



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
POSGRADO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

**“Estructura de proteínas desnaturalizadas
termicamente”**

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Química)

P R E S E N T A :

Brenda Esther Reyes Sánchez

Matricula: 2221801129

Correo: brenda.reyes.san1009@gmail.com

Directores de tesis:

Dra. Liliana Irais Vera Robles

Dr. Andres Hernández Arana

Jurado:

Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana

Secretario: Dr. Leonardo David Herrera Zuñiga

Vocal: Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza



IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO, A 13 DE AGOSTO DEL 2025

Miembros del comité de seguimiento

Este trabajo de tesis fue aprobado por el siguiente comité:

- Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana
Profesor Titular C adscrito al área de Biofísicoquímica del
Departamento de Química
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. SNII III.
`aha@xanum.uam.mx`
- Secretario: Dr. Leonardo David Herrera Zuñiga
Profesor Titular adscrito al Departamento de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. SNI I.
- Vocal: Dra. Claudia G. Benítez Cardoza
Responsable del Laboratorio de Investigación Bioquímica
Instituto Politécnico Nacional. SNII II.
`cbenitez@ipn.mx`, `beni1972uk@gmail.com`

Declaración del autor

Yo, **Brenda Esther Reyes Sánchez**, declaro bajo protesta de decir verdad que el presente trabajo de tesis titulado “**Estructuras de proteínas desnaturalizadas térmicamente**” es de mi autoría y constituye un esfuerzo original.

Afirmo que este documento no ha sido presentado anteriormente para la obtención de ningún grado académico y que todas las fuentes utilizadas han sido debidamente citadas conforme a las normas establecidas.

Asimismo, otorgo a la **Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa**, permiso para reproducir y difundir, total o parcialmente, esta tesis con fines estrictamente académicos y de investigación, reconociendo en todo momento mi autoría.

Iztapalapa, Ciudad de México, 13 de agosto 2025.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)**, anteriormente CONAHCYT, por la beca número **CVU 1156528**, que me permitió realizar mis estudios de maestría con apoyo institucional.

Agradezco profundamente al **Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa**, por brindarme la formación académica y el entorno propicio para el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores, la **Dra. Liliana Irais Vera Robles** y el **Dr. Andrés Hernández Arana**, por su guía, paciencia y motivación constante a lo largo de este trabajo.

A los miembros del jurado sinodal, por sus valiosas observaciones críticas y por el tiempo dedicado a enriquecer esta tesis.

Mi gratitud también va dirigida al **Laboratorio de Espectrometría de Masas de la UAM-Iztapalapa**, y de manera especial a la **Dra. Mónica Rincón**, por su apoyo técnico y colaboración durante los ensayos con espectrometría.

Finalmente, agradezco a todas las personas e instituciones que apoyaron este proyecto, ya sea con conocimientos, logística o estímulo, y contribuyeron a que esta tesis fuera posible.

Dedicado a...

A mis padres, quienes son y siempre serán mi mayor orgullo y bendición. Gracias por ser mi guía y mi ejemplo, por mostrarme desde pequeña que el esfuerzo y la constancia abren caminos que a veces parecen imposibles. Cada palabra de aliento, cada consejo y cada sacrificio que hicieron por mí han sido el pilar sobre el cual he construido este logro.

Ustedes me enseñaron que el verdadero valor no está en la facilidad de las cosas, sino en la fortaleza para levantarse después de cada caída. Me mostraron con su ejemplo que los sueños no se alcanzan solos, que requieren disciplina y constancia, pero también que siempre se debe actuar con humildad y con el corazón lleno de bondad.

Gracias por cada desvelo, por cada consejo, por creer en mí incluso cuando yo misma dudaba, por aplaudir mis triunfos y también por sostenerme en mis caídas. Gracias por darme raíces para no olvidar de dónde vengo y alas para atreverme a volar hacia dónde deseo.

Este logro que hoy celebro no es solo mío: es también suyo, porque cada logro mío es fruto de todo lo que ustedes sembraron en mí desde el primer día. Por eso, queridos padres, lo entrego a ustedes como una corona: una corona forjada de la luz que ustedes sembraron en mi corazón. Si hoy brillo, es solo reflejo de la luz que me dieron. Y que si hoy llego hasta aquí, es porque caminé con el amor, y la guía de los mejores padres que la vida pudo darme.

A mi familia, quienes siempre me han acompañado en las alegrías y también en los momentos difíciles. Gracias por las risas compartidas, por los abrazos cuando las palabras no bastaban, y por recordarme siempre que el verdadero valor de los logros no está solo en alcanzarlos, sino en tener con quiénes compartirlos. Su amor ha sido un refugio y una motivación constante en este camino.

A mi novio, mi compañero y mi cómplice en esta etapa tan importante. Gracias por caminar a mi lado, por escucharme cuando lo único que necesitaba era desahogarme, por animarme a seguir adelante cuando me sentía cansada y por celebrar conmigo cada pequeño avance como si fuera el más grande triunfo. Tu amor, paciencia y confianza en mí me han dado fuerzas en los momentos en los que creía que ya no podía más.

A todos ustedes, que forman parte de mi vida y de mi corazón, dedico este logro. Porque cada página de este trabajo lleva impreso un pedacito de su apoyo.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar los estados térmicamente desnaturalizados (DT) de proteínas con estructuras secundarias diferentes o similares, y analizar cómo estas estructuras responden a diferentes condiciones de pH. Se estudiaron la lisozima de clara de huevo, la mioglobina de equino y su apoproteína (apomioglobina), mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD), fluorescencia intrínseca y análisis estructurales bioinformáticos. Los resultados indican que la lisozima, con dominios de estructura nativa de hélice alfa y hoja beta antiparalela, mostró una mayor sensibilidad con el pH del medio: en condiciones alcalinas (pH 10.0), su estado DT presentó mayor contenido de segmentos beta ($f\beta = 0.32$), en comparación con su estado nativo al mismo pH ($f\beta = 0.08$); en contraste, en condiciones neutras (pH 7.0) el estado DT mostró alto contenido de estructura desordenada. Los espectros de fluorescencia respaldaron estos hallazgos, sugiriendo agregación parcial y formación de estructuras intermoleculares a pH alcalino.

Por otro lado, la mioglobina y la apomioglobina, que no tienen contenido de segmentos beta en el estado nativo, mantuvieron un alto contenido de hélices alfa a temperatura ambiente. Sin embargo, al someterlas a la desnaturalización térmica, ambas proteínas desarrollaron estados DT con mayor contenido de estructura no ordenada en los tres pH estudiados, lo que indica una mayor tendencia a formar estados DT desplegados. Estos resultados contradicen reportes previos que sugieren posibles transiciones $\alpha - \beta$ en la apomioglobina [1].

Se propone que un primer factor que influye en la formación de estructura beta en estados DT depende de la preexistencia de dicha estructura en la conformación nativa, como ocurre con la lisozima. Al comparar con datos de la proteína yTIM, que presenta un comportamiento inverso al de la lisozima frente al pH, se infiere que un segundo factor importante lo constituye la combinación de una menor hidrofobicidad (índice GRAVY) y una mayor carga neta promedio, las cuales favorecen la desorganización estructural y, por lo tanto, un mayor contenido de estructura desordenada.

