación que llega al cristalino puede inducir daños, por al menos cuatro mecanismos diferentes: (1) alteración del sistema de transporte de cationes de membrana; (2) daño a los ácidos nucleicos en las células

epiteliales del cristalino; (3) procesos fotosintéticos que involucran especies reactivas de oxígeno, la radiación UV puede generar ROS como el peróxido de hidrógeno a partir del oxígeno molecular; y (4) fotooxidación de triptófanos libres o unidos a proteínas (Hugh 1989).



**Figura 6:** Absorción de la radiación por las diferentes estructuras del ojo.

**(1) Interrupción del transporte de cationes de membrana.** La actividad normal de Na/K ATPasa, la llamada bomba de sodio, es crucial para la claridad del cristalino, ya que mantiene el equilibrio osmótico dentro de las células. Una pérdida de actividad conduce a la inflamación osmótica de las fibras del cristalino (Kinoshita 1974). La Na/K ATPasa es sensible al daño por radiación UV (Pathak et al. 1972; Varma et al. 1979). Se ha determinado su contenido de Trps, siendo 2.1 % para la subunidad alfa y 3.6 % para la beta y algunos de ellos cercanos al sitio activo de la proteína (Peterson and Hokin 1980). Teniendo en cuenta el papel que tienen los Trps ante la exposición a la radiación UV, se ha propuesto que estos Trps sufren daños como resultado de la exposición esta radiación que pueden conducir a la pérdida su actividad (Ottolenghi and Ellorye 1983; Torriglia and Zigman 1988; Hightower 1995). Además, los canales iónicos también pueden sufrir daños como consecuencia del fotodaño que puedan sufrir los Trps así como la fotooxidación de grupos SH; que conducen a su inactivación y provocan la pérdida del control homeostático (Hightower 1995; Hightower and McCready 1997).

**(2) Daño al epitelio del cristalino.** La radiación UV puede dañar el epitelio del cristalino por un efecto directo sobre el ADN, conduciendo a cambios histológicos como falta de

diferenciación. Las células indiferenciadas migran a la superficie posterior del cristalino y causan opacidades posteriores. Adicionalmente, puede provocar daños indirectos sobre el cristalino al alterar la nutrición de la lente o al alterar el papel metabólico y protector del epitelio (Kumar et al. 2012; Artigas 2015; Puerta-Ortiz and Morales-Aramburo 2020).

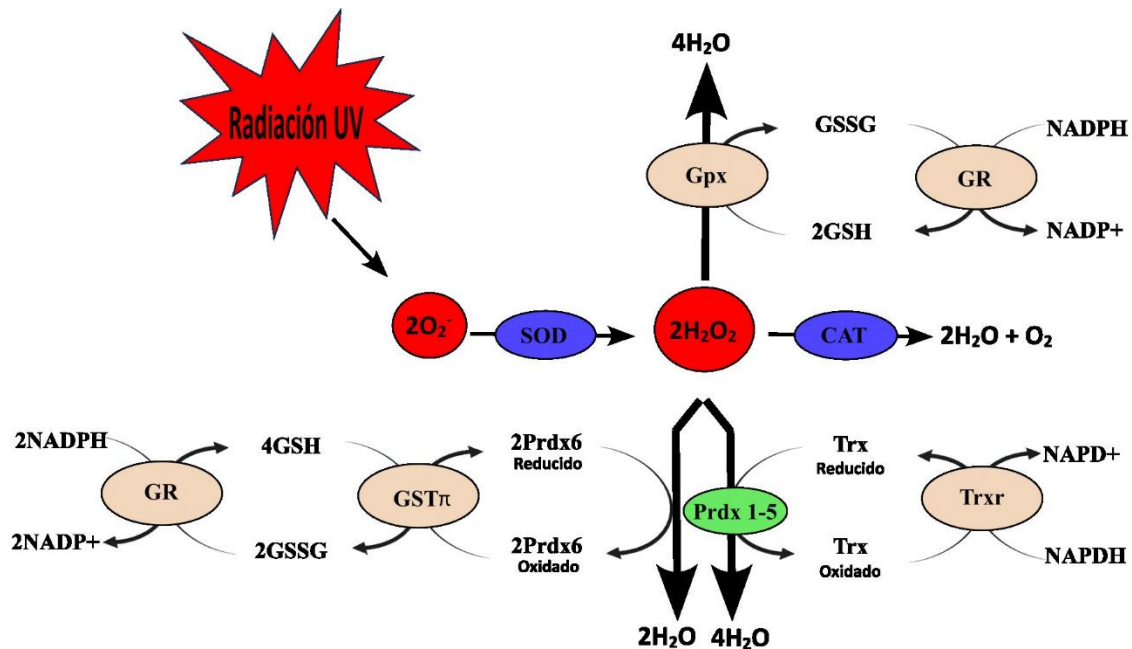
**(3) Procesos fotosintéticos que involucran especies reactivas del oxígeno.** La radiación UV puede generar una serie de oxidantes tóxicos altamente reactivos a partir del oxígeno molecular (Jager et al. 2017). Estos oxidantes incluyen oxígeno singlete, superóxido y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales provocan oxidación de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Imbert et al. 2012).

El cristalino se encuentra en un ambiente rico en fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno, que se producen por la exposición crónica a la luz lo cual induce la actividad patogénica de las células epiteliales del cristalino. El mantenimiento de la transparencia del cristalino depende de un adecuado balance del estado redox. Aunque existen múltiples defensas fisiológicas para proteger al cristalino de los efectos tóxicos de la luz y el daño oxidativo, la evidencia sugiere que la exposición crónica a la oxidación a largo plazo puede dañarlo y predisponerlo al desarrollo de cataratas (Ferrer et al. 2009).

Si bien, la concentración de oxígeno en el cristalino es baja (Wan-Cheng and Spector 1997; McNulty et al. 2004; Wang et al 2009), la formación de especies reactivas de oxígeno inducida por la radiación puede ocurrir a través de la interacción directa de un fotón con el oxígeno molecular (Truscott 2005; Marchitti et al. 2011; Varma et al. 2012; Ivanov et al. 2018) o mediada por la transferencia de electrones provenientes del estado excitado de residuos aromáticos como el triptófano o la tirosina (Truscott 2005; Pattison et al. 2012). El radical libre de oxígeno es inestable y reactivo, lo que conduce a oxidación de componentes celulares. Algunos ejemplos de este daño oxidativo incluyen daño a las membranas celulares del cristalino (Varma et al. 1979), lo cual conlleva a la pérdida de la función de los transportadores en la membrana. Esto va asociado con el descenso en la concentración de ATP, cambio en las concentraciones iónicas, oxidación del glutatión, inicio en la oxidación proteínica en el citoplasma, entre otras. Estos cambios

desencadenan la formación de agregados proteínicos, la ruptura de las membranas celulares y la formación de cataratas (Spector 1984).

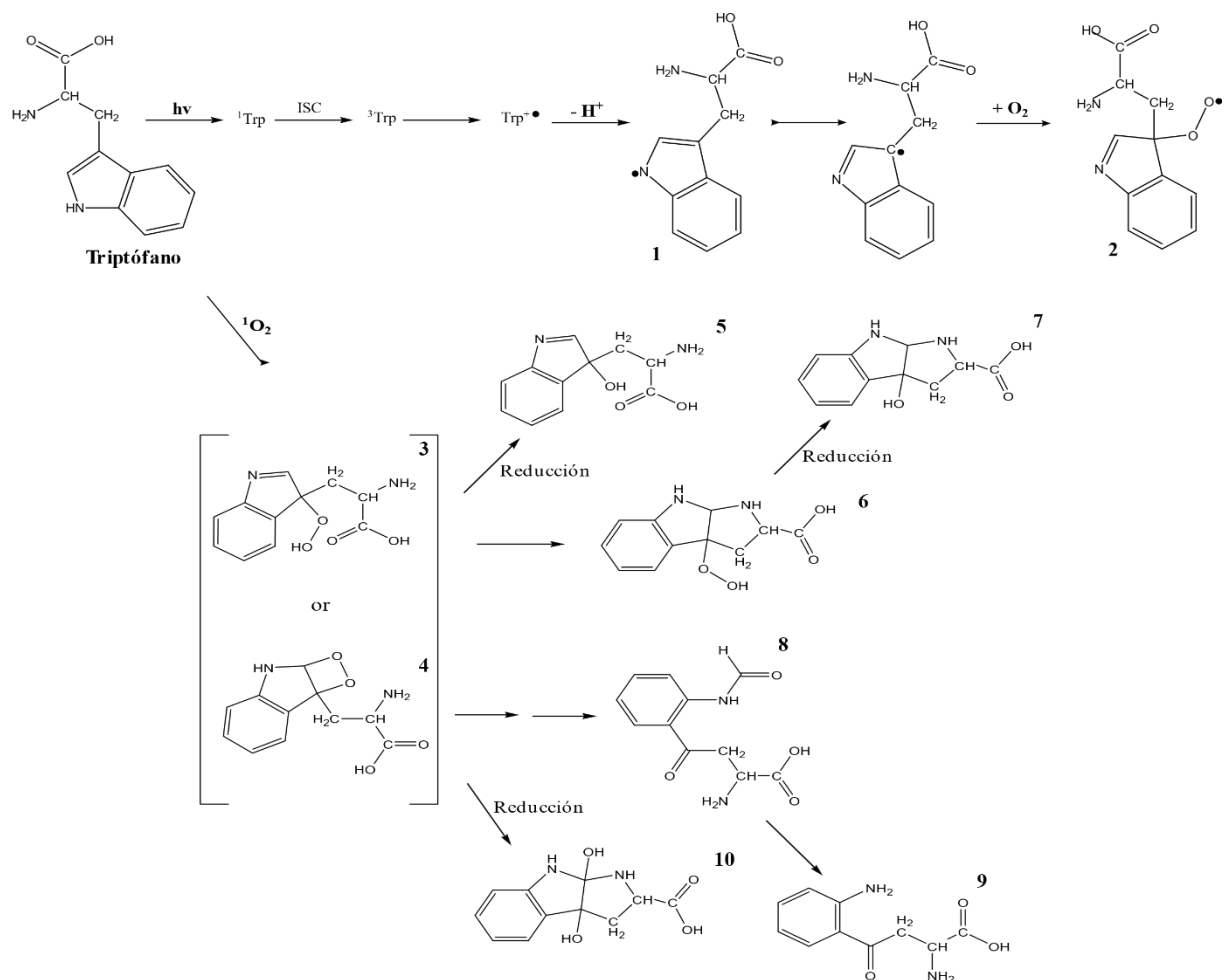
Dentro de las enzimas específicas que previenen el daño causado por estas especies se encuentra la catalasa, la cual cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Figura 7). Sin embargo, esta enzima se inactiva por la exposición a la radiación UV (Zigman et al. 1976; Zigman 1985).



**Figura 7:** Enzimas y antioxidantes que participan en el balance del estado redox. SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, Gpx: glutatión peroxidasa, GSSG: glutatión oxidado, GSH: glutatión reducido, GR: glutatión reductasa, GSTpi: glutatión S-transferasa pi, Prdx: peroxirredoxina, Trx: tiorredoxina, Trxr: tiorredoxina reductasa. Esquema tomado y modificado de Hamada et al. 2014 y de Rao 2023.

**(4) Fotooxidación de aminoácidos.** Las proteínas del cristalino contienen residuos fotosensibles, principalmente el triptófano. Se ha sugerido que la fotooxidación del triptófano inducida por radiación UV puede ser un paso crítico que inicia cambios en las proteínas del cristalino. Se ha demostrado que el triptófano libre de la lente puede oxidarse al igual que una porción de los triptófanos que son parte de la estructura primaria de las cristalinas (Heyningen 1973; Hugh 1989; Dillon and Atherton 1990; Berman 1991; Korlimbinis and Truscott 2006; Mizdrak et al. 2008; Pattison et al. 2012). El mecanismo de fotooxidación se describe en la Figura 8, y se observa que la oxidación sigue caminos diferentes si ocurre en presencia o ausencia de oxígeno molecular.



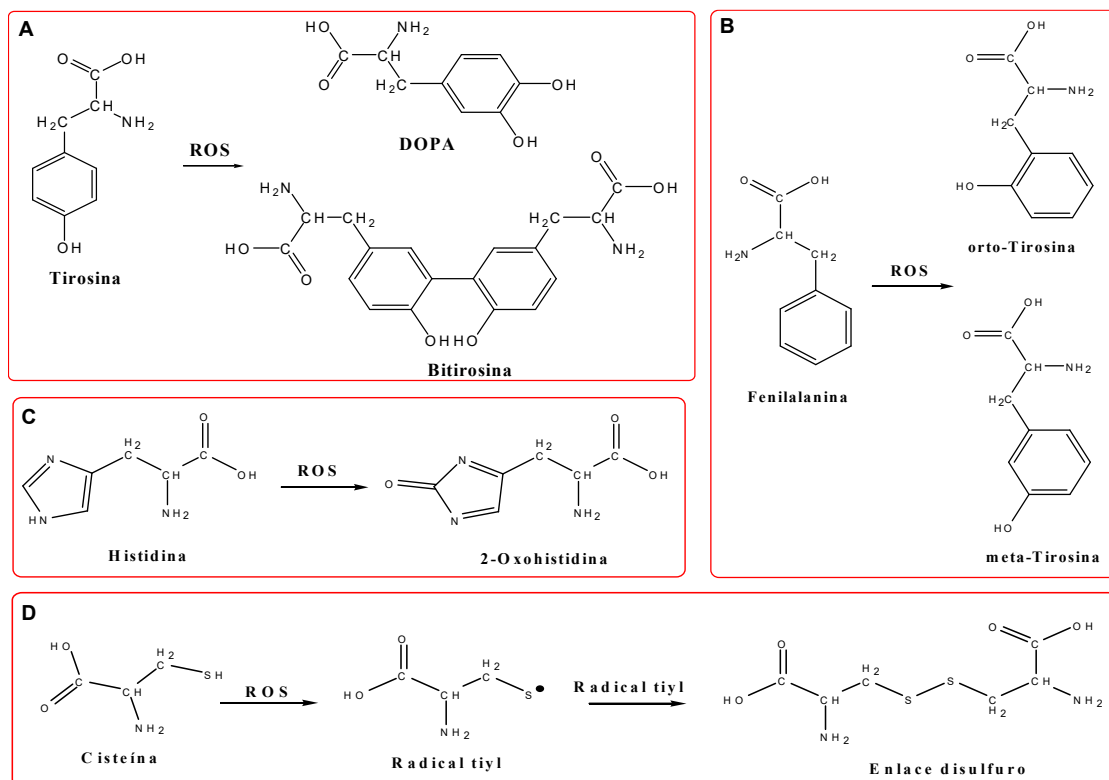


**Figura 8:** Mecanismo de fotooxidación del triptófano por absorción directa de la radiación UV y vías mediadas por  $^1\text{O}_2$ . Estructuras claves del mecanismo: **1:** radical indolilo, **2:** C-3 hidropéroxido, **3:** C-3 hidropéroxido, **4:** intermedio de dioxetano, **5:** C-3 alcohol, **6:** 3 $\alpha$ -hidropéroxipirrolindol, **7:** 3 $\alpha$ -hidroxipirrolindol, **8:** N-formilquinurenina, **9:** quinurenina; **10:** 3 $\alpha$ -dihidroxipirrolindol. ISC: cruce entre sistemas. Esquema tomado y modificado de Pattison et al. 2012.

La absorción de un fotón por un residuo de triptófano promueve la excitación de electrones de su cadena lateral. A temperatura ambiente, el estado excitado puede promover varios procesos: i) tomar parte en una reacción de fotoionización, ii) emitir un fotón, o bien, iii) perder su excitación debido a un mecanismo de apagamiento (Chen et al. 2008; Chen et al. 2009).

El apagamiento de la fluorescencia de los triptófanos acorta el tiempo de vida del estado excitado minimizando la probabilidad de fotoionización UV (Chen et al. 2006). La fotoionización consiste en la escisión covalente del anillo indol; este proceso es irreversible e induce cambios conformacionales en las proteínas (Chen et al. 2009).

La radiación también puede inducir daños en otros aminoácidos como la tirosina, generando radicales. Los radicales de Tyr pueden conducir a reacciones de oxidación y formación de dímeros de tirosina (Pattison and Davies 2006; Pattison et al. 2012). La fenilalanina también puede formar radicales libres (Bent and Hayon 1975; Pattison et al. 2012). Estos aminoácidos no solo pueden sufrir fotoionización directa por la radiación UV, sino también pueden sufrir fotooxidación mediada por especies reactivas de oxígeno (Figura 9). Además de los aminoácidos aromáticos, otros aminoácidos como la histidina, la cisteína y la metionina son vulnerables a la oxidación por especies reactivas de oxígeno (Figura 9) (Creed 1984; Schfneich 2005; Huvaere and Skibsted 2009; Pattison et al. 2012).



**Figura 9:** Oxidación de aminoácidos inducida por ROS. Oxidación de tirosina (A), fenilalanina (B), histidina (C) y cisteína (D). Adaptado de Stadtman and Levine 2003; Quiney et al. 2011; Kim et al. 2015.

La agregación de cristalinina inducida por fotooxidación, mediada por especies reactivas de oxígeno o no, se ha estudiado ampliamente. Estudios *in vivo* en lentes de modelos animales con absorción de la radiación UV similar a los lentes humanos, mostraron la agregación de proteínas solubles, la aparición de péptidos de bajo peso molecular, y un incremento en los niveles de proteínas insolubles. Además, se observó un cambio en las

propiedades fluorescentes de las cristalinas debido a una disminución del contenido de triptófanos y se evidenció un aumento en la fluorescencia de otros fluoróforos (Muranov et al. 2011; Moran et al. 2013; Schafheimer and King 2013). Por otra parte, se ha reportado que la agregación de cristalinas es inducida por la formación de oxígeno singlete, que oxida regiones de la cristalina y además causa daños en enzimas del cristalino como la aldehído deshidrogenasa, gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, poliol deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa y la glutatión reductasa (Jedziniak et al. 1987; Frederik 1991). Esta oxidación también ocurre por fotooxidación directa del triptófano (Dillon et al. 1976; Goosey et al. 1980; Frederik 1991). Las proteínas oxidadas son más ácidas y tienen propiedades químicas distintas. Las familias de cristalinas más afectadas son las  $\alpha$ , seguidas por las  $\beta$  y finalmente las  $\gamma$  (Ortega 2001).

Las proteínas  $\alpha$ -cristalinas actúan como chaperonas moleculares y previenen la agregación de proteínas estructurales (Artigas 2015). Algunos autores han propuesto que los fragmentos derivados de las cristalinas oxidadas pueden interferir en la actividad chaperona de las alfa cristalinas incrementando la cantidad de proteínas insolubles. Además, estos fragmentos peptídicos pueden actuar como anti-chaperonas que se unen a las proteínas parcialmente desplegadas o dañadas, promoviendo su agregación (Sean et al. 2013).

Las beta cristalinas, pueden sufrir daños en su estructura como resultado de la exposición a la radiación UV. La radiación UV provoca la pérdida de la estructura nativa tridimensional de las beta cristalinas y conduce a la formación de agregados (Ostrovsky et al. 2002; Sergeev et al. 2005; Muranov et al. 2011). Además, algunos aminoácidos como metioninas y triptófanos pueden sufrir oxidación (Muranov et al. 2011). La fotooxidación de los triptófanos de estas proteínas conduce a la formación de N-formilquinurenina y especies relacionadas (Andley and Clark 1989). Las beta cristalinas, como las  $\beta 2$  y  $\beta 3$  después de su exposición a la radiación UV, pueden sufrir la ruptura de los puentes salinos de superficie, así como la oxidación de cisteínas a ácido cisteico (Andley and Clark 1989).

Las gamma y las beta cristalinas tienen una estructura con dos dominios de llave griega y cada dominio posee dos triptófanos orientados hacia el interior de la proteína. En la

HgD se ha determinado, a partir de mutantes simples de cada triptófano, que los triptófanos 42, 68, 130 y 156 poseen eficiencias cuánticas diferentes. La eficiencia cuántica de W42F (0.13 +/-0.01) y W130F (0.17 +/-0.02) es mayor que la eficiencia cuántica de la HgD (0.058 +/-0.006); mientras que W68F (0.0076 +/-0.0008) y W156F (0.0099 +/-0.001) tienen una eficiencia cuántica menor que la de HgD (Chen et al. 2006; Chen et al. 2009). Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de la proteína es menor de lo que se esperaría al estar los cuatro Trps presentes. Esto se debe a que la fluorescencia del Trp 42 está apagada por el Trp 68 y la fluorescencia del Trp 130 está apagada por el Trp 156. Así, en el estado nativo, la fluorescencia de los triptófanos de HgD y HgS está eficientemente apagada por transferencia electrónica habilitada electrostáticamente a una amida de cadena principal de los aminoácidos vecinos (Chen et al. 2006). Esta desactivación del estado excitado minimiza la ruptura del anillo de Trp (Chen et al. 2009).

A pesar de este mecanismo protector, la exposición prolongada a la radiación UV termina por inducir fotooxidación y agregación, pues los daños que sufre la estructura nativa de las proteínas conducen al desplegamiento parcial o total resultando en precursores para la formación de agregados (Dobson 2003; Xie et al. 2012). Por ejemplo, luego de exponer a HgD a radiación UV-B por 6 horas, se observa la oxidación de Trps y subsecuentemente la ruptura de enlaces peptídicos por migración de radicales desde las cadenas laterales de los residuos aromáticos hacia la cadena principal (Sean et al. 2013). También se ha descrito que la exposición prolongada a la radiación UV puede provocar la formación de enlaces disulfuro y la exposición de residuos hidrofóbicos, haciendo a las proteínas más propensas a la agregación. Los agregados formados durante los tiempos cortos de exposición a la radiación UV pueden sufrir una sobre-agregación, es decir, a partir de estos agregados pequeños se pueden formar agregados más grandes (Xie et al. 2011). Por otro lado, si bien existen pocos reportes de la formación de fibras amiloides en cataratas, se ha observado su formación *in vitro* en cristalinas bajo condiciones de pHs ácidos o fotooxidación (Papanikolopoulou et al. 2008; Moran et al. 2012). El mecanismo propuesto de formación de fibras amiloides involucra cambios conformacionales que conducen a la pérdida de la conformación nativa de llave griega (Schafheimer et al. 2014).

En este trabajo se exploró el efecto de dosis bajas de radiación UV-A en la proteína HgD, para observar los daños y cambios iniciales inducidos por la fotooxidación. Además, se evaluó el papel protector de los Trps en la HgD. Teniendo en cuenta que los mecanismos de apagamiento de la fluorescencia son muy sensibles a cambios en la conformación y el número de Trps (Chen et al. 2009), es importante entender los mecanismos de fotoionización y de apagamiento de la proteína.

## **2. HIPÓTESIS**

Los triptófanos de la proteína HgD son esenciales para evitar el daño inducido por la exposición a radiación UV y evitan la agregación de HgD.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el papel de los triptófanos en la agregación de la proteína HgD inducida por radiación UV-A.

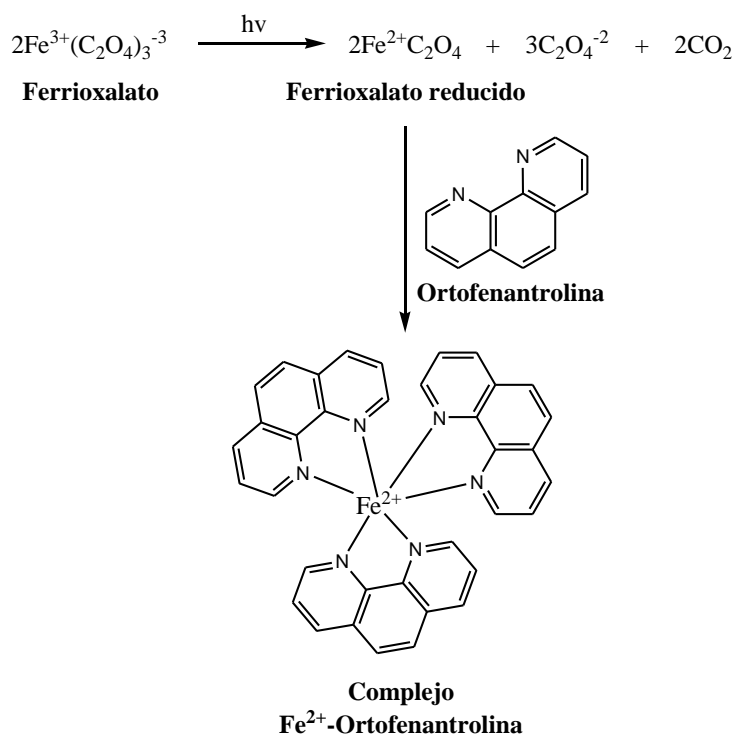
### **3.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la intensidad de la luz emitida por la lámpara de luz ultravioleta y elegir la dosis óptima para el estudio.
2. Sobreexpresar y purificar la proteína HgD y sus variantes de triptófano.
3. Evaluar las cinéticas de agregación inducida por radiación UV de las proteínas.
4. Evaluar cambios en la estructura secundaria de las proteínas luego de exponerlas a radiación UV.
5. Evaluar la presencia de modificaciones covalentes en la proteína HgD luego de someterla a diferentes dosis de radiación UV-A.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Determinación de la intensidad de la luz emitida por la lámpara ultravioleta.

Para determinar la cantidad de fotones de una lámpara UV se cuantificó la fotoreducción del ferrioxalato de potasio al complejo Fe(II)-ortofenantrolina, por exposición a radiación UV de 302 nm (Figura 10) (Parker 1953; Castillo-Rojas 2007).



**Figura 10.** Mecanismo de fotoformación del complejo Fe(II) con ortofenantrolina.

Para la reacción se prepararon las siguientes disoluciones

**A:** 50 mL de ácido sulfúrico 0.2 M.

**B:** 25 mL de ortofenantrolina a 0.15 % (P/V).

**C:** 40 mL de acetato de sodio 1.8M y 4 mL de ácido sulfúrico 0.2 M.

**D:** 25 mL de ferrioxalato de potasio 0.23 mM con 15 mL de ácido sulfúrico 0.2 M.

Como blanco se utilizó una mezcla de 1 mL de la disolución D, 2 mL de C y 1 mL de B, la celda se tapó con *parafilm*, se agitó manualmente y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 min. Las muestras se prepararon adicionando 1 mL de la solución D a una celda, se irradió por 1 min, se le adicionaron 2 mL de C y 1 mL de B, se tapó y agitó

manualmente, se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 min, se colectó un espectro de absorción entre 340 y 900 nm. El procedimiento se repitió en muestras recién preparadas, irradiando por 2, 3, 4 y 5 minutos. Este ensayo se realizó en un espectrofotómetro Genesis UV-Vis Biomate 160, a velocidad media e intervalo de medición de 1 nm y se utilizaron celdas de metacrilato. Como fuente de radiación UV, se empleó una lámpara de mercurio de 302 nm, la muestra se colocó a 21 cm de la lámpara en una caja negra, sin entrada de luz externa. El ensayo se realizó por triplicado.

Usando el coeficiente de extinción molar del complejo Fe(II)-ortofenantrolina,  $\epsilon=11836$  L/mol•cm, 1 cm de paso óptico y las absorbancias a 510 nm, se calculó la concentración del complejo y a partir de éstas y con la ecuación (1) se calculó la intensidad de la lámpara. En la ecuación  $\phi$  es el rendimiento cuántico de formación del complejo a la longitud de onda de trabajo ( $\phi=1.23$ ), el t es el tiempo de irradiación y Na es el número de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$  moléculas/mol).

$$I_{radiación} = \frac{[Fe^{2+}]}{\phi * t} * Na \quad (1)$$

#### 4.2 Sobreexpresión de HgD y sus variantes.

Se partió de plásmidos pQE-1 subclonados con el gen de la HgD y con la secuencia de genes con sustituciones simples de cada triptófano de la HgD por fenilalanina (W42F, W68F, W130F, W142F). Estos plásmidos fueron donados por el Dr. Jonathan King y se enviaron a secuenciar para verificar su secuencia. La HgD y sus variantes se expresaron en *Escherichia coli* BL21(DE3)-RIL, resistentes a cloranfenicol. La transformación de las células con el plásmido le confiere además resistencia a la ampicilina.

La transformación se realizó adicionando 1  $\mu$ L de plásmido a 100  $\mu$ L de células de *E. coli* BL21(DE3)-RIL, se dejó reposar por 30 min en hielo. Para la permeabilización fueron incubadas a 44 °C por 90 segundos e inmediatamente se pusieron en hielo durante 2 minutos. Luego se agregaron 200  $\mu$ L de medio YT2x y se incubó a 250 rpm y 37 °C por 1,5 h. Luego se plaquearon 40  $\mu$ L de las células transformadas en una caja Petri con agar LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y 30  $\mu$ g/mL de cloranfenicol, la caja se incubó por 16 horas a 37 °C.



Del cultivo anterior, se tomó una colonia y se inoculó 1 L de cultivo LB con 100 µg/mL de ampicilina y 30 µg/mL de cloranfenicol, se incubó a 200 rpm y 37 °C hasta que se alcanzó una densidad óptica de ~0.9 a 600 nm. Para inducir la sobreexpresión de las proteínas se utilizó 1 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), se incubó toda la noche a 25 °C y 200 rpm. Luego, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm y 4 °C por 30 min, se decantó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 40 mL de buffer 10 mM de acetato de amonio, 50 mM de cloruro de sodio y pH 7.2. Finalmente, las células se congelaron súbitamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

### **4.3 Purificación de HgD y sus variantes.**

Las células se descongelaron y sonicaron a una amplitud de 30 %, 1 min en ON y 5 min en OFF por 1 h hasta 10 repeticiones en un Ultrasonic Processor vibra cell™. Las células sonicadas se centrifugaron a 11855 rpm por 45 min a 4 °C en la centrífuga Beckman Coulter™. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó sulfato de amonio con agitación constante a 4 °C, hasta alcanzar una concentración de 30 % P/V, se dejó en agitación a 4 °C por 15 min. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 17000 g y 4 °C por 20 min. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio, hasta alcanzar una concentración de 50 % P/V y se dejó agitando a 4 °C por 15 min. El botón se recuperó por centrifugación a 17000 g y 4 °C por 20 min. Luego se resuspendió en 10 mL de *buffer* 10 mM de acetato de amonio y 50 mM de cloruro de sodio a pH 7.2. Se realizó una última centrifugación a 17000 g y 4 °C por 20 min. Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 µm y se aplicó en una columna de exclusión molecular Superdex™ 200 equilibrada con *buffer* 10 mM de acetato de amonio y 50 mM de cloruro de sodio a pH 7.2. En cada paso descrito se tomaron muestras y se analizaron por SDS-PAGE al 14 %. La concentración de las proteínas se determinó con los coeficientes de extinción molar a 280 nm, 41200 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> para HgD, 37735 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> para las cuatro variantes de la proteína. Los coeficientes de extinción se calcularon en el servidor Expasy (<https://www.expasy.org/>).

### **4.4 Cinéticas de agregación**

Se evaluaron las cinéticas de agregación inducidas por radiación UV a diferentes concentraciones de HgD y diferentes tiempos de exposición a la luz. Se probó la proteína

a 50  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  en *buffer* 10 mM de acetato de amonio y 50 mM de cloruro de sodio a pH 7.2. Además, se irradió durante 30 min, 15 min, 10 min y 5 min. Una vez estandarizadas las condiciones de concentración de proteína y tiempo de exposición a la radiación, las variantes de Trp se analizaron a una concentración 25  $\mu\text{M}$  y 15 minutos de irradiación.

Además, se evaluó el papel del oxígeno en el daño inducido por la radiación. Para esto, las muestras se prepararon en atmósfera inerte. Se prepararon las proteínas a 25  $\mu\text{M}$  en *buffer* 10 mM de acetato de amonio y 50 mM de cloruro de sodio a pH 7.2 en una celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm, completamente hermética. Las muestras se sometieron a 5 ciclos de burbujeo de nitrógeno gaseoso de alta pureza por 1 min y 1 min de vacío. Luego, se irradió la muestra por 15 min.

Las cinéticas de agregación se evaluaron siguiendo el aumento en la turbidez a 405 nm, sin agitación y 37 °C durante toda la noche en celdas de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

El orden de la reacción se determinó asumiendo el modelo más simple de un monómero (M) convirtiéndose en un oligómero (A). Se construyeron las gráficas  $[A]$  vs  $t$ ;  $\ln[A]$  vs  $t$ ; y  $1/[A]$  vs  $t$  para observar la tendencia y determinar el orden de la reacción. En todos los casos  $[A]$  es la medida de turbidez y  $t$  es el tiempo en minutos.

Las cinéticas se ajustaron a la ecuación de Boltzmann o a un incremento exponencial, dependiendo de la tendencia. Con este ajuste se determinaron las constantes de velocidad y los tiempos de vida media. Todas las cinéticas se corrieron por triplicado, además se realizó un análisis de probabilidad usando la distribución de  $t$  de Student.

#### **4.5 Evaluación de cambios en la estructura secundaria.**

La estructura secundaria de las proteínas irradiadas con UV y sin irradiar se evaluó por dicroísmo circular. Se utilizó una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico y una concentración 25  $\mu\text{M}$  de proteína en *buffer* 10mM de acetato de amonio y 50 mM de cloruro de sodio a pH 7.2. Las mediciones se realizaron desde 190 hasta 250 nm en un espectropolarímetro JASCO 1500. Se usó un ancho de banda de 10nm y una velocidad

de 100 nm/seg. Se utilizó el servidor BeStSel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) para la deconvolución de los datos de elipticidad.

#### **4.6 Evaluación de cambios conformacionales.**

Para evaluar si la radiación UV induce desplegamiento de las proteínas, se evaluaron sus espectros de emisión en un espectrómetro de luminiscencia AMINCO-Bowman Serie 2. Se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y una concentración 25  $\mu$ M de proteína en *buffer* 10 mM de acetato de amonio y 50 mM de cloruro de sodio a pH 7.2.

Las proteínas se irradiaron con dosis sucesivas de 15 min por 2 h. Cada 15 minutos se colectó un espectro de fluorescencia, excitando a 295 nm y colectando espectros de emisión entre 300 nm y 500 nm.

#### **4.7 Evaluación de cambios covalentes**

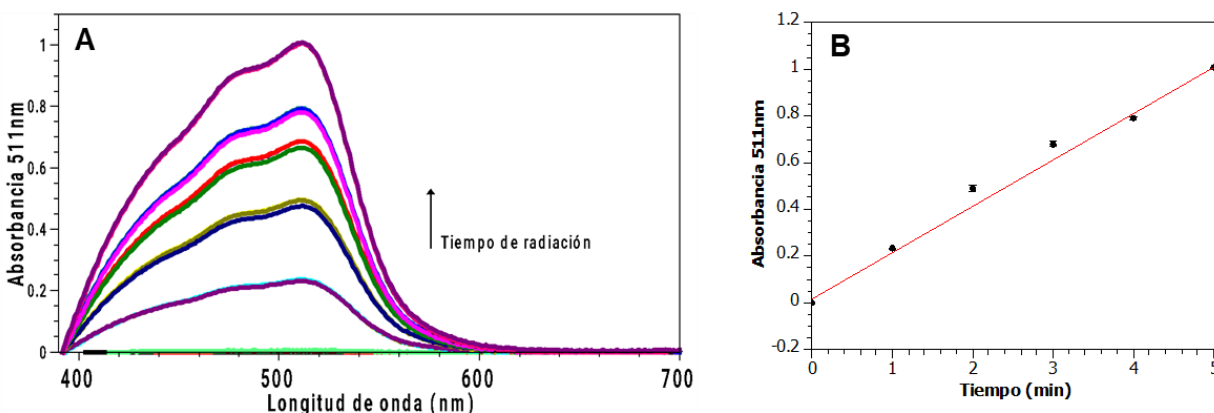
Para determinar si la radiación UV indujo fotoionización, 2 mL de la proteína HgD a una concentración 25  $\mu$ M en *buffer* 10 mM de acetato de amonio y 50 mM de cloruro de sodio a pH 7.2 se irradió a 302 nm, con dosis sucesivas de 15 min por 1 h. Cada 15 minutos se tomó una alícuota de la muestra y se colectó un espectro de masas para determinar el ion molecular. Los espectros se colectaron en un espectrómetro de masas LC-MS 1-Orbitrap Velos Thermo Scientific, acoplado a un Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 RSLC Nano System Flow Software para determinar la masa molecular. Antes de colectar el espectro, la muestra se desaló con una microcolumna C18, Z720046 Millipore® Ziptips. Se realizó la deconvolución automática y se determinó la masa molecular utilizando el algoritmo Xtract, Xcalibur, Thermo Scientific.