Lista de Abreviaturas y símbolos

°C	Grados Celsius
μm	Micrómetro
ACN	Acetonitrilo
CV	Volumen de columna
Da	Dalton
DA	Estado desnaturalizado en medio ácido
DC	Dicroísmo circular
DF	Estado desnaturalizado a baja temperatura
DT	Estado desnaturalizado a alta temperatura
EtOH	Etanol
f α	Fracción de estructura helicoidal (helices-alfa)
f β	Fracción de segmentos beta
fNO	Fracción de estructura no ordenada
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
kDa	Kilodaltons
N	Estado nativo
nm	Nanómetros
PBS	Buffer de fosfatos
PDB	Protein Data Bank
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TFA	Ácido trifluoroacético
U	Estado completamente desplegado
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta-visible
V	Voltaje en volts
yTIM	Triosafosfato isomerasa de levadura

Índice General

Lista de Abreviaturas y Símbolos	VI
Índice de tablas	X
Índice de figuras	XII
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Proteínas	1
1.2 Estructura nativa de las proteínas	1
1.3 Niveles de jerarquización de las proteínas	2
1.4 Agentes desnaturalizantes de proteínas	3
1.5 Estados desnaturalizados y proteínas parcialmente plegadas	4
1.6 Estados desnaturalizados térmicamente (a alta temperatura)	5
1.7 Lisozima	6
1.8 Mioglobina y Apomioglobina	7
Capítulo 2. Justificación	9
Capítulo 3. Objetivos	10
Capítulo 4. Materiales y Métodos	11
4.1 Proteínas utilizadas	11
4.2 Reactivos	12
4.2.1 Reactivos para Cromatografía de Exclusión Molecular	12
4.2.2 Reactivos para Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	12
4.2.3 Reactivos para Espectrometría de masas	13
4.2.4 Reactivos para Dicroísmo Circular y Espectrometría de Fluorescencia	13
4.2.5 Otros Reactivos	13
4.3 Métodos de Caracterización	14
4.3.1 Cromatografía de exclusión molecular	14
4.3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida	14
4.3.3 Espectrometría de masas	15

4.3.4	Dicroísmo circular (DC)	15
4.3.5	Espectrometría de fluorescencia	16
4.4	Herramientas bioinformáticas y bases de datos utilizadas	16
Capítulo 5.	Resultados	20
5.1	Resultados de lisozima	20
5.1.1	Espectrometría de masas en lisozima	21
5.1.2	Dicroísmo Circular obtenidos con lisozima	22
5.1.3	Fluorescencia de la lisozima	26
5.1.4	Grupos protonables en lisozima	28
5.2	Resultados de Mioglobina y apomioglobina	29
5.2.1	Espectrometría de masas de las proteínas de mioglobina y su apo- proteína	30
5.2.2	Dicroísmo Circular de las proteínas de Mioglobina y Apomioglobina	32
5.2.3	Fluorescencia de la mioglobina	38
5.2.4	Fluorescencia de la apomioglobina	40
5.2.5	Grupos protonables en Mioglobina	42
Capítulo 6.	Discusión y análisis de resultados	43
6.1	Lisozima	43
6.1.1	Contribución a la estabilidad de la proteína	43
6.1.2	Análisis de la desnaturalización térmica de lisozima por DC	48
6.1.3	Análisis de la desnaturalización térmica de lisozima por fluorescencia	48
6.1.4	Contribución de los grupos protonables a la estabilidad de la lisozima	49
6.1.5	Comparación de los estados desnaturalizados térmicamente: influen- cia del pH y de la naturaleza estructural de las proteínas	50
Capítulo 7.	Conclusiones y perspectivas	54
7.1	Conclusión General:	54
7.2	Conclusión para cada proteína en particular:	54
7.3	Perspectivas	54
Capítulo 8.	Referencias	56
Apéndice A.	Lisozima de clara de huevo	61
A.1	Fluorescencia	61
A.2	Grupos protonables	62
A.3	Calculo de la Carga neta promedio	63
Apéndice B.	Mioglobina de equino y su apoproteína	66

B.1	Fluorescencia en mioglobina	66
B.2	Grupos protonables mioglobina	67
B.3	Fluorescencia en apomioglobina	68
Apéndice C. Cálculo de ΔpK_a con temperatura mediante la ecuación de Van't Hoff		69
Anexo A.	Entalpías estándar de ionización de residuos protonables utilizadas en el cálculo de ΔpK_a	71

Índice de tablas

4.1	Datos de las proteínas, obtenidos de la página <i>Expasy Protparam</i> https://web.expasy.org/protparam/	11
5.1	Contenido de estructuras secundarias (fracciones) en lisozima nativa 25°C. ^a Datos obtenidos de UniProt [2], basados en la determinación por difracción de rayos-X de la estructura cristalina de la lisozima. ^b Datos obtenidos del espectro DC, con los métodos en el servidor online <i>Dichroweb</i> (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml) [3, 4, 5], usando el set de referencia 4 [6, 7]. ^c Datos obtenidos del espectro DC con el método del servidor online <i>BestSel</i> (https://bestsel.elte.hu/index.php) [8, 9, 10, 11, 12, 13]. El término ^d NRMSD (normalized-root-mean-square deviation) es una medida de las diferencias de valores de un espectro experimental y su correspondiente espectro calculado por el método de análisis correspondiente).	23
5.2	Fracciones de estructura secundaria de lisozima a 25 °C en diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos por los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con el set de referencia 4. Entre paréntesis se encuentra la desviación al valor promedio.	24
5.3	Fracciones de estructuras secundarias en la lisozima desnaturalizada térmicamente, a los diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos mediante los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con los diferentes sets de referencia. La desviación respecto al valor promedio se indica entre paréntesis.	26
5.4	Cálculo de pKa (25 °C) y Δ pKa (80 °C) de los grupos ionizables en la proteína de lisozima a pH 7, usando el modelo cristalografico PDB ID:193L [14].	29
5.5	Contenido de estructuras secundarias (fracciones) de mioglobina y apomioglobina nativa a 25 °C pH 7.	34
5.6	Fracciones de estructura secundaria de mioglobina y apomioglobina a 25 °C a diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos por los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con el set de referencia 4. Entre paréntesis se encuentra la desviación al valor promedio.	35

5.7	Fracciones de estructura secundaria de mioglobina y apomioglobina desnaturalizadas a diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos por los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con el set de referencia 7. Entre paréntesis se encuentra la desviación al valor promedio.	38
5.8	Cálculo de pKa (25°C) y Δ (80°C) de los grupos ionizables en la proteína de mioglobina a pH 7, usando como modelo cristalografico el PDB ID: 2FRF [15].	42
A.1	Residuos protonables de lisozima de clara de huevo, obtenidos con el programa <i>Propka</i> [16] y sus valores de ΔpK_a (Apéndice C).	62
A.2	Determinación de la carga neta promedio a temperatura ambiente y a alta temperatura en los diferentes pH.	65
B.1	Residuos protonables de mioglobina, obtenidos con el programa <i>Propka</i> [16] (estos residuos tambien aplican para su apoproteína, ya que tienen la misma secuencia de aminoácidos) y sus valores de ΔpK_a (Apéndice C).	67

Índice de figuras

1.1	Espectros de DC de algunos tipos de estructura secundaria (panel de la izquierda) y de ciertas proteínas con diferentes contenidos de estructuras secundarias (panel de la derecha). Figura tomada de la referencia [17].	3
1.2	Espectros de dicroísmo circular de la triosafosfato isomerasa desnaturalizada térmicamente (temperaturas de 54 a 58 °C), en condiciones de pH indicadas en el cuerpo de la figura. Se muestra también el espectro diferencial de ambas formas. Figura adaptada de la referencia [18].	6
1.3	A) Dominios, estructura terciaria lisozima. Imagen tomada de (Pratibha Kumari, 2020)[19]. B) Estructura secundaria lisozima. Imagen creada con PyMOL v2.5.5 [20, 21, 22] del PDB ID: 193L [14].	7
1.4	Estructura secundaria de la proteína Mioglobina y el grupo hemo. Imagen creada con PyMOL v2.5.5 [20, 21, 22] del PDB ID: 2FRF. [15]	8
5.1	Cromatograma de lisozima a pH 7, siguiendo la señal UV a 280 nm. La cromatografía se realizó en una columna de exclusión molecular (Hiload 16/600 Superdex).	20
5.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida Bis-Tris (4-20 %), de las proteínas lisozima, mioglobina y apomioglobina.	21
5.3	Espectro de masas de la lisozima obtenido por MALDI-TOF en el rango de 6000 Da a 16 000 Da. El pico principal a 14 303 Da corresponde a la forma intacta de la proteína. También se observa un pico en 7148.96 Da, posiblemente asociado a una especie con doble carga (2+).	22
5.4	Espectros DC de lisozima nativa; 25 °C; pH 2.0 (línea negra), 7.0 (línea roja) y 10.0 (línea azul), respectivamente.	23
5.5	Transiciones térmicas de lisozima nativa a desnaturalizada; pH 2.0 desde los 25 °C a 70 °C (línea negra), pH 7.0 desde los 25 °C a 84.6 °C (línea roja) y pH 10.0 desde los 25 °C a 82.8 °C (línea azul). Las gráficas se normalizaron para efectos de comparación.	24
5.6	Espectros DC de lisozima desnaturalizada térmicamente a diferentes valores de pH. pH 2.0 a 70 °C, pH 7.0 a 84.6 °C y pH 10.0 a 82.8 °C.	25

5.7	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de lisozima a pH 7, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.	27
5.8	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de lisozima a pH 10, excitando a 280nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme aumenta la temperatura.	28
5.9	Cromatograma de mioglobina a pH 7. La cromatografía se realizó en una columna de exclusión molecular (Hiload 16/600 Superdex).	29
5.10	Espectros de masas de mioglobina y apomioglobina obtenidos mediante MALDI-TOF en un rango de 0 a 60,000 m/z. Se observa un pico principal en torno a 16 950 Da para ambas proteínas. Señal de que el grupo hemo se ha separado de la mioglobina.	31
5.11	Espectros de masas en el intervalo bajo (100–1100 m/z) correspondientes a la detección del grupo hemo. En la muestra de mioglobina se observa un pico en 616.26 Da, el cual corresponde a la masa del grupo hemo dissociado.	32
5.12	Espectros DC de mioglobina nativa a 25 °C; pH 2.0 (línea negra), pH 5 (línea roja) pH 7.0 (línea azul) y pH 10.0 (línea verde), respectivamente.	33
5.13	Espectros DC de apomioglobina nativa a 25 °C; pH 2.0 (línea negra), pH 5 (línea roja) pH 7.0 (línea azul) y pH 10.0 (línea verde), respectivamente.	33
5.14	Transiciones térmicas de mioglobina nativa a desnaturalizada; pH 5.0 desde los 25 °C a 86 °C (línea negra), pH 7.0 desde los 25 °C a 88 °C (línea roja) y pH 10.0 desde los 25 °C a 76°C (línea azul). Las gráficas se normalizaron para efectos de comparación.	35
5.15	Transiciones térmicas de apomioglobina nativa a desnaturalizada; Apomioglobina: pH 5.0 desde los 25 °C a 86 °C (línea negra), pH 7.0 desde los 25 °C a 86.6 °C (línea roja) y pH 10.0 desde los 25 °C a 86.6 °C (línea azul). Las gráficas se normalizaron para efectos de comparación.	36
5.16	Espectros DC de mioglobina desnaturalizada termicamente a los diferentes valores de pH estudiados; pH 5.0 a 86 °C (línea negra), pH 7.0 a 88 °C (línea roja) y pH 10.0 a 76 °C (línea azul). Las gráficas se ajustaron con la altura del inicio del espectro a pH 7 para efectos de comparación.	37

5.17	Espectros DC de apomioglobina desnaturalizada termicamente a diferentes valores de pH; pH 5.0 a 86 °C (línea negra), pH 7.0 a 86.6 °C (línea roja) y pH 10.0 a 86.6°C (línea azul). Las gráficas se ajustaron con la altura del inicio del espectro a pH 7 para efectos de comparación.	37
5.18	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de mioglobina a pH 7, excitando a 280 nm. En las gráficas pequeñas a la derecha se visualiza de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como, la disminución de la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.	39
5.19	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de mioglobina a pH 10, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.	40
5.20	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de apomioglobina a pH 10, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.	41
6.1	Representación de las interacciones intramoleculares en la secuencia de aminoácidos de la lisozima. La imagen fue generada a partir del análisis estructural con <i>PDBsum</i> (https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/) [23] y editada con <i>BioRender</i> (https://www.biorender.com/).	44
6.2	Tabla y representación tridimensional de los diferentes <i>clústers</i> de redes de hidrógeno. En la tabla se indican los residuos que participan como donadores y aceptores en los puentes de hidrógeno dentro de cada <i>clúster</i> identificados en la plataforma <i>ProteinTools</i> (https://proteintools.uni-bayreuth.de/) [24], usando como referencia el modelo cristalografico PDB ID: 193L [14]. La representación tridimensional de las redes de puentes de hidrógeno fue visualizada en <i>PyMOL</i> [20, 21, 22].	45
6.3	Representación de los <i>clústers</i> hidrofóbicos de la lisozima a partir de la información obtenida en <i>ProteinTools</i> [24] y representados mediante <i>PyMOL</i> [20, 21, 22] utilizando el modelo cristalográfico de la lisozima (PDB ID: 193L [14]). Los residuos hidrofóbicos que forman el núcleo principal se muestran en rojo (clúster 1), el clúster hidrofóbico secundario se visualiza en verde (clúster 2).	46

6.4	Puente salino en la proteína de lisozima, formado entre el grupo Glu 7 y Lys 1. Obtenida con el programa <i>ProteinTools</i> [24] y visualizado a través del software <i>PyMol</i> [20, 21, 22], (PDB ID: 193L [14]).	47
6.5	Carga neta promedio versus hidropatía en lisozima (azul) y yTIM (negro). La carga neta promedio se expresa como el valor absoluto de la carga total dividida entre el número de aminoácidos. La hidropatía se calculó usando ProtParam (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam) [25] que proporciona el índice GRAVY; en esta escala, el carácter hidrofóbico aumenta hacia la derecha.	53
A.1	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de lisozima a pH 2, excitando a 280nm. Las gráficas pequeñas ilustran de forma más clara el comportamiento espectral, conforme incrementa la temperatura. 61	
B.1	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de mioglobina a pH 5, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.	66
B.2	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de apomioglobina a pH 5, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.	68
B.3	Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de apomioglobina a pH 7, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.	68

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas compuestas por aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos, que cumplen diferentes funciones en el cuerpo y son indispensables para el desarrollo del trabajo de la mayoría de las células. La actividad de cada proteína depende de la secuencia específica de aminoácidos que la conforma, ya que esta determina su estructura tridimensional. Dicha estructura es crucial para que la proteína pueda llevar a cabo su función correctamente; incluso un pequeño cambio en la secuencia puede alterar su forma y, por tanto, su actividad biológica.