Posteriormente se irradió el volumen remanente de las muestras en presencia de oxígeno y en atmósfera inerte por 15 min. Se usaron 30  $\mu$ L de cada muestra y se les realizó el mismo procedimiento que la muestra sin irradiar para desalar, secar y determinar la masa molecular. Se realizaron repeticiones de la exposición a 15 min de radiación UV seguidos del desalado y determinación hasta alcanzar la acumulación de 1 h de exposición para ambas condiciones (presencia de oxígeno y atmósfera inerte). Los espectros de masas fueron adquiridos en una ventana de *full scan*  $m/z$  350-2000, 60000 resolución.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Determinación de la intensidad de la luz emitida por la lámpara UV.

La determinación de la intensidad de la lámpara es importante pues permite cuantificar la dosis de radiación a la que se expone una muestra por unidad de tiempo. Los espectros de fotoformación del complejo Fe(II)-ortofenantrolina se muestran en la Figura 11. Se observa el crecimiento de la banda de absorción alrededor de 511 nm a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta. Las concentraciones del complejo formado se calcularon con la ecuación de Lambert-Beer y se muestran en la Tabla 2. A partir de estas concentraciones se calculó la intensidad de emisión de la lámpara UV y el valor obtenido fue de  $1.52 \cdot 10^{17} \pm 1.33 \cdot 10^{16} \left(\frac{\text{quantum}}{\text{cm}^3 \cdot \text{s}}\right)$ .



**Figura 11:** Espectros de absorción de la formación del complejo Fe(II)-ortofenantrolina con diferentes tiempos de exposición (A). Gráfica de absorbancia a 511 nm contra el tiempo de radiación de ferrioxalato para formar el complejo (B).

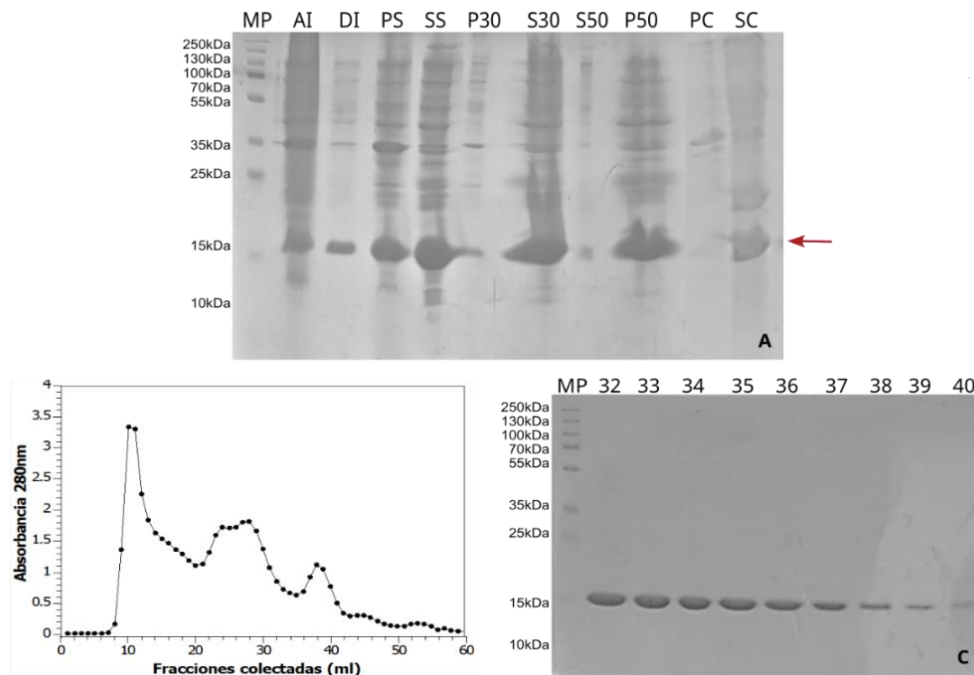
**Tabla 2:** Concentraciones del complejo Fe(II)-ortofenantrolina.

Tiempo de radiación (s)	Absorbancia a 511 nm	$[Fe^{2+}] = \frac{A_{511nm}}{\epsilon \cdot l}$
0	0.002 +/-0.003	$2.24 \cdot 10^{-7}$
60	0.234 +/-0.002	$1.97 \cdot 10^{-5}$
120	0.489 +/-0.012	$4.13 \cdot 10^{-5}$
180	0.679 +/-0.012	$5.74 \cdot 10^{-5}$
240	0.789 +/-0.007	$6.66 \cdot 10^{-5}$
300	1.006 +/-0.002	$8.50 \cdot 10^{-5}$

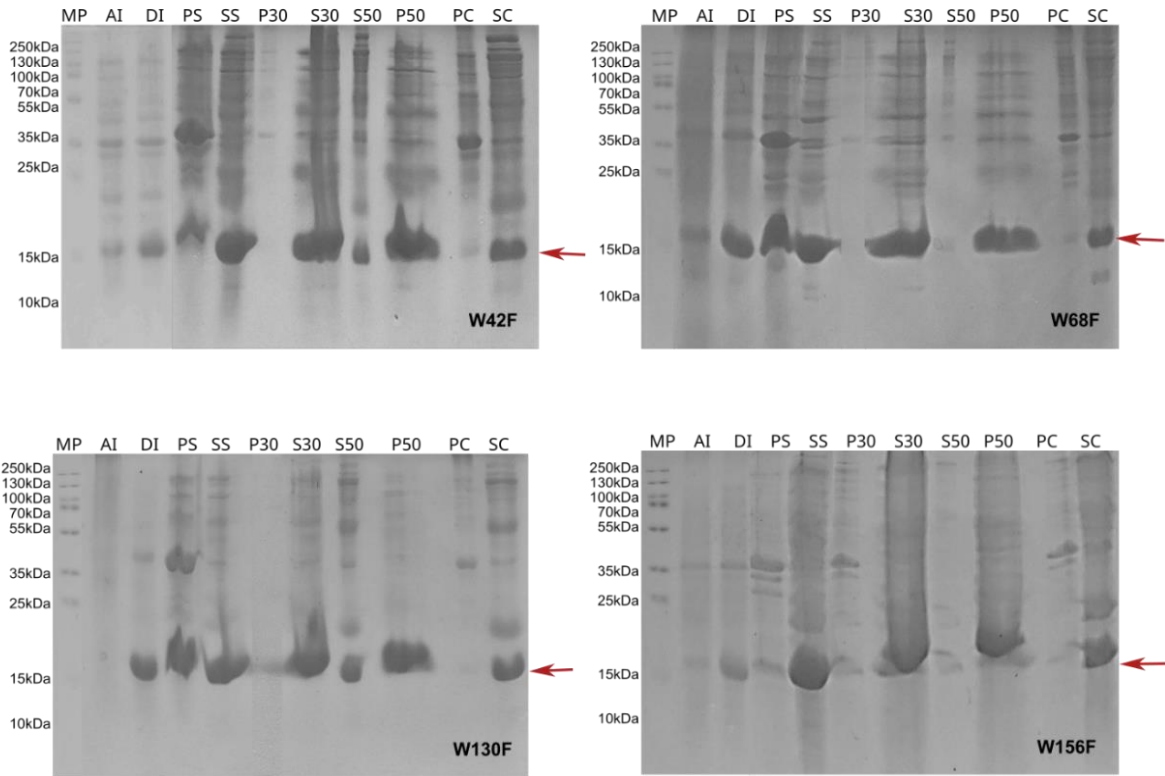
## 5.2 Sobreexpresión y purificación de HgD y sus variantes.

En la Figura 12A se muestran SDS-page para evaluar la sobreexpresión, la lisis y la precipitación con sulfato de amonio de la proteína HgD. Es claro que la proteína se sobreexpresa bien y con buen rendimiento. El último carril del gel se aplicó en la columna de exclusión molecular (Figura 12B) y se evaluó la pureza de la proteína también por medio de un SDS-page (Figura 12C). Se puede observar que la proteína se obtiene pura y en cantidad suficiente para realizar los experimentos posteriores.

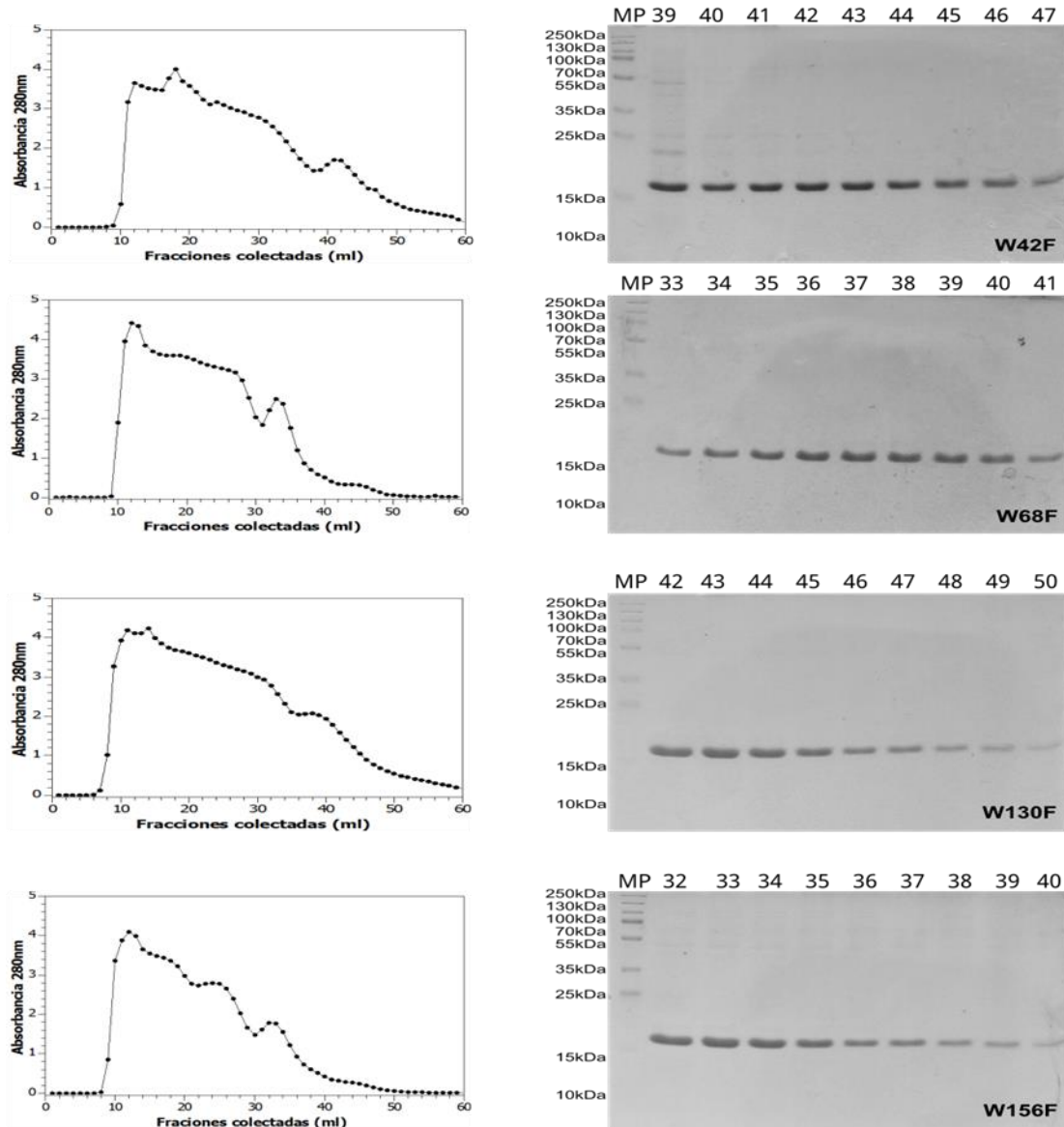
Para las mutantes de Trp también se observaron sobreexpresiones y lisis exitosas (Figura 13). Además, se obtuvieron todas las proteínas puras y en concentración suficiente para realizar los experimentos (Figura 14).



**Figura 12:** (A): SDS-PAGE al 14 % de la sobreexpresión y precipitación de HgD. Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden; MP: marcador de peso molecular; AI: antes de inducir; DI: después de inducir; PS: botón del sonicado; SS: sobrenadante del sonicado; P30: botón con 30 % sulfato de amonio; S30: sobrenadante con 30 % sulfato de amonio; S50: sobrenadante con 50 % sulfato de amonio; P50: botón con 50 % sulfato de amonio; PC: botón de P50 luego de resuspender y centrifugar; SC: sobrenadante de PC luego de resuspender y centrifugar. (B) Cromatograma de la elución de SC. (C) SDS-PAGE de las últimas fracciones eluidas en la columna de exclusión molecular; los números en el gel indican la fracción cromatográfica.



**Figura 13:** SDS-PAGE al 14 % de la sobreexpresión y precipitación de las mutantes de triptófano. Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden; MP: marcador de peso molecular; AI: antes de inducir; DI: después de inducir; PS: botón del sonicado; SS: sobrenadante del sonicado; P30: botón con 30 % sulfato de amonio; S30: sobrenadante con 30 % sulfato de amonio; S50: sobrenadante con 50 % sulfato de amonio; P50: botón con 50 % sulfato de amonio; PC: botón de P50 luego de resuspender y centrifugar; SC: sobrenadante de PC luego de resuspender y centrifugar.

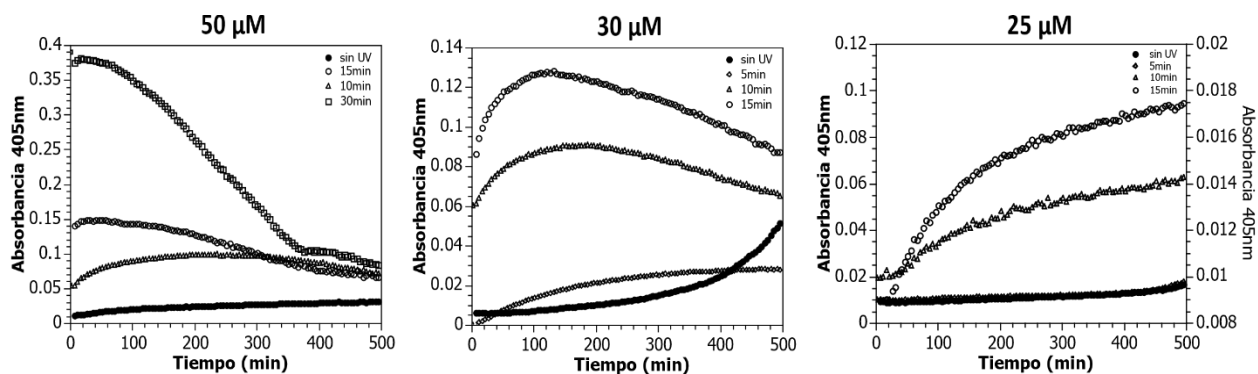


**Figura 14:** Purificación de las mutantes de Trp. Cromatograma de exclusión molecular de las fracciones colectadas en la purificación de W42F, W68F, W130F y W156F (Paneles de la Izquierda). Electroforesis SDS-PAGE de las últimas fracciones cromatográficas (Paneles de la derecha).

### 5.3 Optimización de los parámetros de las cinéticas de agregación.

Con el fin de encontrar las condiciones en las que se observen las cinéticas completas, desde el tiempo cero, se probaron diferentes concentraciones de proteína y diferentes tiempos de irradiación. Se inició con 50  $\mu\text{M}$  de HgD irradiada durante 10, 15 y 30 minutos. En la Figura 15 se observa que, con estas condiciones, al iniciar la colecta de datos, la cinética está en la fase final y sólo se observa la fase de decaimiento, que corresponde a la sedimentación de los agregados. Para obtener los datos iniciales de la cinética, se

bajó la concentración de la proteína a 30  $\mu\text{M}$  y se irradió por 5, 10 y 15 minutos (Figura 15), sólo la condición de 5 minutos de irradiación permitió ver el inicio de la agregación. Finalmente, se probó la proteína a una concentración 25  $\mu\text{M}$  y tiempos de irradiación de 5, 10 y 15 minutos. En este caso la condición de irradiación por 15 minutos mostró el mejor comportamiento en la cinética, por lo que se escogió para realizar las cinéticas de todas la mutantes. Este tiempo de irradiación equivale a  $1.37 \cdot 10^{20}$  quantum/cm<sup>3</sup>.



**Figura 15:** Cinéticas de agregación de HgD. Cinéticas a diferentes tiempos de irradiación y diferentes concentraciones de proteína.