Existen muchas proteínas diferentes, y cada una tiene su función específica. Algunas aceleran las reacciones químicas como enzimas; otras regulan procesos fisiológicos, como hormonas, por ejemplo, la insulina; otras forman la estructura de las células, etc.

El orden y el tipo de aminoácidos en una proteína definen sus propiedades químicas y físicas, como solubilidad, estabilidad y afinidad por otras moléculas. Por esa razón, la comprensión sobre su estructura y secuencia es muy importante para comprender su funcionamiento y el desarrollo de muchas enfermedades.

1.2. Estructura nativa de las proteínas

La conformación plegada o nativa de las proteínas corresponde a su estructura tridimensional compacta, en la cual la proteína adopta la configuración necesaria para desempeñar su función biológica. Desde el punto de vista estructural, el estado nativo se caracteriza por la presencia de elementos de estructura secundaria bien definidos, como hélices α , hojas β y giros, las cuales se ensamblan en una estructura terciaria estable. Esta conformación se mantiene mediante interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, interacciones

hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y en algunos casos, por puentes disulfuro [26].

El estado nativo es considerado termodinámicamente el más estable bajo las condiciones fisiológicas en las que la proteína realiza su función. Aunque se dice que es relativamente estable, ya que puede desplegarse (o desnaturalizarse) de manera espontánea bajo ciertas condiciones (como cambios de pH, temperatura o la presencia de agentes desnaturalizantes). En el estado desplegado, la proteína pierde su estructura terciaria, y por lo tanto, su funcionalidad; su cadena polipeptídica se encuentra en una conformación extendida o parcialmente desordenada en la que se pierden las interacciones que estabilizan el estado nativo.

Muchas proteínas pueden plegarse nuevamente de forma rápida y eficiente bajo condiciones adecuadas, a través de un proceso de autoensamblaje, ya que toda la información necesaria para alcanzar su estructura nativa está codificada en su secuencia de aminoácidos.

Además, se ha demostrado que las cadenas polipeptídicas son capaces de adoptar conformaciones diferentes. Dado que las proteínas se pliegan rápidamente, se ha propuesto que se pliegan a partir de todas las conformaciones posibles hasta encontrar la que tiene la energía libre más baja y por tanto la más estable [26, 27].

1.3. Niveles de jerarquización de las proteínas

En las proteínas se distinguen 4 niveles estructurales de organización: secuencia de aminoácidos (estructura primaria); conformaciones regulares y periódicas de ciertos segmentos (estructura secundaria); estructura tridimensional o plegada (estructura terciaria); y, en algunos casos, asociación de varias cadenas plegadas que pueden ser iguales o no (estructura cuaternaria).

Entre los diferentes tipos de estructura secundaria más comunes se encuentran las hélices alfa, los segmentos beta, los giros beta, y la conformación irregular. Estos tipos estructurales son distinguibles por las formas características de sus espectros de dicroísmo circular (DC) en la región del UV lejano, entre 250-190 nm (Fig. 1.1). Por otra parte, las señales de DC en la región del UV cercano y la emisión de fluorescencia se han interpretado como indicadores del microambiente, dentro de la estructura tridimensional, de algunos residuos de aminoácidos (con carácter aromático).

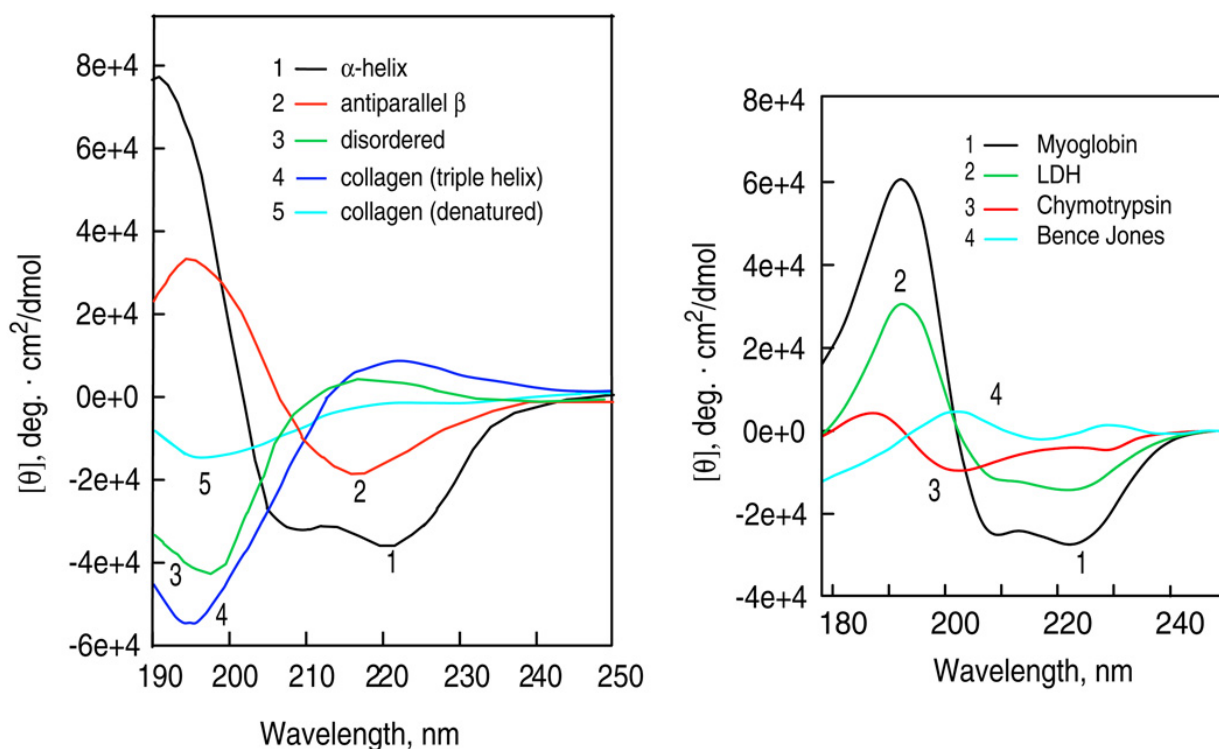


Figura 1.1: Espectros de DC de algunos tipos de estructura secundaria (panel de la izquierda) y de ciertas proteínas con diferentes contenidos de estructuras secundarias (panel de la derecha).

Figura tomada de la referencia [17].

1.4. Agentes desnaturizantes de proteínas

Cuando una proteína pierde su estructura tridimensional o nativa, debido a agentes desnaturizantes externos, la proteína entra en un estado desplegado o desnaturizado, de manera que ya no puede cumplir con su función biológica y, en muchos casos, esta pérdida estructural puede ser irreversible.

El estado nativo de las proteínas puede verse afectado por cambios en el ambiente o por la adición de agentes desnaturizantes; algunas de las causas que inducen la desnaturización son: cambios en la temperatura, un aumento de energía cinética en la proteína aumenta las vibraciones en las moléculas que rompen con los enlaces, induciendo la desnaturización. Cambios en el pH provocan un desequilibrio ácido-base y, en algunos casos, desestabilizan a la proteína. Adición de agentes químicos como la urea en altas concentraciones y el cloruro de guanidinio (6M), provocan la desnaturización de la proteína al debilitar las interacciones hidrofóbicas y competir con los puentes de hidrógeno intramoleculares [28].