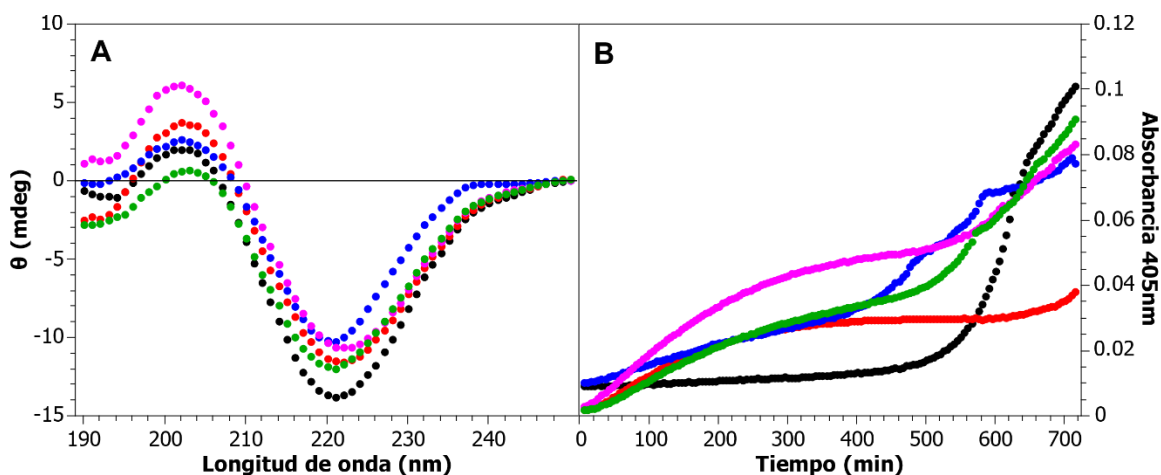
#### 5.4 Efecto de las mutaciones en la estructura secundaria y la cinética de agregación de las proteínas.

Para evaluar el efecto de la sustitución de un Trp por Phe en las posiciones 42, 68, 130 y 156 de HgD, se colectaron espectros de dicroísmo circular. Se puede observar en la Figura 16 que todos los espectros presentan una señal negativa cercana a los 220 nm y una señal positiva alrededor de 205 nm, características de estructuras ricas en hojas beta. Además, el análisis de deconvolución indica que los porcentajes de estructura secundaria no varían (Tabla 3). Por lo tanto, la sustitución de cualesquiera de los Trp por Phe no induce cambios en la estructura secundaria de HgD.

Por otra parte, la comparación de las cinéticas de agregación de HgD y las mutantes de Trp sin irradiar muestran que la cinética de agregación de HgD presenta una tendencia sigmoideal y se mantiene soluble hasta 500 min. Las mutantes, por el contrario, presentan cinéticas con tendencia exponencial y comienzan a agregarse desde los primeros minutos. Esto indica que la sustitución de cualesquiera de los Trps en las posiciones mencionadas en el párrafo anterior hace que la proteína sea más propensa a la agregación, siendo la sustitución de los Trp 130 y 156 los que inducen



mayores efectos en este sentido.

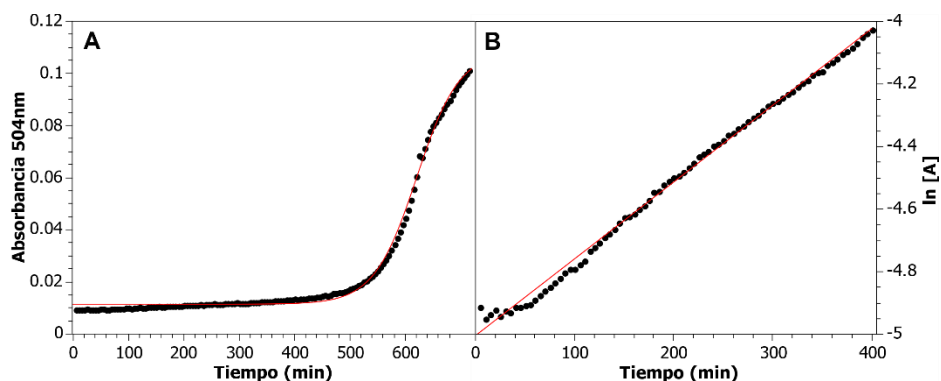


**Figura 16:** (A) Espectros de dicroísmo circular y (B) Cinéticas de agregación por turbidez de las proteínas HgD (negro), W42F (rojo), W68F (azul), W130F (magenta) y W156F (verde).

**Tabla 3:** Porcentaje de estructura secundaria de las proteínas estimados por BeStSel a partir de los espectros de dicroísmo circular.

Proteína	% de estructura secundaria estimada		
	Hoja $\beta$ antiparalela	Giro	Otras
HgD	42.3	13.2	44.4
W42F	41.8	13.6	44.7
W68F	42.8	13.2	44.0
W130F	43.7	13.5	42.8
W156F	41.1	13.5	45.4

Las cinéticas se ajustaron a la ecuación de Boltzman ( $A_{\max} + (A_{\min} - A_{\max}) / (1 + \exp((t - t_{1/2})/dt))$ ) o a la de decaimiento exponencial ( $A_{\max} + A \cdot \exp(-t/t_{1/2})$ ), según el caso, para estimar los valores de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del monómero y las constantes de velocidad de agregación (Figura 17A); además se analizó el orden de la cinética de agregación. Se asumió una reacción elemental en la cual el reactivo inicial es el monómero (M) y el producto de la reacción es el agregado (A). En este caso, se midió, por turbidez, cómo se forma A. Al graficar  $\ln[A]$  vs  $t$  (Figura 17B) se obtuvo una tendencia lineal, por lo tanto, las cinéticas de agregación son de primer orden.



**Figura 17:** Gráfico representativo del ajuste de Boltzmann (A) para determinar el tiempo de vida medio y (B) ajuste  $\ln[A]$  vs  $t$  para determinar el orden de la reacción de las cinéticas obtenidas.

La Tabla 4 muestra el promedio de los valores del tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del monómero y de las constantes de velocidad de agregación ( $k$ ) obtenidos para cada proteína sin exposición a radiación UV. El mayor  $t_{1/2}$  se obtuvo para la HgD; todas las mutantes presentaron  $t_{1/2}$  significativamente menores que HgD y  $k$  significativamente mayores.

**Tabla 4:** Valores cinéticos de la agregación de las proteínas sin irradiar.

Proteínas	$t_{1/2}$ (min)	$k$ ( $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )
HgD	$594.96 \pm 34.89$	$1.17 \pm 0.07$
W42F	$214.91 \pm 34.77^{***}$	$3.28 \pm 0.53^{**}$
W68F	$306.53 \pm 83.99^{**}$	$2.39 \pm 0.69^*$
W130F	$93.46 \pm 4.65^{***}$	$7.43 \pm 0.36^{***}$
W156F	$104.64 \pm 28.22^{***}$	$6.92 \pm 0.16^{**}$

\*Diferencias estadísticamente significativas entre HgD y las mutantes de Trp ( $p \leq 0.05$ )

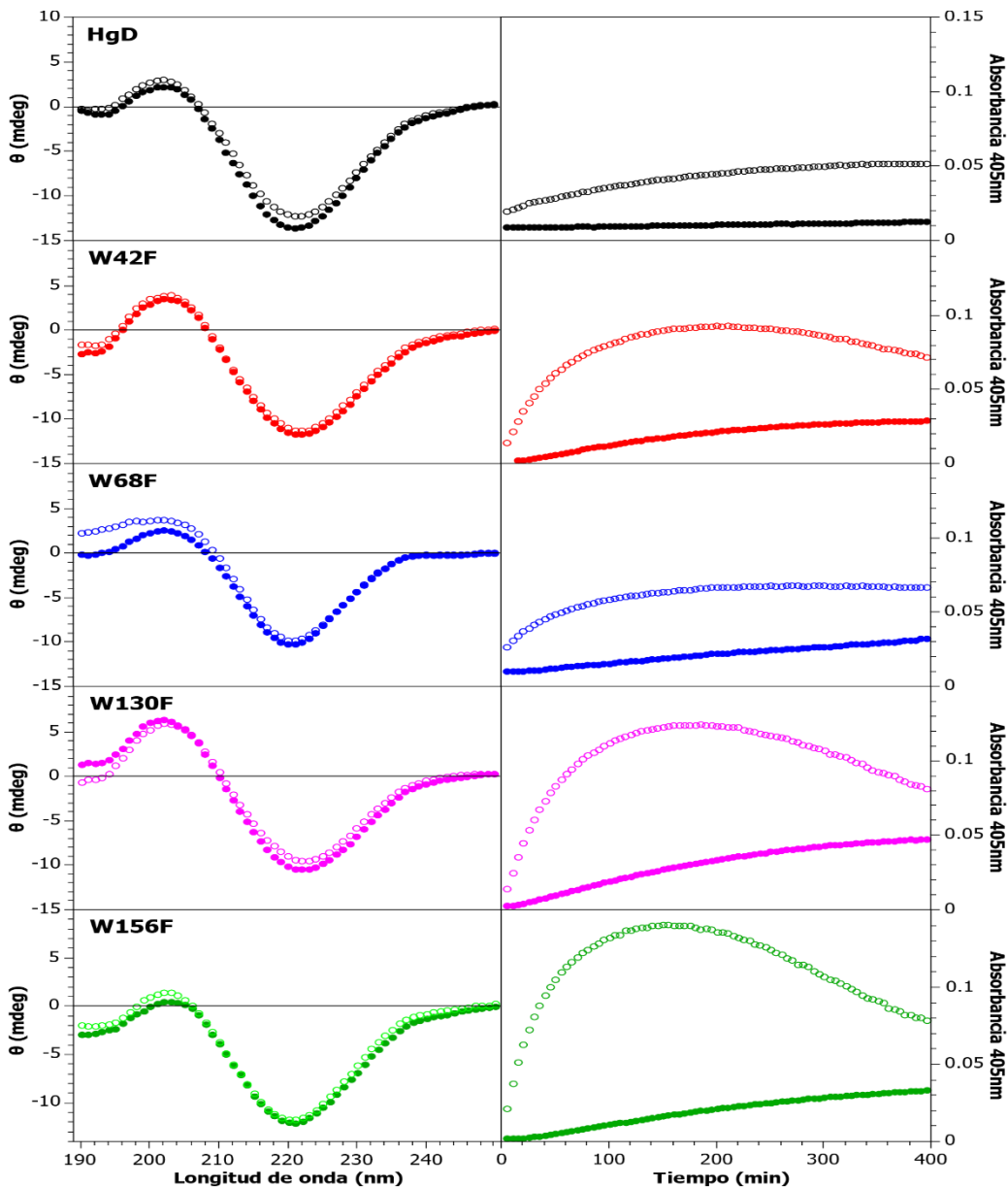
\*\*Diferencias estadísticamente muy significativas entre HgD y las mutantes de Trp ( $p \leq 0.01$ )

\*\*\*Diferencias estadísticas extremadamente significativas entre HgD y las mutantes de Trp ( $p \leq 0.001$ )

## 5.5 Efecto de la radiación UV en la estructura secundaria y la cinética de agregación de las proteínas.

En la Figura 18 se muestran los espectros de dicroísmo circular de las proteínas luego de ser irradiadas por 15 minutos. Se siguen observando las bandas características de estructura rica en hojas beta, una señal negativa cercana a 220 nm y una señal positiva alrededor de 205 nm. La deconvolución de los espectros (Tabla 5) indica que las proteínas no sufren cambios en estructura secundaria inmediatamente después de ser irradiadas.

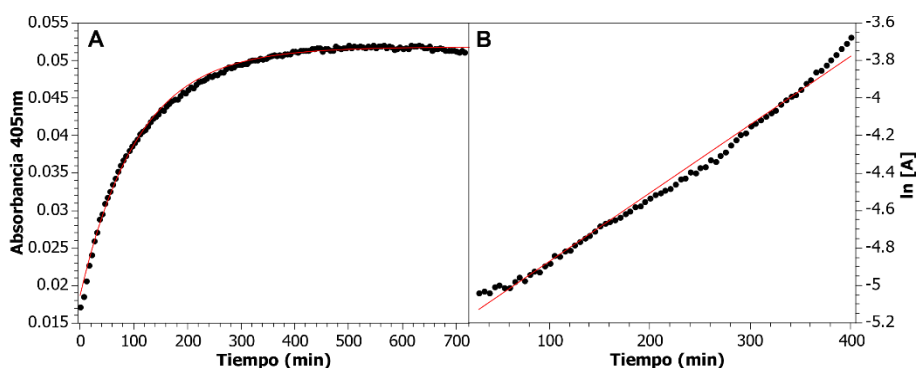
Por otra parte, luego de irradiar a las proteínas por 15 minutos, las cinéticas de agregación se aceleraron comparadas con las cinéticas de las proteínas sin irradiar (Figura 18), pues los valores del tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) son significativamente más bajos y las constantes de velocidad significativamente mayores (Tabla 6). Los cambios más grandes se observan para las mutantes W130F y W156F. A pesar de las diferencias descritas, todas las cinéticas son de primer orden (Figura 19).



**Figura 18:** Espectros de dicroísmo circular (paneles a la izquierda) y cinéticas de agregación (paneles a la derecha) de las proteínas sin irradiar y luego de su exposición a 15 min de radiación UV. Los círculos llenos se corresponden a las proteínas sin irradiar y los círculos vacíos a las proteínas irradiadas.

**Tabla 5:** Porcentaje de estructura secundaria de las proteínas sin irradiar e irradiadas, estimado en BeStSel.

Proteínas	% de estructura secundaria estimada		
	Hoja $\beta$ antiparalela	Giro	Otras
HgD sinRUV	42.3	13.2	44.4
HgD RUV	42.5	13.5	44.1
W42F sinRUV	41.8	13.6	44.7
W42F RUV	43.0	13.4	43.6
W68F sinRUV	42.8	13.2	44.0
W86F RUV	43.3	13.1	43.5
W130F sinRUV	43.7	13.5	42.8
W130F RUV	44.7	13.8	41.5
W156F sinRUV	41.1	13.5	45.4
W156F RUV	42.7	13.3	44.1



**Figura 19:** Gráfico representativo del ajuste de decaimiento exponencial de la cinética de agregación de HgD (A) para determinar el tiempo de vida media y la constante de velocidad; (B) ajuste  $\ln[A]$  vs  $t$  para determinar el orden de la cinética de una de las réplicas de HgD. No hay corrección debido a la dispersión de la luz.

**Tabla 6:** Valores cinéticos de la agregación de las proteínas irradiadas y sin irradiar.

Proteínas	$t_{1/2}$ (min)		$k$ ( $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )	
	Sin irradiar	Irradiada	Sin irradiar	Irradiada
HgD	594.96 $\pm$ 34.89	121.75 $\pm$ 11.52**	1.17 $\pm$ 0.07	5.73 $\pm$ 0.51**
W42F	214.91 $\pm$ 34.77	63.70 $\pm$ 28.51*	3.28 $\pm$ 0.53	12.18 $\pm$ 4.37
W68F	306.53 $\pm$ 83.99	60.07 $\pm$ 10.93*	2.39 $\pm$ 0.69	11.80 $\pm$ 2.20*
W130F	93.46 $\pm$ 4.65	45.30 $\pm$ 7.21*	7.43 $\pm$ 0.36	15.54 $\pm$ 2.28*
W156F	104.64 $\pm$ 28.22	39.67 $\pm$ 10.53*	6.92 $\pm$ 1.67	18.24 $\pm$ 4.35*

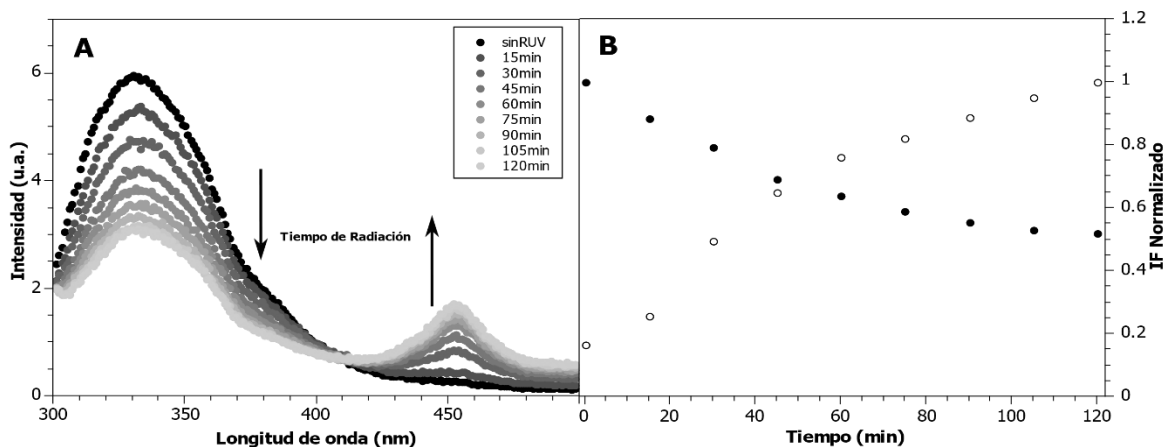
\*Diferencias estadísticamente significativas entre HgD y las mutantes de Trp ( $p \leq 0.05$ )

\*\*Diferencias estadísticamente muy significativas entre HgD y las mutantes de Trp ( $p \leq 0.01$ )

## 5.6 Efecto de la radiación UV en la estructura terciaria de las proteínas.

Para evaluar si la radiación induce cambios en el plegamiento de las proteínas, se colectó el espectro de fluorescencia de los Trp luego de irradiar a las proteínas a UV desde 15 minutos hasta 2 horas. El máximo de fluorescencia reportado para HgD en estado plegado es de 325 a 330 nm y 350 a 360 nm en el estado desplegado (Kosinski and King 2002; Chen et al. 2006). La Figura 20A muestra los cambios en el espectro de fluorescencia de HgD, es claro que a medida que aumenta la dosis de radiación, el máximo de emisión no se mueve, lo que indica que la radiación no induce cambios en el ambiente químico de los Trps. Sin embargo, se observa un decaimiento en la intensidad de fluorescencia y la aparición de una nueva banda de emisión a 452 nm. Esto sugiere que el Trp se fotooxida en otro compuesto que fluoresce.

Las intensidades de las dos bandas de emisión se normalizaron y se graficó la tendencia de crecimiento de la señal a 452 nm y el de decaimiento de la señal a 330 nm, contra el tiempo de exposición a la radiación (Figura 20B). Las dos tendencias se interceptan en  $t_{in} = 45$  minutos. Esto se puede interpretar como que, a los 45 minutos de exposición a la radiación, la mitad de la población de HgD permanecerá en su estructura nativa y el otro 50 % formará el nuevo compuesto.

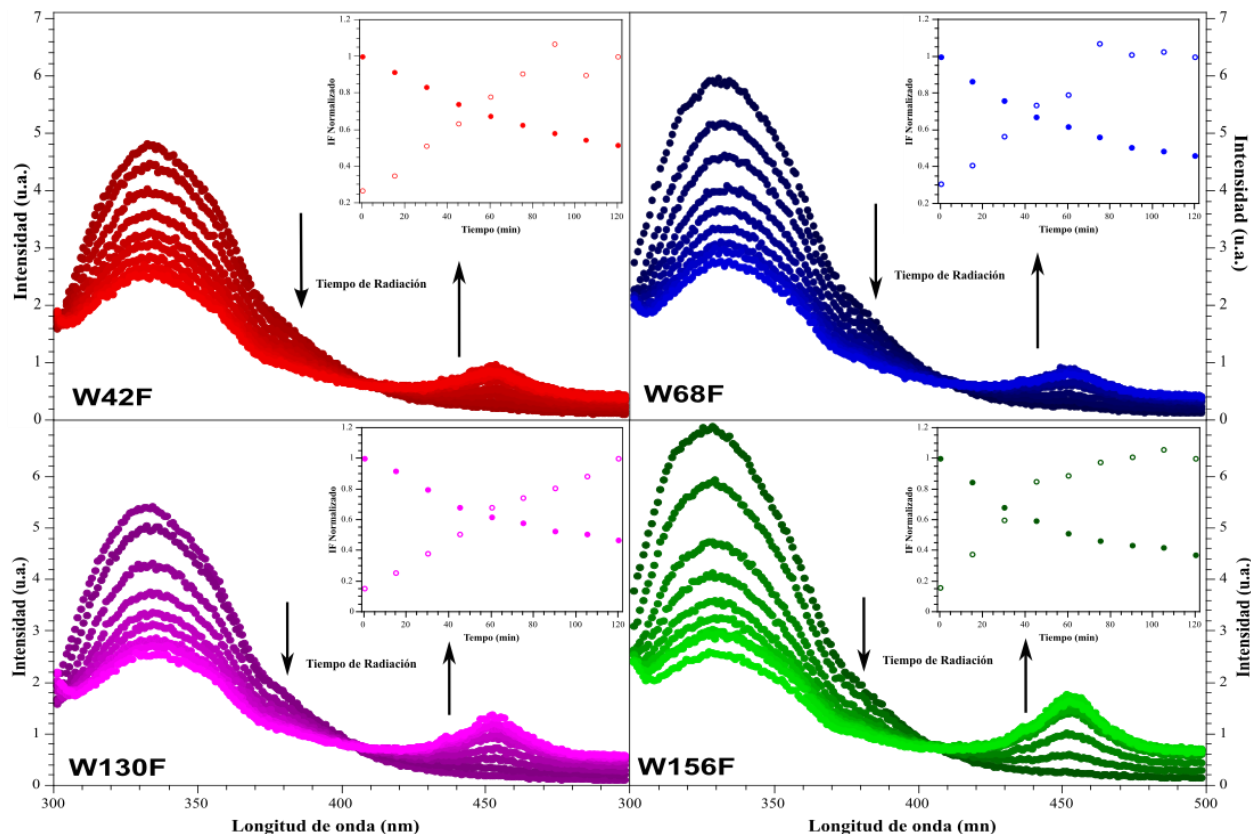


**Figura 20:** Espectros de emisión de fluorescencia de HgD con diferentes dosis de radiación (A). Tendencia de los máximos de emisión contra el tiempo (B).

Los espectros de fluorescencia de las mutantes de Trp (Figura 21) presentan su máximo de emisión alrededor de 330 nm y luego de ser irradiadas por 15 minutos hasta 2 h, no muestran corrimiento de su máximo a menores energías. Pero, al igual que HgD, presentan disminución en la intensidad de emisión y la aparición de una nueva banda de

emisión a 452 nm. Lo que indica que, en las mutantes, el Trp también se fotooxida y forma otro compuesto fluorescente.

Para las mutantes W42F y W68F, las gráficas de las tendencias de crecimiento de la señal a 452 nm y decaimiento de la señal a 330 nm, contra el tiempo (Figura 21) se interceptan en  $t_{in} = 45$  minutos, al igual que HgD. Pero, para las mutantes W130F y W156F presentan  $t_{in}$  de 60 min y 30 min, respectivamente.



**Figura 21:** Espectros de emisión de fluorescencia de las mutantes de triptófano con diferente dosis de radiación. El recuadro dentro de cada panel muestra la tendencia de los máximos de emisión a  $\sim 330$  nm (círculo lleno) y  $\sim 452$  nm (círculo vacío).

El cociente  $IF_{330}/IF_{452}$  (Intensidad de fluorescencia de la señal a 330 nm/ intensidad de fluorescencia de la señal a 452 nm) puede dar información sobre la estequiometría de decaimiento del precursor, en este caso el Trp, y la formación del nuevo fluoróforo. Esta estequiometría es indicativa de qué tanto debe decaer la intensidad a 330 nm (intensidad del precursor) para que ocurra un incremento en la intensidad a 452 nm (intensidad de fotoproducto) correspondiente a la formación de este fotoproducto. El cociente de HgD es 2, lo que indica que requiere que el precursor decaiga dos veces su intensidad para

que se obtenga un incremento en la intensidad del nuevo fluoróforo. Para W130F y W156F el cociente es 3, es decir que se requiere que el precursor decaiga 3 veces en intensidad para obtener la interconversión al fotoproducto. Las mutantes W42F y W68F tienen cocientes de 4 y 6, por lo que requieren un mayor decaimiento del precursor para lograr dicha interconversión. Por lo tanto, la proteína HgD es la más eficiente para generar fotoproductos, seguida por las mutantes W130F y W156F.

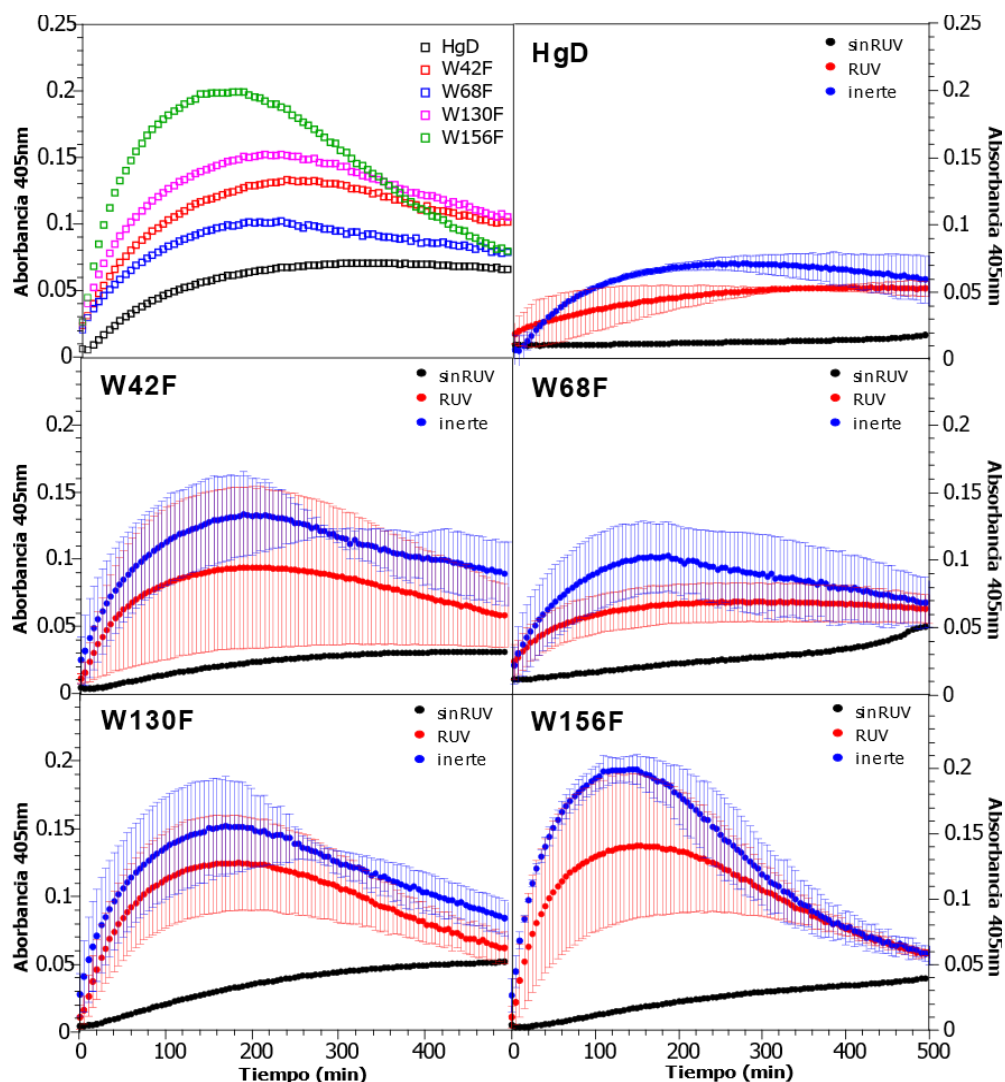
### 5.7 Efecto de la radiación UV en la cinética de agregación de las proteínas en ausencia de oxígeno.

Dado que se observó la formación de fotoproductos, se evaluó el papel del oxígeno en esta fotooxidación, por lo que se repitieron las cinéticas de agregación inducidas por radiación UV, en atmósfera inerte. La Figura 22 muestra las cinéticas de agregación para las proteínas HgD y las mutantes de Trp en las condiciones descritas. La tendencia de las cinéticas en atmósfera inerte es muy parecida a la de las cinéticas en presencia de oxígeno, los tiempos de vida media y las constantes de velocidad no cambian significativamente entre estas dos condiciones (Tabla 7) y tampoco lo hace el orden de la reacción.

**Tabla 7:** Valores cinéticos de la agregación inducida por radiación UV de HgD y sus mutantes de triptófano.

Proteínas	t $\frac{1}{2}$ (min)		Valor p*	k (10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> )		Valor p*
	Con oxígeno	Sin oxígeno		Con oxígeno	Sin oxígeno	
<b>HgD</b>	121.75 ±11.52	78.57 ±22.47	0.16	5.73 ±0.51	9.40 ±3.07	0.22
<b>W42F</b>	63.70 ±28.51	66.42 ±7.26	0.87	12.18 ±4.37	10.53 ±1.22	0.53
<b>W68F</b>	60.07 ±10.93	64.02 ±18.17	0.83	11.80 ±2.20	11.36 ±2.80	0.89
<b>W130F</b>	45.30 ±7.21	52.16 ±7.72	0.13	15.54 ±2.28	13.49 ±2.02	0.16
<b>W156F</b>	39.67 ±10.53	35.34 ±4.58	0.63	18.24 ±4.35	19.82 ±2.40	0.68

\*análisis t-student comparando cada proteína irradiada en presencia y ausencia de oxígeno

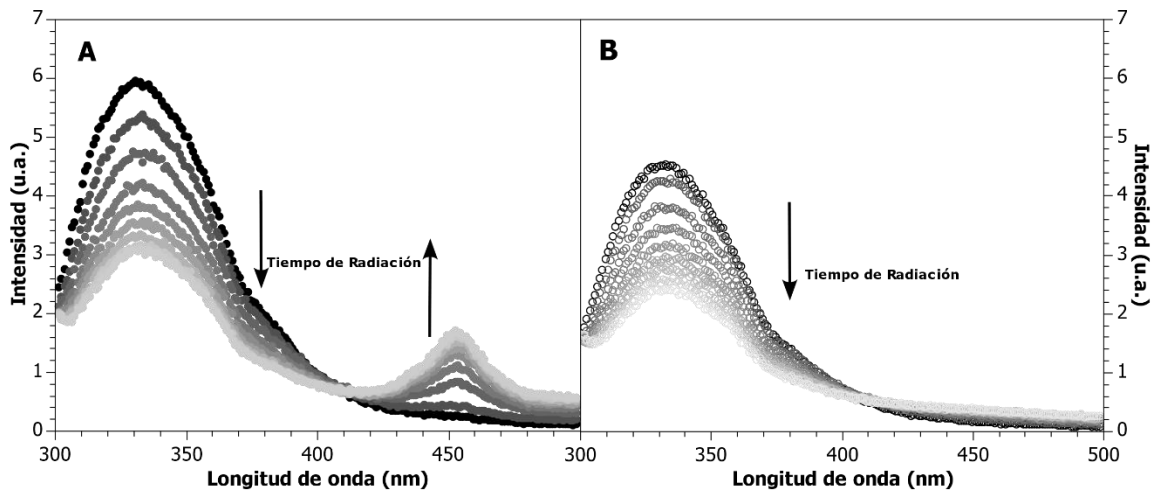


**Figura 22:** Cinéticas de agregación de la HgD y sus variantes de Trp sin radiación ultravioleta y luego de aplicarles 15 min de radiación UV en presencia y ausencia de oxígeno. Se muestran en círculos llenos las cinéticas sin radiación UV, en círculos vacíos luego de irradiarlas y en cuadrados vacíos luego de radiación UV en condición inerte.

### 5.8 Efecto de la radiación UV en la estructura terciaria de las proteínas en ausencia de oxígeno.

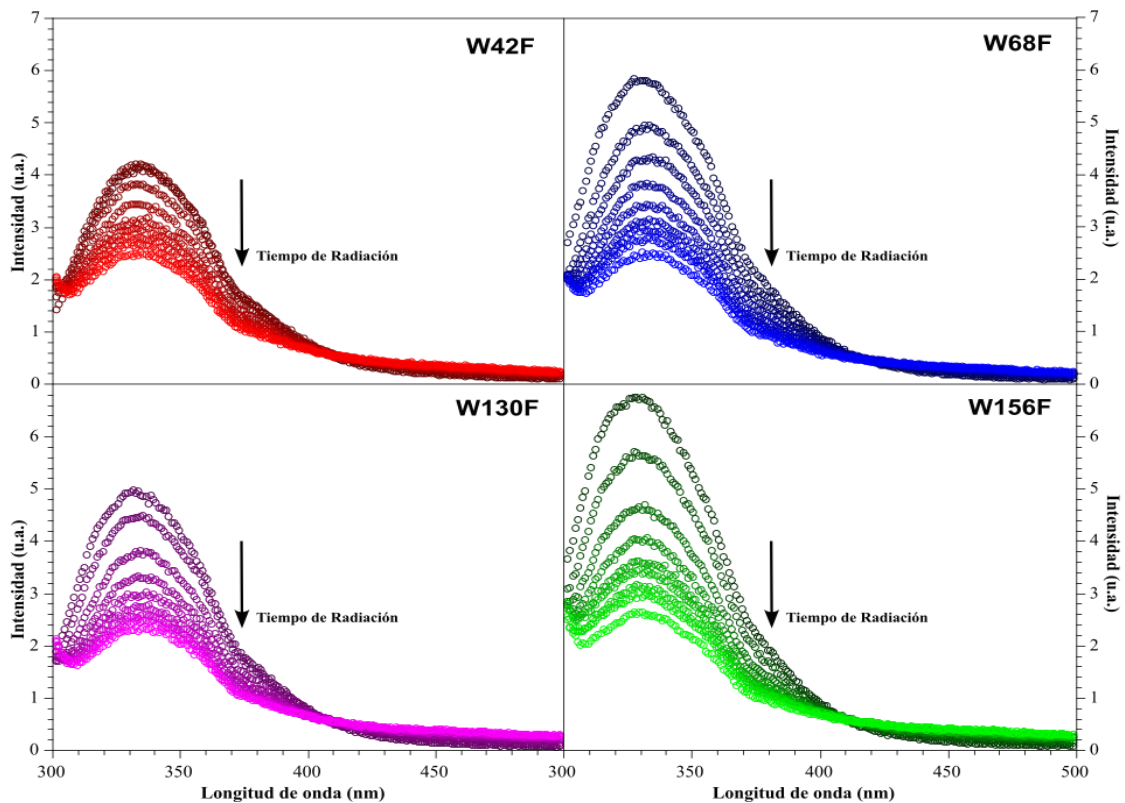
La Figura 23 muestra los cambios en el espectro de fluorescencia de HgD luego de irradiarla ante UV en ciclos de 15 minutos en atmósfera inerte. No se observa corrimiento del máximo de emisión, es decir que la radiación no induce cambios en el ambiente químico de los Trps. En esta condición no se observa la aparición de una nueva señal de emisión.





**Figura 23:** Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína HgD con diferentes dosis de radiación UV. En presencia (A) y ausencia (B) de oxígeno.

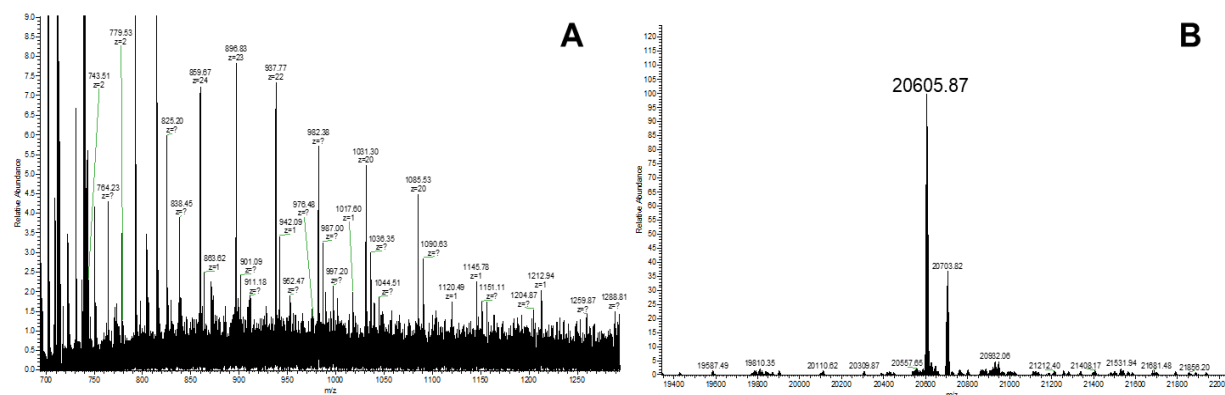
En el caso de las mutantes de Trp se observó básicamente lo mismo que para HgD, en atmósfera inerte la radiación UV no induce cambios en el ambiente químico de los Trps y no se observa la formación de una nueva banda de emisión (Figura 24).