1.5. Estados desnaturalizados y proteínas parcialmente plegadas

Los métodos de dicroísmo circular (DC) y fluorescencia han sido ampliamente usados desde hace décadas para el estudio en solución de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos) y partículas biológicas nanométricas (por ejemplo, virus). Sin embargo, la versatilidad experimental de dichos métodos ha hecho que una parte sustancial de estos estudios comprenda estados o conformaciones estructurales que no corresponden a la forma o especie nativa, así como a los procesos moleculares que involucran cambios conformacionales importantes debido a variaciones en pH, temperatura, composición del disolvente, interacciones con ligandos, etc.[27, 29].

Cuando los cambios estructurales conllevan pérdidas notables de las estructuras terciaria y secundaria se habla de un desplegamiento (unfolding) de la molécula; al proceso en el que se regeneran las características estructurales de la forma nativa se le llama replegamiento o simplemente plegamiento (folding). En los casos de proteínas de masa molecular pequeña, es usual encontrar que solamente existen dos ensambles de conformaciones, muy diferentes entre sí, que están poblados significativamente durante la trayectoria de un proceso de unfolding-refolding [27, 29]. De igual forma, se han aplicado a la caracterización estructural de las llamadas proteínas intrínsecamente desplegadas. Estas proteínas, a pesar de no tener estructuras definidas, en condiciones fisiológicas, tienen un papel importante en varios tipos de reconocimiento molecular [30].

Ya que la estabilidad de las moléculas de proteína es solamente marginal (es decir, la diferencia de energía libre entre el estado nativo (N) y los estados desnaturalizados es de unos 15 a 20 kJ/mol, es razonable esperar que, dependiendo del tipo de proteína y de las condiciones de su ambiente, se forme un ensamble de estados intermedios desnaturalizados, diferentes a N y al estado completamente desplegado (U). Entre los diferentes estados desnaturalizados se han descrito como principales los siguientes: estado desnaturalizado en medio ácido (DA), a alta temperatura (DT), a baja temperatura (DF), y en presencia de cloruro de guanidinio 6 M; este último sería el que representa realmente el estado completamente desplegado (U),[31]. Se debe señalar que los estados desnaturalizados ya mencionados tienen estructuras secundarias notablemente diferentes a la del estado nativo.

Se conoce por otra parte, que varios tipos de estados desnaturalizados tienen papeles clave en el reconocimiento molecular, el alosterismo, así como en patologías como la formación de placas amiloides [32].

1.6. Estados desnaturalizados térmicamente (a alta temperatura)

En este proyecto nos enfocaremos en el estudio de estados desnaturalizados térmicamente (DT). En el caso de proteínas de tamaño pequeño (de 10 a 25 kDa) se ha descrito [33] que sus espectros de DC, en el UV-lejano, presentan una forma típica cuyas características son: una banda negativa, relativamente intensa (-10 a -12×10^3 grados $cm^2 dmol^{-1}$), centrada entre 202 y 204 nm; acompaña a esta banda un hombro amplio de magnitud aproximada -5×10^3 grados $cm^2 dmol^{-1}$. Sin embargo, se ha reportado que este tipo de espectro aparece también en la forma DT de una proteína dimérica de mayor tamaño que es la triosafosfato isomerasa de levadura (yTIM), aunque solamente en soluciones con valor de pH superior a 9.0 [18].

La Figura 1.2 muestra los espectros de la forma DT de la triosafosfato isomerasa a pH de 9.0 y de 6.7. Como puede observarse, el espectro en pH 6.7 difiere notablemente del espectro en pH 9.0, lo cual indica la presencia de estructura secundaria residual en la forma DT en pH 6.7. Los contenidos de estructura secundaria en ambas formas DT se han determinado [18] por medio de dos algoritmos comunes, implementados en el servidor online *DichroWeb* [3, 4, 5]. Los resultados indican que, cuando se emplea una base de espectros DC de referencia que incluye varias proteínas desplegadas, la forma DT a pH 9.0 contiene significativamente más estructuras desordenadas (fracción igual a 0.41) que la forma DT a pH 6.7 (fracción igual a 0.30).

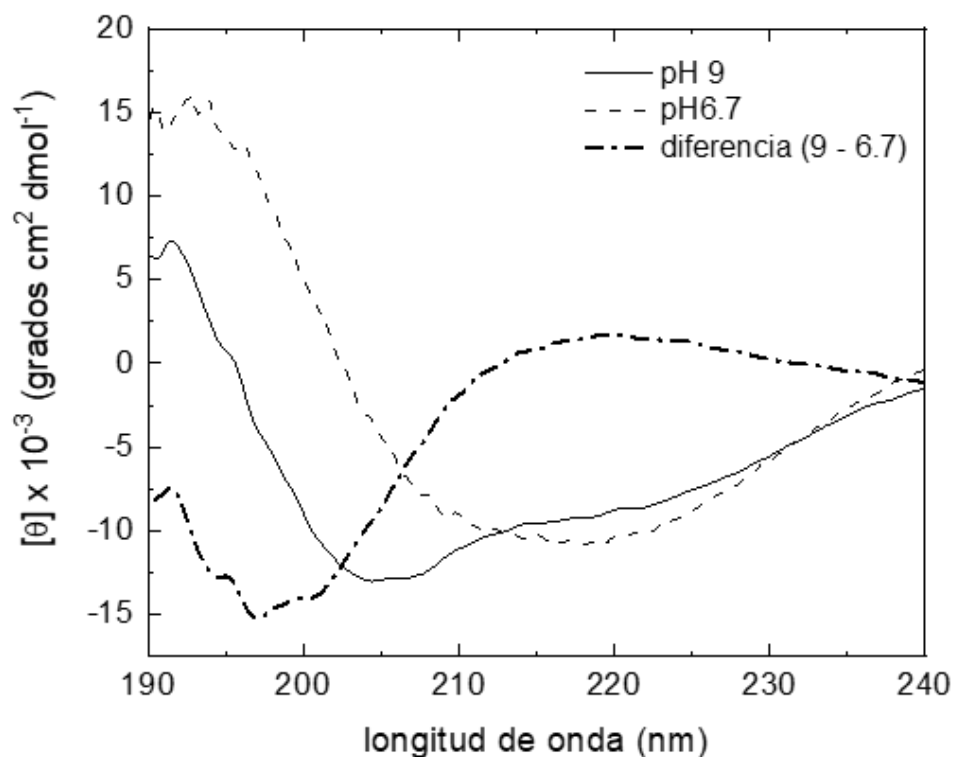


Figura 1.2: Espectros de dicroísmo circular de la triosafosfato isomerasa desnaturalizada térmicamente (temperaturas de 54 a 58 °C), en condiciones de pH indicadas en el cuerpo de la figura. Se muestra también el espectro diferencial de ambas formas. Figura adaptada de la referencia [18].