**Figura 24:** Espectros de emisión de fluorescencia de las mutantes de triptófano con diferentes dosis de radiación UV en ausencia de oxígeno.

## 5.9 Cambios covalentes en HgD después de su exposición a la radiación UV en presencia y ausencia de oxígeno.

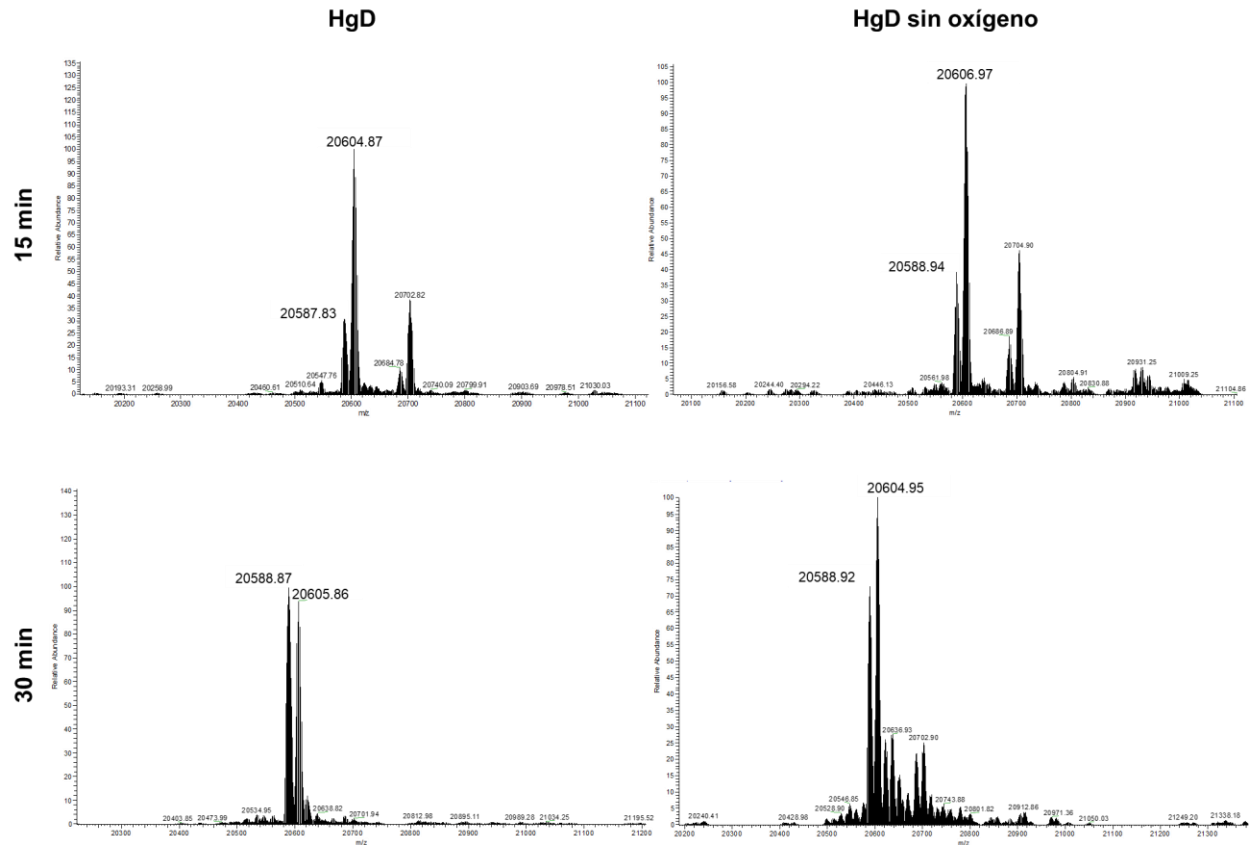
En la Figura 25A se muestra el espectro de masas de los iones precursoros obtenidos para la proteína HgD sin irradiar. La deconvolución de este espectro muestra un ion molecular de 20605.87 m/z (Figura 25B) que corresponde con la masa molecular de HgD (Ma et al. 1998; Hanson et al. 1998; Anderson et al. 2019).



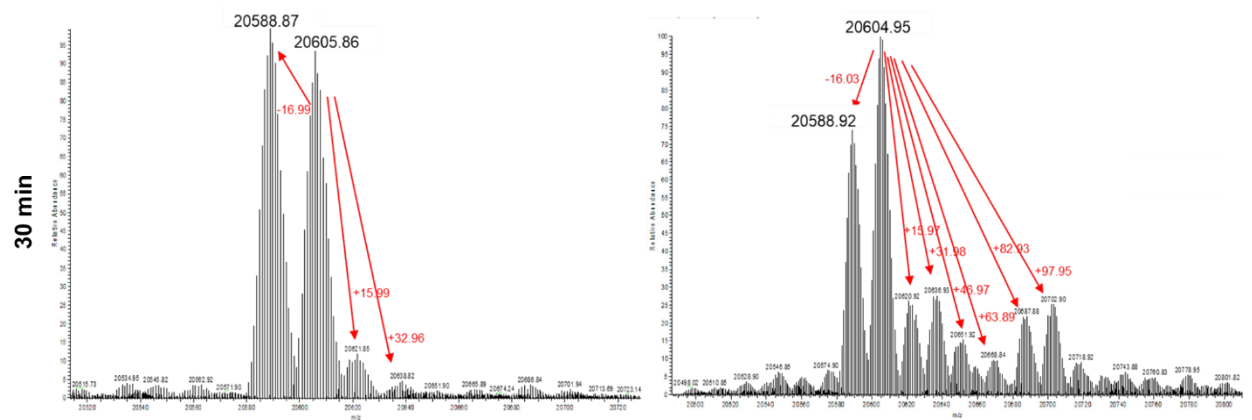
**Figura 25:** Espectro *full scan* de los iones precursoros (A) y espectro obtenido luego de la deconvolución (B) para la proteína HgD sin irradiar.

Luego de irradiar a la proteína durante 15 minutos se colectó un nuevo espectro de masas. La Figura 26 muestra los espectros deconvolucionados de HgD en presencia de oxígeno (paneles de la izquierda) y en atmósfera inerte (paneles de la derecha), después de 15 y 30 minutos de exposición a la radiación UV. Luego de irradiar durante 15 min, en el espectro se observa un nuevo pico de 20588.83 m/z (17 Da menos que el ion molecular). Una vez que la proteína se expuso una segunda vez a 15 min de radiación UV (30 min totales) se observó un incremento en la abundancia relativa de la señal de 20588.83 m/z, así como la aparición de nuevas señales de +16, +32, +48, +64 Da del ion molecular. En la Figura 27 se muestra una ampliación del espectro para los 30 min donde se ven más claramente estas señales.

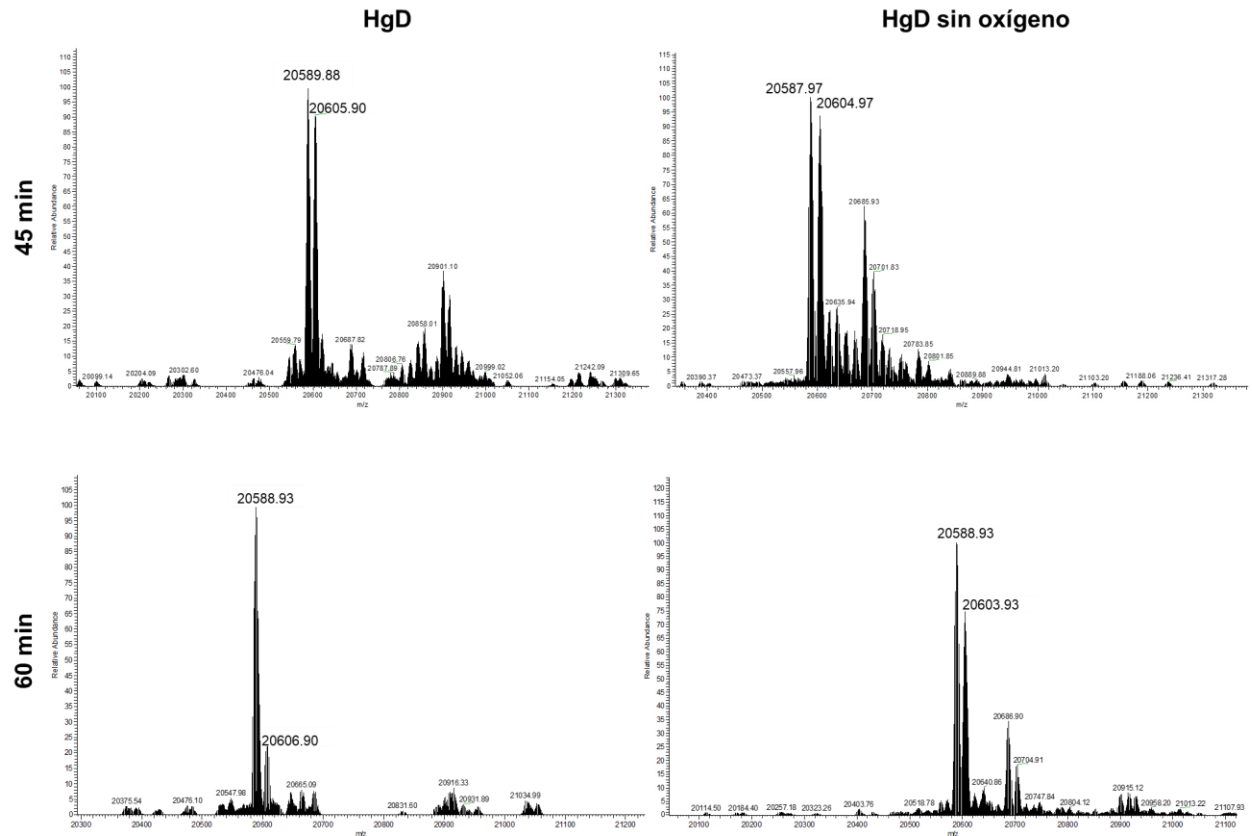
La Figura 28 muestra los espectros de masas deconvolucionados de HgD irradiada por 45 y 60 minutos. Se observa un aumento en la abundancia relativa de la señal de -17 Da a medida que se incrementó la exposición a la radiación, llegando a una abundancia relativa mayor que la abundancia relativa de HgD. Además, aumenta la abundancia relativa de las señales de +16, +32, +48, +64 Da y se observan juegos de señales diferentes o las mismas señales con variaciones en las intensidades relativas.



**Figura 26:** Espectros de masas deconvolucionados de HgD con diferentes dosis de radiación UV. Los paneles de la izquierda muestran los espectros obtenidos en presencia de oxígeno y los de la derecha muestran los obtenidos en condiciones inertes.



**Figura 27:** Espectros de masas deconvolucionados de HgD irradiada 30 minutos. En presencia de oxígeno (espectro de la izquierda) y en ausencia (espectro de la derecha).



**Figura 28** Espectros de masas deconvolucionados de HgD con diferentes dosis de radiación UV. Los paneles de la izquierda muestran los espectros obtenidos en presencia de oxígeno y los de la derecha muestran los obtenidos en condiciones inertes.

## 6. DISCUSIÓN

La proteína HgD contiene cuatro triptófanos altamente conservados (Trp 42, Trp 68, Trp 130 y el Trp 156), los cuales son los principales responsables de absorber la radiación UV a la que está expuesto el cristalino (Norledge et al. 1997; Bask et al. 2003; Chen et al. 2006). La fotooxidación de los residuos de triptófanos se ha descrito como uno de los factores precursores en la formación de cataratas, donde la exposición prolongada a la radiación UV puede provocar la ruptura y apertura del anillo indol. El resultado final puede inducir cambios conformacionales en la proteína que conducen a despegamiento parcial o total y la hacen precursora para la formación de agregados (Chen et al. 2009; Pattison et al. 2012; Serebryany et al. 2016). Como se ha descrito anteriormente, los triptófanos 68 y 156 presentan eficiencias cuánticas mucho más bajas que los triptófanos 42 y 130, siendo la eficiencia cuántica de los triptófanos 42 y 130 unas 20 veces mayor que la de los triptófanos 68 y 156 (Chen et al. 2006; Chen et al. 2009). Esto se debe al apagamiento de la fluorescencia de los Trp 68 y 156 por las triadas Tyr55-His65-Tyr62 y Tyr143-His122-Tyr150, respectivamente, por transferencia de energía, favoreciendo la disminución del tiempo de vida del estado excitado de la proteína y protegiendo del daño inducido por radiación UV (Kosinski-Collins et al. 2004; Chen et al. 2006). Además de este apagamiento, los Trps 42 y 130 sufren apagamiento por transferencia de energía hacia los Trps 68 y 130, respectivamente (Chen et al. 2006; Chen et al. 2008).

En este trabajo se evaluó el efecto de dosis bajas de radiación en la agregación de la proteína HgD y las mutantes simples de Trp, W42F, W68F, W130F y W156F. Los estudios de dicroísmo circular y fluorescencia indican que la sustitución de los Trps no induce cambios en la estructura secundaria ni terciaria de la proteína. Sin embargo, sí hacen a la proteína más propensa a la agregación, en particular la sustitución de los Trps 130 y 156. Esta propensión a la agregación puede deberse a la pérdida de interacciones al sustituir los Trps por Phe, pues se ha reportado la importancia de estos residuos en la proteína HgD, que junto con las Tyr forman grupos que estabilizan el motivo de llave griega (Burley and Petsko 1985; Kong and King 2011, Hemmingsen et al. 1994; Kong and King 2011; Vendra et al. 2016). Estos grupos incluyen a los residuos Tyr-Trp-Tyr en cada dominio, Tyr55-Trp68-Tyr62 en el dominio N-terminal y Tyr143-

Trp156-Tyr150, que en el dominio C-terminal (Kong and King 2011; Vendra et al. 2016). Además, la disposición de las cadenas laterales de estos aminoácidos aromáticos en el interior de la proteína propicia que la HgD adquiera una forma compacta (Schafheimer and King 2013; Vendra et al. 2016). Por lo tanto, la sustitución de un residuo de Trp por Phe, puede provocar modificaciones en la hidrofobicidad del interior de la proteína y conducir a cambios conformacionales que la hagan más propensa a la agregación.

Además, se observó que luego de ser irradiadas, las proteínas no sufren cambios en estructura secundaria o terciaria, pero tienen cinéticas de agregación más rápidas. Todas las proteínas presentaron cinéticas de agregación de primer orden y las pendientes de las rectas están en el orden de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$   $\text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$ , valores por debajo del orden de difusión en agua (Alvarez 2020), por lo que se puede suponer que la asociación de monómeros para formar agregados está dictada por la difusión.

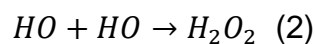
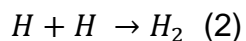
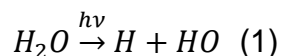
Las constantes de velocidad de agregación de las proteínas irradiadas aumentan 8 veces para la W68F, 5 veces para HgD, 4 veces para W42F, 2 veces para W130F y 2.6 veces para W156F, comparadas con las constantes de velocidad de cada proteína sin irradiar. Estos resultados sugieren que el Trp que más protege contra el daño inducido por la radiación UV es W68, pues al sustituirlo, las cinéticas de agregación se aceleran 8 veces, además indican que el Trp más sensible al daño por radiación es W42, pues la sustituir al W68 se pierde la transferencia de energía hacia este Trp. Esto está en concordancia con las eficiencias cuánticas reportadas, pues W42 tiene eficiencia cuántica de  $0.13 \pm 0.01$ , mientras que la de W68 es  $0.0076 \pm 0.0008$  (Chen et al. 2006). Así, el apagamiento de la emisión de fluorescencia de W68 sobre W42 está disminuyendo el tiempo de vida del estado excitado atenuando los daños covalentes inducidos por éste.

Los cambios en las constantes de velocidad de agregación y los tiempos de vida media de las proteínas sin irradiar e irradiadas parecen ser inducidos por fotooxidación de los Trps. Los ensayos de fluorescencia muestran la aparición de una nueva banda de emisión a 452 nm, que corresponde con el máximo de emisión de la quinurenina (K) o la N-formilquinurenina (NFK) (Fukunaga et al. 1982). La conversión de los Trps fotoexcitados es un mecanismo complejo del que sólo se están observando algunos

fotoproductos. El aumento en los cocientes de conversión indica cambios en la eficiencia del proceso de formación de fotoproductos fluorescentes, es decir, a menor cociente mayor eficiencia y a mayor cociente menor eficiencia de conversión. Esto significa que HgD es más eficiente formando los fotoproductos fluorescentes que las mutantes, lo cual tiene sentido pues tiene 4 Trps susceptibles a pasar al estado excitado, mientras que las mutantes sólo tienen 3. Por lo tanto, sólo es posible comparar directamente los cocientes de las mutantes, los cuales son 4, 6, 3 y 3 para W42F, W68F, W130F y W156F, respectivamente. Esto sugiere que los Trps más eficientes para la formación de fotoproductos fluorescentes son W68 y W42. Por otra parte, los tiempos de intercepción ( $t_{in}$ ) obtenidos de las tendencias de decaimiento indican que la mutante que necesita menos dosis de radiación es W156F, mientras que la mutante W130F es la que necesita más dosis de radiación. Esto tiene sentido pues la eficiencia cuántica reportada para W130 es mucho mayor que la de W156, además, W156 es apagador de la fluorescencia de W130, por lo que su sustitución aumenta el tiempo de vida del estado excitado de W130 y favorece la formación de K o NFK a dosis más bajas de radiación.

Los cambios en los espectros de masas reportados para la fotoconversión de Trp son de +4 Da para la formación de K, de +16 Da para la formación de triptófano monooxidado, de +32 Da para la formación de NFK y de +48 Da para la formación de NFK monooxidada (Perdivara et al. 2010). Así, la señal de +16 Da observada en el espectro de masas de HgD irradiada en presencia de oxígeno, podría corresponder a la formación de cuatro K, una por cada Trp; o a la formación de Trp monooxidado. La señal de +32 Da puede corresponder a la formación de una NFK. Son necesarios más estudios para determinar cuál de las propuestas es la correcta.

Por otro lado, en el espectro de masas de la proteína irradiada en atmósfera inerte se observa la aparición de señales +16, +32, +48 y +64 Da. Estas señales no corresponden con la formación de K ni NFK, pues su formación a partir de la oxidación del Trp está mediada por ROS o subproductos de ROS, como el peróxido de hidrógeno (Kell and Steinhart 1990). Sin embargo, la formación de peróxido de hidrógeno inducida por la radiación UV en atmósfera inerte mostrado a continuación, es un proceso poco común, inespecífico y de bajo rendimiento (Baxendale 1962; Ung and Back 1964).



Además, en los espectros de fluorescencia, colectados en atmósfera inerte, no se observan las bandas de emisión característica de K o NFK. Así, la naturaleza de los fotocompuestos formados es más compleja de interpretar, pues al carecer de oxígeno como oxidante, ocurren reacciones que involucran segmentos de la proteína que aceptan y donan electrones, propagando los radicales libres fotoinducidos en las especies absorbentes.

Todo lo anterior apunta a que todas las proteínas son sensibles al daño por radiación y este daño acelera la formación de agregados. Sin embargo, las mutantes a la misma dosis de irradiación no presentan la misma tasa de agregación. La comparación de los resultados de formación de un fotoproducto fluorescente y las cinéticas de agregación indican que la ruta de formación del producto fotoluminiscente no es la principal causa de daño por fotodegradación, pues las cinéticas en atmósfera inerte presentan constantes de velocidad y tiempos de vida media muy similares a las cinéticas en presencia de oxígeno.



## **7. CONCLUSIONES**

1. Las mutaciones W42F, W68F, W130F y W156F no provocan cambios en la estructura secundaria de la proteína, pero hacen que la proteína sea más propensa a formar agregados, en particular la sustitución de W130 y W156.
2. La radiación UV no provoca daños en la estructura secundaria y terciaria de la proteína HgD ni en las mutantes W42F, W68F, W130F y W156F.
3. El triptófano más sensible al daño por radiación es el W42.
4. La radiación UV provoca la fotooxidación del Trp con la obtención de diferentes fotoproductos como la kinurenina, pero también se obtienen varios productos que no fluorescen en el rango de longitudes de onda de excitación y emisión probados.

## **8. RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios de estabilidad térmica de las proteínas irradiadas en presencia y ausencia de oxígeno.
2. Realizar estudios de secuenciación por LC-MS/MS para identificar los aminoácidos fotooxidados.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbas A. (2018). "Trends of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases." *Neurochemical Basis of Brain Function and Dysfunction*, DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81224>.
- Agencia Internacional para la Prevención de la Ceguera (IAPB) (2020). "Cataratas." <https://www.iapb.org/es/learn/knowledge-hub/eye-conditions/cataract/>.
- Alvarez S. (2020). "Capacidad antioxidante del 3,4-dihidroxibenzaldehído frente al radical hidropéroxilo en disolución: Un enfoque teórico." *Avances en Ciencias e Ingenierías*, Artículo, Sección A, 11 (9), 6-32.
- Anderson D., et al. (2019). "MALDI imaging mass spectrometry of  $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallins in the ocular lens." *J Mass Spectrom.*, 55:e4473.
- Andley U. and Clark B. (1989). "The Effects of Near-UV Radiation on Human Lens  $\beta$ -Crystallins: Proteins Structural Changes and the Production of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ ." *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 50, No. 1, pp. 97-105.
- Andley U. (2007). "Crystallins in the eye: Function and pathology." *Progress in Retinal and Eye Research*, 26, 78–98.
- Andrade M., et al. (2003). "La Radiación Ultravioleta en Bolivia." *Organización Panamericana de la Salud, Laboratorio de Física de la Atmósfera*.
- 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.
- Bassnett S., (2002). "Lens organelle degradation." *Experimental eye research* 74:1–6.
- Basak A., et al. (2003). "High-resolution X-ray Crystal Structures of Human  $\gamma$ D Crystallin ( $1.25\text{\AA}$ ) and the R58H Mutant ( $1.15\text{\AA}$ ) Associated with Aculeiform Cataract." *J. Mol. Biol.* 328, 1137–1147.
- Baxendale J., (1962). "The Flash Photolysis of Water and Aqueous Solutions." *RADIATION RESEARCH*, 17, 312-326.

- Bent D. and Hayon E. (1975). "Excited State Chemistry of Aromatic Amino Acids and Related Peptides. II. Phenylalanine." *Journal of the American Chemical Society*, 97:10.
- Bennett M., et al. (2006). "Deposition diseases and 3D domain swapping." *Structure* 14 (5), 811–824.
- Berman E. (1991). "Biochemistry of the Eye." *Perspectives in Vision Research*. DOI: 10.1007/978-1-4757-9441-0.
- Bloemendal H. and Hockwin O. (1982). "Lens Protein." *Lens Protein, Critical Reviews in Biochemistry*, 12:1, 1-38.
- Bloemendal H. and de Jong W. (1991). "Lens Proteins and Their Genes." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 41.
- Bloemendal H., et al. (2004). "Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins." *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 86, 407-485.
- Brian G. and Taylor H. (2001). "Cataract blindness--challenges for the 21st century." *Bull WorldHealthOrgan* 79(3): 249-56.
- Buell A. (2017). "The Nucleation of Protein Aggregates - From Crystals to Amyloid Fibrils." *Int Rev Cell Mol Biol* 329:187–226.
- Burley S. and Petsko G. (1985). "Aromatic-Aromatic Interaction: A Mechanism of Protein Structure Stabilization." *SCIENCE*, VOL. 229.
- Castillos-Rojas S. (2007). "Actinometría: Determinación de la Intensidad de una Lámpara de UV Utilizando Oxalato Férrico." Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica. ICN-UNAM.
- Chen J., et al. (2006). "Mechanism of the Highly Efficient Quenching of Tryptophan Fluorescence in Human  $\gamma$ D-Crystallin". *Biochemistry*, 45, 11552-11563.
- Chen J., et al. (2008). "Mechanism of the Efficient Tryptophan Fluorescence Quenching in Human  $\gamma$ D-Crystallin Studied by Time-Resolved Fluorescence". *Biochemistry*, 47,10705-10721.

- Chen J., et al. (2009). "Mechanism of the Very Efficient Quenching of Tryptophan Fluorescence in Human  $\gamma$ D-Crystallins and  $\gamma$ S-Crystallins: The  $\gamma$ -Crystallin Fold May Have Evolved To Protect Tryptophan Residues from Ultraviolet Photodamage". *Biochemistry*, 48,3708-3716.
- Creed D. (1984). "The Photophysics and Photochemistry of the Near-UV Absorbing Amino Acids-III. Cystine and its Simple Derivates." *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 39, No. 4. pp. 577-583.
- Darrington T. and Anderson B. (1995). "Evidence for a Common Intermediate in Insulin Deamidation and Covalent Dimer Formation: Effects of pH and Aniline Trapping in Dilute Acidic Solutions." *Journal of Pharmaceutical Sciences / 215*, Vol. 84, No. 3.
- Das P., et al. (2011). "Aggregation of  $\gamma$ -crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal  $\beta$ -strands." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (26), 10514–10519.
- De Jong W., et al. (1998). "Genealogy of the  $\alpha$ -crystallin—small heat-shock protein superfamily." *International Journal of Biological Macromolecules* 22, 151–162.
- Delaye M. y Tardieu A. (1983). "Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency." *Nature* 302:415-417.
- Delcourt C., et al. (2000). "Light exposure and the risk of cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the Pathologies Oculaires Liees a l'Age (POLA) study." *Arch Ophthalmol* 118:385–392.
- Díaz-Flores M., et al. (2004). "Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica." *Gaceta Médica de México*, Vol. 140, No. 4.
- Dillon J. and Atherton S. (1990). "Time Resolved Spectroscopic Studies on the Intact Human Lens." *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 51, No. 4, pp. 465-468.
- Dillon J., et al. (1976). "Identification of  $\beta$  carbolines isolated from fluorescent human lens proteins." *Nature* 259, 422–423.
- Dobson C. (2003). "Protein folding and misfolding." *NATURE*, VOL 426, 18-25.

- Donaldson P. and Lim J. (2008). "Membrane transporters: new roles in lens cataract." *Ocular Transporters in Ophthalmic Diseases and Drug Delivery*. Humana Press, New Jersey, NJ, USA.
- Eichner T. and Radford S. (2011). "Understanding the complex mechanisms of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid assembly." *The FEBS Journal* 278:3868–3883.
- Ferrer F., et al. (2009). "El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas." *Revista Cubana de Farmacia*, 43(3), 1–11.
- Fielding J. (2015). "Lens Biology and Biochemistry." *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, ISSN 1877-1173.
- Fink L. (1998). "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid." *Folding & design* 3:R9-23.
- Finke J., et al. (2000). "Aggregation Events Occur Prior to Stable Intermediate Formation during Refolding of Interleukin  $1\beta$ †." *Biochemistry* 39:575–583.
- Flaugh S., et al. (2005). "Contributions of hydrophobic domain interface interactions to the folding and stability of human gamma D-crystallin." *Protein science: a publication of the Protein Society* 14:569–81.
- Francis P., et al. (2000). "The genetics of childhood cataract." *J Med Genet*, 37:481–488.
- Frederik J. (1991). "Effects of Ultraviolet Light on the Eye: Role of Protective Glasses." *Health Perspectives* Vol. 96, pp. 177-184.
- Fukunaga Y., et al. (1982). "Fluorescence Characteristics of Kynurenine and N'-Formylkynurenine. Their Use as Reporters of the Environment of Tryptophan 62 in Hen Egg-White Lysozyme." *J. Biochem.* 92, 129-141.
- Galvis V., et al. (2008). "El cristalino para el médico general." *Med UNAB*, Vol. 11, Número 3.
- Garcia-Manyes S., et al. (2016). "Single-molecule force spectroscopy predicts a misfolded, domain-swapped conformation in human  $\gamma$ D-crystallin protein." *J. Biol. Chem.* 291 (8), 4226–4235.

- González J., et al. (2011). "Limitantes en la cirugía de catarata desde una perspectiva científico- tecnológica." *Rev Ciencias Médicas*, vol.15 no.3, Pinar del Río.
- González L. R. (2007). "Conocimiento sobre el daño ocular causado por radiaciones ultravioleta en la población estudiantil del colegio departamental de Cucaita, Boyacá." *Universidad de La Salle Ciencia Unisalle, Facultad de Optometría, Bogotá, Colombia*, pp. 20-32.
- Goosey J., et al. (1980). "Crosslinking of lens crystallins in a photodynamic system." *Science* 208: 422-423.
- Gum G., et al. (2007). "Physiology of the eye." *Veterinary Ophthalmology*, Fourth ed., Blackbell Publishing.
- Hamada N. et al. (2014). "Emerging issues in radiogenic cataracts and cardiovascular disease." *Journal of Radiation Research*, pp 1–16.
- Hanson S., et al. (1998). "Deamidation and Disulfide Bonding in Human Lens  $\gamma$ -Crystallins." *Exp. Eye Res.*, 67, 301–312.
- Hartl F. and Hayer-Hartl M. (2009). "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo." *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*, VOLUME 16 NUMBER 6.
- Hemmingsen J. (1994). "The tyrosine corner: A feature of most Greek key  $\beta$ -barrel proteins." *Protein Science*, 3:1927-1937. Cambridge University Press, USA.
- Heyningen R. (1973). "Assay of Fluorescent Glucosides in the Human Lens." *Exp. Eye Res.* 15, 121-126.
- Hightower K. (1995). "A review of the evidence that ultraviolet irradiation is a risk factor in cataractogenesis." *Documenta Ophthalmologica* 88: 205-220.
- Hightower K. and McCready J. (1997). "The Role of Calcium in UVB-Induced Damage in Irradiated Ocular Lenses." *Photochemistry and Photobiology*, 65(1): 155-160.
- Hodge W., et al. (1995). "Risk Factors for Age-related Cataracts." *Epidemiologic*

Reviews, Vol. 17, No. 12.

- Hoenders H. and Bloemendal H. (1983). "Lens Proteins and Aging." *Journal of Gerontology*, Vol. 38, No. 3, 278-286.
- Honrubia F. (2002). "Oftalmología General." Ed: FM Honrubia. Primera Edición, Zaragoza.
- Hugh R. T. (1989). "Ultraviolet Radiation and the eye: an epidemiologic study." Dana Center for Preventive Ophthalmology, the Wilmer Ophthalmological Institute, the Johns Hopkins University Schools of Medicine and Public Health, Baltimore, Maryland. *TR. AM. OPHTH. Soc.* vol. LXXXVII.
- Huvaere K. and Skibsted L. (2009). "Light-Induced Oxidation of Tryptophan and Histidine Reactivity of Aromatic N-Heterocycles toward Triplet-Excited Flavins." *J. AM. CHEM. SOC.*, 131, 8049–8060.
- Imbert E., et al. (2012). "Estrés oxidativo en la patología ocular." *Revista Electrónica de PortalesMedicos.com*.
- Ivanov I., et al. (2018). "Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health." *J. Biophotonics*, 11:e201700377.
- Jager T., et al. (2017). "Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species." *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 996.
- Jedziniak J., et al. (1987). "Oxidative damage to human lens enzymes." *Curr. Eye Res.* 6: 345-350.
- Ji Y., et al. (2015). "The mechanism of UVB irradiation induced-apoptosis in cataract." *Mol Cell Biochem* 401:87–95.
- Kang H. and Baker E. (2011). "Intramolecular isopeptide bonds: protein crosslinks built for stress?" *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 36, No. 4.
- Karri S., et al. (2013). "Structural analysis of the mutant protein D26G of human  $\gamma$ S-crystallin, associated with Coppock cataract." *Molecular vision* 19:1231–7.

- Kell G. and Steinhart H. (1990). "Oxidation of Tryptophan by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Model Systems." JOURNAL OF FOOD SCIENCE, Volume 55, No. 4.
- Kim H., et al. (2015). "Chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology." Mass Spectrometry Reviews, 184–208.
- Kinoshita J. (1974). "Mechanisms initiating cataract formation (Proctor Lecture)." Invest Ophthalmol Vis Sci; 13:713-724.
- Klein B., et al (1994). "Older-onset diabetes and lens opacities. The Beaver Dam Eye Study." Ophthalmic Epidemiology Vol. 2, No. 1, pp. 49-55.
- Kong F. and King J. (2011). "Contributions of aromatic pairs to the folding and stability of long-lived human  $\gamma$ D-crystallin." Protein science: a publication of the Protein Society 20:513–528.
- Korlimbinis A. and Truscott R. (2006). "Identification of 3-Hydroxykynurenine Bound to Proteins in the Human Lens. A Possible Role in Age-Related Nuclear Cataract." Biochemistry, Vol. 45, No. 6.
- Kosinski-Collins M. (2003). "In vitro unfolding, refolding, and polymerization of human D crystallin, a protein involved in cataract formation." Protein Science 12:480–490.
- Kosinski-Collins M., et al. (2004). "Probing folding and fluorescence quenching in human D crystallin Greek key domains using triple tryptophan mutant proteins." 2223-2235. doi: 10.1110/ps.04627004. 2223–2235.
- Kosinski M. and King J. (2002). "In vitro unfolding, refolding, and polymerization of human  $\gamma$  D crystallin, a protein involved in cataract formation." [http://www.proteinscience.org/cgi/doi/ 10.1110/ps.0225503](http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.0225503).
- Kumar U. et al. (2012). "Damage of the Ultraviolet on Lens." Medical scientific file, P.d.V no 67.
- Lam D., et al (2015). "Nature Reviews | Disease Primers." Article number: 15014.
- Langford-Smith A., et al. (2016). "Age and Smoking Related Changes in Metal Ion Levels in Human Lens: Implications for Cataract Formation." PLoS ONE 11(1): e0147576.



- Lechuga M. (2006). "Patología ocular en la diabetes." *Revista Médica Revisada por Pares*. <http://doi.org/10.5867/medwave.2006.06.1890>.
- Ma Z., et al. (1998). "Age-Related Changes in Human Lens Crystallins Identified by HPLC and Mass Spectrometry." *Exp. Eye Res.*, 67, 21–30.
- MacCoss M., et al (2002). "Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7900–7905.
- Marchitti S., et al. (2011). "Ultraviolet Radiation: Cellular Antioxidant Response and the Role of Ocular Aldehyde Dehydrogenase Enzymes." *Eye & Contact Lens*, 37: 206–213.
- McNulty R., et al. (2004). "Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens." *J Physiol*, 559.3, pp 883–898.
- Mills I. A., et al (2007). "Folding and stability of the isolated Greek key domains of the long-lived human lens proteins  $\gamma$ D-crystallin and  $\gamma$ S-crystallin." *Protein Science*, 16:2427-2444.
- Mizdrak J., et al. (2008). "Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage." *Free RadicBiolMed* 44(6): 1108-19.
- Mondal B., et al. (2020). "Double Domain Swapping in Human  $\gamma$ C and  $\gamma$ D Crystallin Drives Early Stages of Aggregation." *Journal of Molecular Biology*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.18.210443>.
- Moran S., et al. (2012). "Structural and sequence analysis of the human gamma D-crystallin amyloid fibril core using 2D IR spectroscopy, segmental  $^{13}\text{C}$  labeling, and mass spectrometry." *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 18410–18416.
- Moran S., et al. (2013). "Amyloid Fiber Formation in Human  $\gamma$ D-Crystallin Induced by UV-B Photodamage." *Biochemistry, including biophysical chemistry & molecular biology*, [pubs.acs.org/biochemistry](https://pubs.acs.org/biochemistry).
- Moreau K. and King J. (2012). "Protein misfolding and aggregation in cataract

disease and prospects for prevention."  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.005>.