Un comportamiento similar al de la γ TIM, ha sido reportado para la apomioglobina, proteína de tamaño pequeño (17 kDa), cuya forma DT parece ser diferente a pH 7.0 y pH 9.0 [33]. Sin embargo, la diferencia principal parece ser la formación de mayor cantidad de segmentos beta cuando el pH es 9.0. Cabe mencionar que la estructura nativa de la apomioglobina es muy abundante en hélices alfa, con prácticamente nulo contenido de segmentos beta; estas características han hecho que la apomioglobina sea usada como sistema modelo de transiciones $\alpha \rightarrow \beta$ asociadas con la formación de fibrillas amiloides [1].

1.7. Lisozima

La lisozima de clara de huevo está conformada por 129 residuos con peso molecular de alrededor 14 KDa; en condiciones fisiológicas se encuentra en forma globular compacta, con una hendidura larga en el sitio activo de la proteína.

Su estructura terciaria consta de 2 dominios (Figura 1.3 A).

- Dominio I: del residuo 1-38 y del 88-129
- Dominio II: del residuo 39-87

En la estructura secundaria de lisozima se observan 5 hélices, una de ellas 3_{10} y 2 hojas β antiparalelas (Figura 1.3 B). La hélice 3_{10} y las hojas β se encuentran en el Dominio II. [19]

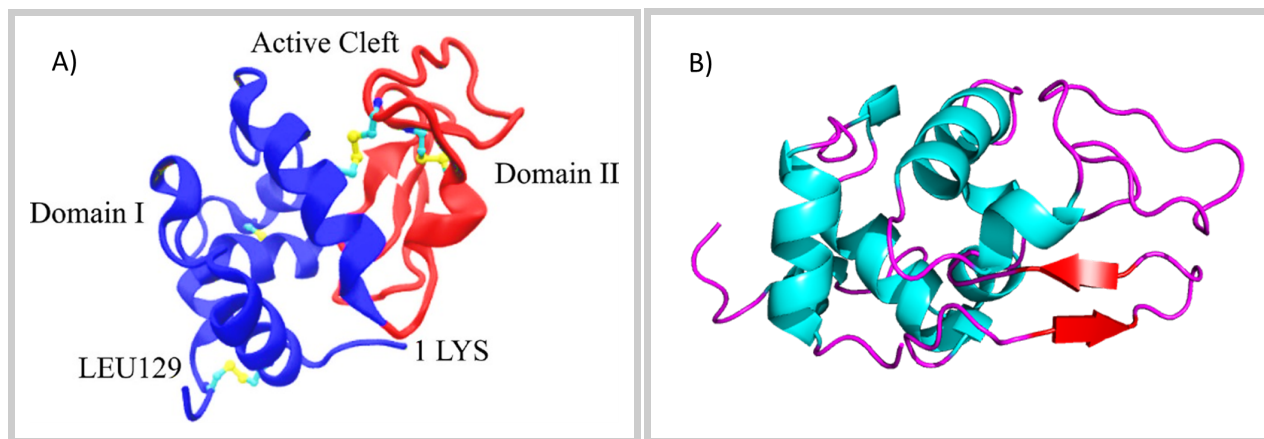


Figura 1.3: A) Dominios, estructura terciaria lisozima. Imagen tomada de (Pratibha Kumari, 2020)[19]. B) Estructura secundaria lisozima. Imagen creada con PyMOL v2.5.5 [20, 21, 22] del PDB ID: 193L [14].

La lisozima es uno de los modelos más estudiados, para comprender los mecanismos de plegamiento y desnaturalización de las proteínas. La lisozima desnaturalizada contiene una mezcla de isómeros conformacionales, que existen en equilibrio termodinámico. Hasta el momento la caracterización de la lisozima se ha logrado en gran parte, midiendo las propiedades termodinámicas de estos isómeros colectivos, utilizando diferentes métodos espectroscópicos, incluido el dicroísmo circular [34, 35].

1.8. Mioglobina y Apomioglobina

La mioglobina, una proteína esencial en el transporte de oxígeno en los tejidos musculares, está conformada por 154 aminoácidos, con un peso de aproximadamente 17 kDa. Esta proteína exhibe una estructura secundaria predominantemente helicoidal, conformando aproximadamente el 75 % de su estructura. Esta estructura está principalmente compuesta por 8 hélices alfa (Figura 1.4). Estas hélices alfa, son estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre los grupos amida de los aminoácidos en la secuencia polipeptídica, se enrollan de manera compacta y ordenada, y mantienen su integridad estructural incluso cuando se

retira el grupo hemo (apomioglobina)[36].

La mioglobina presenta una estructura altamente compacta, donde los residuos hidrofóbicos están orientados hacia el interior de la molécula, mientras que los residuos hidrofílicos o polares se encuentran en la superficie externa. Entre los residuos apolares internos se incluyen leucina, valina, metionina y fenilalanina. Los únicos residuos polares internos son dos histidinas, que desempeñan funciones en el centro activo de la proteína [36, 37].

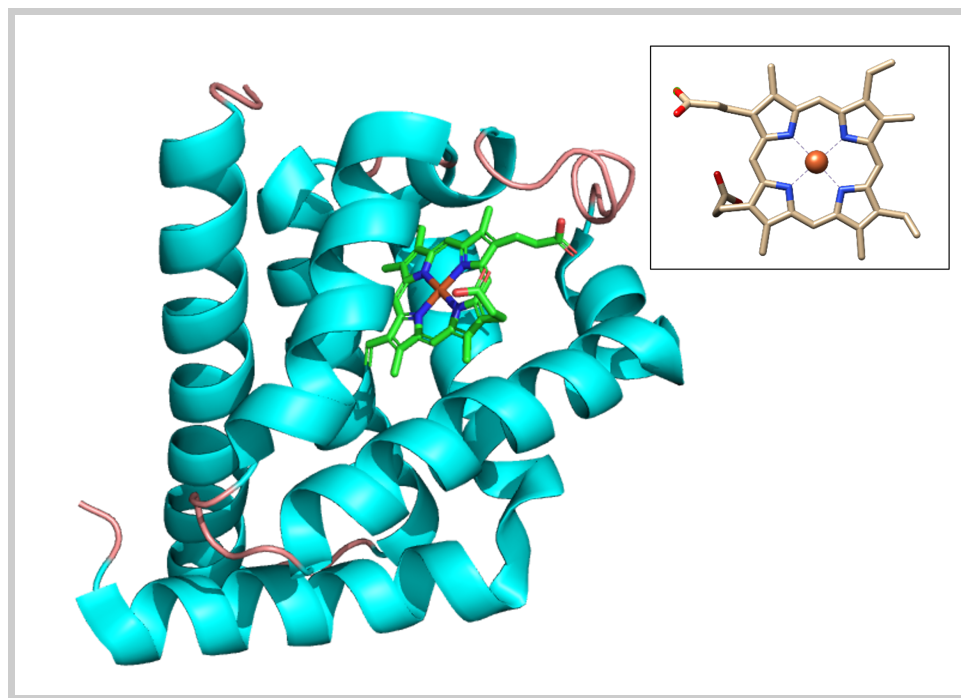


Figura 1.4: Estructura secundaria de la proteína Mioglobina y el grupo hemo. Imagen creada con PyMOL v2.5.5 [20, 21, 22] del PDB ID: 2FRF. [15]

El grupo hemo, se ubica en una hendidura de la parte interna apolar de la cadena polipeptídica de la mioglobina. Este grupo consiste en un anillo tetrapirrólico con un átomo de hierro en el centro. En condiciones biológicas, el hierro se encuentra en forma de ion ferroso (Fe^{2+}), que se une al oxígeno para formar la oximioglobina.