- Mori W., et al. (2022). "Differences in interaction lead to the formation of different types of insulin amyloid." *Scientific Reports*, 12:8556, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12212-6>.
- Muranov K., et al. (2011). "Mechanism of aggregation of UV-irradiated bL-crystallin." *Experimental Eye Research* 92, 76-86.
- Nandrot E., et al. (2003). "Gamma-D crystallin gene (CRYGD) mutation causes autosomal dominant congenital cerulean cataracts." *J Med Genet*, 40:262-267.
- NEI: Instituto Nacional del Ojo (2020). "Las cataratas: Lo que usted debe saber." U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, National Institutes of Health, National Eye Institute, NIH Publication No: 03-201S.
- Nettleton E., et al. (2000). "Characterization of the Oligomeric States of Insulin in Self-Assembly and Amyloid Fibril Formation by Mass Spectrometry." *Biophysical Journal*, Volume 79, 1053–1065.
- Norledge B., et al. (1997). "Towards a Molecular Understanding of Phase Separation in the Lens: a Comparison of the X-ray Structures of Two High Tc  $\gamma$ -Crystallins,  $\gamma E$  and  $\gamma F$ , with Two Low Tc  $\gamma$ -Crystallins,  $\gamma B$  and  $\gamma D$ ." *Exp. Eye Res.*, 65, 609-630.
- Organización Mundial de la Salud (2023). "Ceguera y discapacidad visual." <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>.
- Ortega J., (2001). "Desarrollo posnatal de las proteínas cristalinas porcinas." Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía II, Madrid.
- Ostrovsky M., et al. (2002). "Comparison of ultraviolet induced photo-kinetics for lens-derived and recombinant b-crystallins." *Molecular Vision*, 8:72-78.
- Ottolenghi P. and Ellorye J. (1983). "Radiation Inactivation of (Na,K)-ATPase, an Enzyme Showing Multiple Radiation-sensitive Domains." *THE JOURNAL OF*

BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 258, No. 24, pp. 14895-14907.

- Pande A., et al. (2010). "Increase in Surface Hydrophobicity of the Cataract-Associated, P23T Mutant of Human Gamma D-Crystallin is Responsible for Its Dramatically Lower, Retrograde Solubility." NIH Public access 17:148–159.
- Pande A., et al. (2015). "Deamidation of Human  $\gamma$ S-Crystallin Increases Attractive Protein Interactions: Implications for Cataract." *Biochemistry* 54:4890–4899.
- Papanikolopoulou K., et al. (2008). "Formation of amyloid fibrils in vitro by human  $\gamma$ D-Crystallin and its isolated domains." *Mol. Vis.* 14, 81–89.
- Parker C. (1953). "A New Sensitive Chemical Actinometer. I. Some trials with potassium ferrioxalate." *Pro. Roy. Soc. London A* 220, 104-116.
- Patel P., et al. (2012). "Cataract: A major secondary diabetic complication." 1:180–185.
- Pathak M., et al. (1972). "Formation of thymine dimers in mammalian skin by UV radiation in vivo." *Photochem Photobiol*; 15:177-185.
- Pattison D. and Davies M. (2006). "Actions of ultraviolet light on cellular structures." *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, Birkhäuser Verlag/Switzerland.
- Pattison D., et al. (2012). "Photo-oxidation of proteins." *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11, 38.
- Perdivara I., et al. (2010). "Mass Spectrometric Identification of Oxidative Modifications of Tryptophan Residues in Proteins: Chemical Artifact or Post-Translational Modification?." *J Am Soc Mass Spectrom*, 21, 1114–1117.
- Peterson G. and Hokin L. (1980). "Improved purification of brine-shrimp (*Artemia* saline) ( $\text{Na}^+\text{+K}^+$ )-activated adenosine triphosphatase and amino-acid and carbohydrate analyses of the isolated subunits." *Biochem. J.*, 192, 107-118.
- Puerta-Ortiz and Morales-Aramburo (2020). "Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes." *Rev Colomb Cardiol*, 27(S1): 61-71.

- Quiney C. et al. (2011). "Protein oxidation." *Protein Reviews*, Vol. 13, 57–78.
- Rama M., et al. (2003). "Poder refractor de la lente cristalino con gradiente de índice del ojo humano." *ÓPTICA PURA Y APLICADA*, Vol. 36.
- Rao V. (2023). "Impact of hydrogen peroxide on structure, stability, and aggregational properties of human  $\gamma$ S-crystallin." *J Biosci*, 48:5.
- Roberts J. (2001). "Ocular phototoxicity." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 64:136–143.
- Sánchez A. (2009). "Nuevas aportaciones a la correlación clínico molecular de la catarata senil". Universidad de Salamanca, Departamento de Cirugía (Oftalmología) y Departamento de Medicina Molecular.
- Santhoshkumar P., et al. (2008). "Significance of interactions of low molecular weight crystallin fragments in lens aging and cataract formation." *J. Biol. Chem.*; 283: 8477-8485.
- Sapkota R., Pardhan S. (2016). "Complicaciones en la vista por exposición a la luz ultravioleta y azul-violeta." *International Review of Ophthalmic Optics. Vision & Eye Research Unit (VERU), Postgraduate Medical Institute, Anglia Ruskin University, Cambridge, Reino Unido.*
- Schafheimer N. and King J. (2013). "Tryptophan Cluster Protects Human  $\gamma$ D-Crystallin from Ultraviolet Radiation-Induced Photoaggregation In Vitro." *Photochemistry and Photobiology*, 89: 1106–1115.
- Schfneich C. (2005). "Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease." *Biochimica et Biophysica Acta* 1703, 111–119.
- Sean D., et al. (2013). "Amyloid Fiber Formation in Human  $\gamma$ D-Crystallin Induced by UVB Photodamage." *Biochemistry*, 52(36): doi:10.1021/bi4008353.
- Searle B., et al (2005). "Identification of protein modifications using MS/MS de novo sequencing and the OpenSea alignment algorithm." *Journal of Proteome Research* 4:546–554.

- Serebryany E. and King J. (2015). "Wild-type human  $\gamma$ D-crystallin promotes aggregation of its oxidation-mimicking, misfolding-prone W42Q mutant." *The Journal of biological chemistry* 290:11491–503.
- Serebrayny E., et al. (2016). "Aggregation of Trp>Glu point mutants of human gamma-D crystallin provides a model for hereditary or UV-induced cataract." *The Protein Society*. Vol 25: 1115-1128.
- Serebryany E., et al. (2016). "An internal disulfide locks a misfolded aggregation-prone intermediate in cataract-linked mutants of human  $\gamma$ D-crystallin." *J. Biol. Chem.* 291 (36),19172–19183.
- Serebryany E., et al. (2021). "Redox chemistry of lens crystallins: A system of cysteines." *Experimental Eye Research* 211:108707.
- Sergeev Y., et al. (2005). "Increased Sensitivity of Amino-Arm Truncated  $\beta$ 3-Crystallin to UV-Light-Induced Photoaggregation." *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 46, No. 9.
- Shamsi T., et al. (2017). "A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments." *Int J Biol Macromol* 105:993– 1000.
- Sharma K. and Santhoshkumar P. (2009). "Lens aging: Effects of crystallins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 1095–1108.
- Siezen R. and Hoenders H. (1979). "The quaternary structure of bovine  $\alpha$ -crystallin." *Eur J Biochem*; 96:431-440.
- Singh Grewal A., et al. (2016). "Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 16:120–162.
- Slingsby C., et al. (1997). "X-ray Diffraction and Structure of Crystallins." *Progress in Retinal and Eye Research* Vol. 16, No. 1, pp. 3-29.
- Slingsby C., et al. (2013). Evolution of crystallins for a role in the vertebrate eye lens. *PROTEIN SCIENCE*, VOL 22:367-380.
- Spector A. (1984) "The search for a solution to senile cataracts." *Invest Ophthalmol*

Vis Sci;25:130-146.

- Srikanthan D., et al. (2004). "Sulfur in human crystallins." *Experimental Eye Research* 79, 823–831.
- Srivastava S., et al. (2005). "Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options." *Endocrine reviews* 26:380–92.
- Stadtman E. and Levine R. (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." *Amino Acids*, Vol. 25, 207–18.
- Stephan D., et al. (1999). "Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the  $\gamma$ D-crystallin gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 1008–1012, *Genetics*.
- Stroo E., et al. (2017). "Cellular Regulation of Amyloid Formation in Aging and Disease." *Front. Neurosci.* 11:64, doi: 10.3389/fnins.2017.00064.
- Sturmer J. (2009). "[Cataracts - trend and new developments]." *Ther Umsch* 66(3): 167-71.
- Takemoto L. and Sorensen C. (2008). "Protein-protein interactions and lens transparency." *Experimental eye research* 87:496–501
- Thompson J. and Lakhani N. (2015). "Cataract." *Prim Care Clin Office Pract* 42, 409–423.
- Toichi K., et al. (2013). "Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis." *J Biol Chem* 288:4970–4980.
- Torriglia A. and Zigman S. (1988). "The effect of near-UV light on Na-K-ATPase of the rat lens." *Current Eye Research*, Volume 7, number 6.
- Truscott R. (2005). "Age-related nuclear cataract—oxidation is the key." *Experimental Eye Research* 80, 709–725.
- Ung A. and Back R. (1984). "The Photolysis of Water Vapor and Reactions of

Hydroxyl Radicals." *Canadian Journal of Chemistry*, Volume 42.

- Truscott R. (2005). "Age-related nuclear cataract - Oxidation is the key." *Experimental Eye Research* 80:709–725.
- Vabulas R., et al. (2010). "Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response." *Cold Spring Harb Perspect Biol*, doi: 10.1101/cshperspect.a004390.
- Varma S., et al. (1979) "Light-induced damage to ocular lens cation pump: Prevention by vitamin C." *Proc Natl Acad Sci USA*;76:3504-3506.
- Varma S., et al. (2012). "Role of UV Irradiation and Oxidative Stress in Cataract Formation. Medical Prevention by Nutritional Antioxidants and Metabolic Agonists." *Eye Contact Lens*, 37(4): 233–245.
- Vendra V., et al. (2012). "The Mutation V42M Distorts the Compact Packing of the Human Gamma-S-Crystallin Molecule, Resulting in Congenital Cataract." *PLoS ONE* 7.
- Vendra V., et al. (2016). "Gamma crystallins of the human eye lens." *Biochimica et Biophysica Acta* 1860, 333–343.
- Wan-Cheng D. and Spector A. (1997). "Hydrogen peroxide-induced expression of the proto-oncogenes, c-jun, c-fos and c-myc in rabbit lens epithelial cells." *Molecular and Cellular Biochemistry*, 173: 59–69.
- Wang P., et al. (2009). "Hyperoxia-induced lens damage in rabbit: protective effects of Nacetylcysteine." *Molecular Vision*, 15:2945-2952.
- Wang W. (2005). "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics." *International journal of pharmaceutics* 289:1–30.
- West S. and Valmadrid C. (1995). "Epidemiology of Risk Factors for Age-Related Cataract." *Survey of Ophthalmology*, Volume 39, Number 4.
- White H., et al. (1989). "Packing interactions in the eye lens. Structural analysis, internal symmetry and lattice interactions of bovine gamma IVa- crystallin." *J Mol Biol* 207(1): 217-35.

- Wistow G., et al. (1981). "Eye-lens proteins: the three dimensional structure of beta-crystallin predicted from monomeric gamma crystallin." *FEBS Lett* 133(1): 9-16.
- Xie J., et al. (2011). "Mechanistic insight of photo-induced aggregation of chicken egg white lysozyme: The interplay between hydrophobic interactions and formation of intermolecular disulfide bonds." *Proteins: Struct., Funct., Bioinformatics* 79, 2505–2516.
- Xie J., et al. (2012). "Photoinduced fibrils formation of chicken egg white lysozyme under native conditions." *Proteins: Struct., Funct., Bioinformatics* 80, 2501–2513.
- Yang Z., et al. (2014). "Dissecting the contributions of b-hairpin tyrosine pairs to the folding and stability of long-lived human gD-crystallins." *The Royal Society of Chemistry, Nanoscale*, 6, 1797.
- Zigler J. and Rao P. (1991). "Enzyme/crystallins and extremely high pyridine nucleotide levels in the eye lens." *FASEB J* 5(2): 223-5.
- Zigman S., et al. (1976). "Inactivation of catalase by near-UV light." *Mol Cell Biochem*; 11:149-154.
- Zigman S. (1985). "Photobiology of the lens, in H Maisel (ed): *The Ocular Lens: Structure, Function, and Pathobiology*." New York, Marcel Dekker, pp 301-347.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Mor., a 3 de noviembre de 2023

**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
Presente

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: Papel de los triptófanos en la protección al daño por la radiación UV de la cristalina gamma D Humana, que presenta la alumna **Yissell Borges Rodríguez** (10053491) para obtener el título de Maestro en Ciencias.

Director de tesis: Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo  
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Carmen Pastor Colón CIDC - UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC - UAEM	APROBADO	
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT	APROBADO	
Dr. Rodrigo Morales Cueto FCQeI UAEM	APROBADO	
Dr. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO** | Fecha:2023-11-07 23:25:38 | Firmante

JMg+TyiSg7DRYrMNFgQdBUyxDFWQCdBh45Vh7xrZsPgrQp/XR7A3sOWsiGtHsVhG8ws0mVANLGGJtXStyh4gn0GX/rAxlakaygm2daFTWhpCcRZiraVpBBc1kboyYVR7Fx8TIVPodq+A2uEteR8o5SY9lmO7E8pEM40vX17A4GMG1CiiY01DIUiU3J5I91W6GZ3hbWxMsiSjzAfkAB4SbWmBm+2hA7x5EZ+R0URReTzp0JmNSyQSB/wmi5YeOBFKIGuOSTvVsIzCTgtEnrTLrIAjhDhyGlo7vi3EFhRdOC/feYKt6ygPb31K9VZMgji9LlsHfle3EBKuoR2jlpH0mwg==

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha:2023-11-07 23:27:17 | Firmante

ZKuydqYueB1hH85TXKr6b8mwiupobcXmVah6Bsw6u5Vt6TrRHsOKn1L+9JmmmWjNR3mOM1xXaEdq70bNcFEMZwJqF4IzTVfDg69feoBeo9kARBYuPtjY42PIfuNuqqSkquKQxNO3CtIglgqUAtUu8Gf/EvBYj/8uSfeJNpQi930hEX1wJMsCF1IOA/vSEOWChdmL9hPk0yMv8Y6bdkuxFdgHh3qGPCe5WfzP35DkSQTKis8WHY86o+Xs9SQsUrFlq4w0JDS7k1RrghXQpKuFeBykFWS6/mV8iSyLONCINz8A/6k0Wc7HaJXINTREvJ4ntfCx02ySeDPA2CNq9GkUA==

**RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ** | Fecha:2023-11-07 23:33:46 | Firmante

MiGLOywl5uvuNMbEhmU2knpEOhFJ6uYgHm18wiYRadK0v2/U12ecmxj2YGn4qwCnw/2ySRIOSB5jWfG78RFuoD8UI5FXIrCdvSFyaPCX2v2jb/b9H98hWAE0eCd03nlm19kT1XqScDNOhq89hri646YzO1e9n3Wp9OMglPXJ1P5VvYFeU39+3Vr5KNeirqlzjraCkLvYDKw5ihsT9vqZC+0VpQuEGITAX5xPrKXO/L/pEKWbtp5znUlywm09fgYnfj9IN82Gq+MgalQEC6ZsG8rUroPq/57InNaA8fDM0jv5GaA+INj1tq73EFfSbb128Cw1RjFv2ucRff4I5K5w==

**ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA** | Fecha:2023-11-08 12:50:10 | Firmante

EBR8Ryzn2kGkER10GnPkQVIsDsdeUc1T5uPsY+Ujp18JxYGISWmvcINVirBjcFPI+N71kahqFn6x10lu1jckgW3Ky9KJcXv1aUkGJUTruLxsVxQMPpy5uXdiOBOvZMgg7tXt9sCuTL99r8G+xZSgojdtc9sHC9WdKoB9CSD3GHxXBly39VF+WQ0a7/fIGzPHFumlA0HTzoI9MdkC4Z7QGGaOoPPN+6BJ6xiEzEvh/IDYgwZdpXHEV7mZsvgF70mua8R8f9nEFjRA8QpJvtQdArHjAhJcsfhnIZShAf2z8/tBYta37LUV42C+NtUOvrhMo+XIKbQ39Gsm+94gXJN4Q==

**RODRIGO MORALES CUETO** | Fecha:2023-11-08 18:14:56 | Firmante

1EigrBBC865KtSZI/GM0pmiXKEZb+w6v4VRcYPF5GbfWexfnHyI+JSL4LVEfbX63YDIB7Tgoup6XWmMq5ZUYXc8RjWCG1NM6Lx3pX6mduLuJBNg/Uqzd4Uu2zvcAesoustzhCdNoobGgtei51QKwf4kbNJe6WifEZVOC7YKpoa0tTIFjyt3Di1mF2xTaScwD/Q6UDBW59fyUFJjCyiIGvGup6yHR2ftMbUKEPB/ALvjT3iM0ZNRtCm23LkKg23R+VV0RInrOnaJH3dB6p3IVBSHcpDhsuruuepK6/6Y/pQaVftLLNpiw69L+kV0fa/+q2+XTiWKGz5BtSPqMmz2bqEA==

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



kXNWy5SP1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dQjIdHX9Hp2ZgvOyNYSKlaKjuvfHPH6R>