Con relación a la apomioglobina, esta contiene una secuencia de aminoácidos específica, que es la misma que la mioglobina, pero sin el grupo hemo unido. La apomioglobina mantiene una estructura secundaria similar a la mioglobina, predominantemente en hélices alfa. Estas hélices se organizan dando lugar a una estructura terciaria, formando una cavidad, donde normalmente se uniría el grupo hemo. Aunque la apomioglobina puede mantener su conformación general sin el grupo hemo, esta no tiene la capacidad para ligar oxígeno [37].

CAPÍTULO 2

Justificación

Las proteínas son biomoléculas fundamentales para la vida, ya que participan en casi todos los procesos celulares. En las proteínas, es esencial que mantengan su estructura nativa para que desempeñen de manera correcta su función biológica.

Esta estructura puede verse fácilmente afectada por diferentes factores, como el cambio de pH y la temperatura, adoptando diferentes conformaciones cuando se desnaturaliza.

En esta tesis, el interés principal es entender qué estructuras secundarias permanecen o se forman después de que una proteína se desnaturaliza por calor y cómo el pH del medio afecta su capacidad para adoptar diferentes estructuras. Este tipo de estudio es de gran interés, no solo porque nos ayuda a comprender mejor cómo las proteínas se adaptan o responden a cambios en su entorno, sino también para abordar problemas clínicos y enfermedades relacionadas con el mal plegamiento de las proteínas.

Para este trabajo se eligieron tres proteínas pequeñas: mioglobina, apomioglobina y lisozima, debido a que son proteínas bien conocidas, contienen diferentes estructuras secundarias (lo que nos permite realizar comparaciones cuantitativas entre los diferentes tipos de estructuras secundarias presentes en los estados DT) y tienen modelos disponibles en bases de datos como *Uniprot* y *PDB* [2, 38].

Por lo tanto, uno de los enfoques de esta investigación es entender por qué a ciertos pH se forman algunas estructuras y no otras, y qué factores influyen. Para estudiar estos cambios, nos apoyamos en técnicas como el dicroísmo circular, que permite estimar el contenido de las diferentes estructuras secundarias en sus diferentes estados DT, y la fluorescencia intrínseca, que nos brinda información sobre los cambios en el entorno de los residuos aromáticos. Además, se complementó la investigación con herramientas computacionales como *ProPKA*, que ayuda a estimar la carga de los residuos según el pH, y otros análisis que ayudan a entender qué tipo de interacciones contribuyen a mantener algunas estructuras en diferentes pH.

Objetivos

- El objetivo primario de este proyecto es la caracterización cuantitativa de los contenidos de estructura secundaria, en los estados desnaturalizados a alta temperatura de proteínas de tamaño pequeño como es la lisozima, mioglobina y apomioglobina, bajo diferentes condiciones de pH. Para ello se obtendrán espectros de dicroísmo circular en el rango de 250 y 190 nm, que serán analizados utilizando tres algoritmos ampliamente utilizados, y reconocidos por su precisión, para tal fin. Asimismo, se complementarán los estudios anteriores con la investigación del microambiente de residuos aromáticos fluorescentes en los estados DT.
- Con las determinaciones señaladas se espera detectar cuáles proteínas forman estados DT con propiedades diferentes en función del pH del medio, y establecer posibles relaciones entre las características de los DT y las propiedades de la molécula. En primer lugar, se ha planteado usar proteínas con estructuras secundarias muy diferentes; hemos seleccionado la mioglobina y la apomioglobina, por su alto contenido de hélice alfa; la lisozima de clara de huevo, por tener un dominio alfa y uno beta.
- Es importante señalar que las caracterizaciones detalladas que se hagan de las estructuras en los estados DT podrían ser de gran utilidad como puntos de referencia (*benchmarks*) para evaluar, posteriormente, el desempeño de métodos de simulación computacional basados en la dinámica molecular [18].

Materiales y Métodos

4.1. Proteínas utilizadas

Las proteínas que se emplearon son muestras comerciales de la mayor pureza posible ($> 90\%$)..

1. Lisozima: se adquirió un frasco de lisozima de clara de huevo de 1 g, con numero de producto Sigma-Aldrich L6876-1G.
2. Apomioglobina: se adquirieron viales de 60 nmol de mioglobina de caballo con número de producto Sigma-Aldrich A8673-1VL.
3. Mioglobina: se adquirió un frasco de mioglobina del músculo esquelético del caballo de 250 mg, con numero de producto Sigma-Aldrich M0630-250MG.

Tabla 4.1: Datos de las proteínas, obtenidos de la página *Expasy Protparam*
<https://web.expasy.org/protparam/>

Propiedades	Lisozima (clara de huevo de gallina)	Mioglobina (músculo de equino)	Apomioglobina (músculo de equino)
Numero de Aminoácidos	129	154	154
Peso molecular (Da)	14,313.14	17,082.67	$\approx 17K$
Punto Isoeléctrico	9.32	7.20	7.20
Coefficiente de Ext.: $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280nm	37,970	13,980	13,980
Abs 0.1 % (=1 g/L)	2.653	0.818	0.818
Pureza	$>90\%$	$>95\%$	$>95\%$
Código UniProt	P00698	P68082	————

Los elementos en rojo son idénticos, debido a que la mioglobina y la apomioglobina tienen la misma secuencia proteica, por lo tanto, el servidor Expasy determina los mismos parámetros para ambas proteínas.

4.2. Reactivos

A continuación, se detallan los reactivos utilizados en los experimentos de caracterización de proteínas mediante los diferentes métodos descritos en esta tesis:

4.2.1. Reactivos para Cromatografía de Exclusión Molecular

- *Buffer* de fosfatos (PBS): 0.05 M, pH 7.0, preparado con:
 - Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Sigma-Aldrich, S3266)
 - Fosfato de sodio monobásico monohidratado (Sigma-Aldrich, P5655)
- NaCl: 0.15 M (Sigma-Aldrich, S9625)
- Etanol: 20 % v/v (Sigma-Aldrich, 459836)
- Acetato de sodio: 0.2 M (Sigma-Aldrich, S2889)
- Filtros de jeringa: 0.1 μm y 0.22 μm (Millipore, SLGP033RS y SLGPR33RB)

4.2.2. Reactivos para Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

- Solución Laemmli 2X: compuesta de Tris-HCl, SDS, glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol (Bio-Rad, 1610737)
- β -Mercaptoetanol: 5 % v/v (Sigma-Aldrich, M6250)
- Solución de Coomassie: para teñir el gel (Bio-Rad, 1610786)
- Solución desteñidora: etanol al 30 % y ácido acético al 7 % (Sigma-Aldrich, 459836 y A6283)
- Gel poliacrilamida gradiente Bis-Tris: 4-20 % (previamente preparado en el laboratorio) (A6283)

4.2.3. Reactivos para Espectrometría de masas

- Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA): Sigma-Aldrich, CAS No. 28166-41-8. Matriz preparada a 10 mg/mL
- Acetonitrilo (ACN): Sigma-Aldrich, CAS No. 75-05-8.
- Ácido trifluoroacético (TFA): Sigma-Aldrich, CAS No. 76-05-1.
- Proteínas estándar preparadas a 1 mg/mL

4.2.4. Reactivos para Dicroísmo Circular y Espectrometría de Fluorescencia

- *Buffers*:
 - pH 2: ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich, H1758)
 - pH 5: ácido bórico (Sigma-Aldrich, B6768)
 - pH 7: fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Sigma-Aldrich, S3266) y fosfato de sodio monobásico monohidratado (Sigma-Aldrich, P5655)
 - pH 10: ácido bórico (Sigma-Aldrich, B6768) e Hidróxido de sodio 0.1N
- Filtros de jeringa: 0.1 μm y 0.22 μm (Millipore, SLGP033RS y SLGPR33RB)

4.2.5. Otros Reactivos

- Agua desionizada: obtenida en el laboratorio de Biofísicoquímica, con el equipo Millipore Milli-Q Reference.
- Hidróxido de sodio solución 0.1N (Supelco, 43617)

4.3. Métodos de Caracterización

Se emplearon tres métodos para corroborar la pureza de las proteínas: cromatografía de exclusión molecular, electroforesis en gel de poliacrilamida y espectrometría de masas.

En todos los estudios, la concentración de las muestras de proteína se determinó utilizando un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1800, midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Este método de cuantificación se basa en la absorción de la luz por los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas, especialmente el triptófano y la tirosina, que tienen picos de absorción característicos alrededor de 280 nm.

4.3.1. Cromatografía de exclusión molecular

Se empleó una columna Hiloal 16/600 Superdex 75 prep grade, para llevar a cabo la cromatografía de exclusión molecular utilizando un cromatógrafo Akta Pure 25. Esta columna fue preparada lavándola con dos volúmenes de columna (CV) de *buffer* de fosfatos (PBS) 0.05 M a pH 7.0, y NaCl 0.15 M (*buffer* de elución), previamente filtrado mediante un filtro de jeringa de 0.1 μm (millipore). La columna se dejó equilibrando durante un día, antes de su utilización. Una vez equilibrada, se inyectaron 2 mL de proteína con una concentración de 3 mg/mL, filtrada a través de un filtro de 0.22 μm (millipore). La elución de la proteína se realizó con un flujo de 1 mL/min, mientras que la absorbancia se monitorizó a 280 nm. Se recolectaron fracciones de 0.5 mL, alrededor del pico máximo y se almacenaron a 4°C. Al finalizar el experimento, se procedió a lavar la columna con 2 CV de etanol al 20 % para eliminar cualquier residuo de proteína. Posteriormente, se le hizo pasar 2 CV de *buffer* de acetato de sodio 0.2 M con etanol al 20 % para almacenar adecuadamente la columna.

4.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Como una manera más de analizar la pureza de nuestras proteínas, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, utilizando un gradiente Bis-Tris (4-20 %). Se prepararon muestras de 10 μg de proteína en solución Laemmli 2X y β -mercaptoetanol al 5 %. Posteriormente, fueron calentadas a 95°C durante 4 min y cargadas en los pocillos del gel. Se aplicó un voltaje de 100 V, manteniendo constante la corriente (400 mA) durante 10 min; enseguida se aplicó un voltaje de 120 V por 60 min para permitir la migración de las proteínas a través del gel de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con solución de Coomassie durante 1 min, y revelado con solución desteñidora (etanol al 30 % y ácido acético al 7 %) para visualizar las proteínas.

4.3.3. Espectrometría de masas

Las muestras de proteínas se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en agua destilada, previamente filtrada y desgasificada. Como matriz, se utilizó ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), el cual se disolvió a una concentración de 10 mg/mL en una solución compuesta por 50 % de acetonitrilo (ACN) y 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA). Para la preparación de la muestra a analizar, se mezclaron 1 μ L de la solución de proteína con 1 μ L de la solución de matriz CHCA, y la mezcla resultante se depositó en una placa de MALDI mediante la técnica de spotting, dejándola secar al aire; durante el secado, la matriz cristaliza, atrapando la muestra de proteína en los cristales.

La calibración del espectrómetro se realizó utilizando Albumina + MTB + RL29, una mezcla estándar de calibración que contiene proteínas de pesos moleculares conocidos. Las soluciones estándar se prepararon a una concentración de 1 mg/mL. Esta calibración se llevó a cabo antes de la adquisición de datos de las muestras.

Las mediciones de masa molecular para las 3 proteínas estudiadas, se realizaron utilizando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight), utilizando una matriz HCCA y operando en modo lineal positivo, a través del espectrómetro AutoFlexSpeed™ TOF/TOF (Bruker). Los espectros obtenidos se analizaron mediante el software del instrumento, comparando los picos observados con los pesos moleculares esperados para cada proteína.

4.3.4. Dicroísmo circular (DC)

Los estudios de dicroísmo circular se llevaron a cabo con un espectropolarímetro Jasco J-715. Se emplearon diferentes valores de pH utilizando diferentes *buffers* previamente filtrados (0.1 μ m de Millipore), a una concentración 0.01 M. Las muestras de proteína para estos estudios se prepararon a una concentración aproximada de 100 μ g/mL y fueron filtradas (0.22 μ m, Millipore). De estas muestras se registraron los espectros de DC en el rango del UV lejano (250-190 nm), a 25 °C, usando celdas de 1.00 mm. Luego, se llevó a cabo la medición de la transición térmica siguiendo la señal de DC a 220 nm, desde 25 °C hasta una temperatura entre 80 y 90 °C. Finalmente, se obtuvieron los espectros DC en el

estado desnaturalizado de las proteínas. Estos estudios proporcionaron información valiosa sobre la estructura y estabilidad de la proteína en diferentes condiciones.

4.3.5. Espectrometría de fluorescencia

Para los estudios de fluorescencia las muestras se prepararon bajo las mismas condiciones utilizadas en los estudios DC. Las muestras fueron excitadas con una longitud de onda de 280 nm, y se midieron sus espectros de emisión a diferentes temperaturas y valores de pH. Estos estudios se realizaron utilizando el Fluorometro ISS K2 (Urbana USA).

4.4. Herramientas bioinformáticas y bases de datos utilizadas

1. Protein Data Bank (PDB): una base de datos publica que proporciona estructuras tridimensionales de biomoléculas determinadas experimentalmente mediante técnicas como cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopía crioelectrónica [38]. Para la obtención de los modelos cristalográficos de alta resolución de las proteínas estudiadas en este trabajo, se utilizó esta base de datos *Protein Data Bank* (PDB). Los modelos seleccionados fueron: Para lisozima se utilizo el PDB ID:193L [14], para las proteínas mioglobina y apomioglobina se utilizo el mismo modelo cristalográfico con ID: 2FRF [15].

Sitio web: <https://www.rcsb.org>.

2. PDBsum: para complementar el análisis estructural de las proteínas, se empleó la herramienta *PDBsum*, una base de datos que proporciona resúmenes gráficos de las estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* [38]. Esta plataforma permite examinar detalles como la organización de dominios, interacciones no covalentes y elementos de estructura secundaria presentes en modelos cristalográficos [23]. Esta herramienta se utilizo para analizar características estructurales como redes de hidrógeno, puentes salinos y clústeres hidrofóbicos en base a los modelos cristalográficos obtenidos con *PDB* [23].

Sitio web: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>

3. DichroWeb: para el análisis del contenido de estructuras secundarias en las proteínas

estudiadas, se empleó el programa *DichroWeb*, una herramienta en línea utilizada para la desconvolución de espectros de dicroísmo circular [3, 4, 5]. *DichroWeb* funciona mediante algoritmos computacionales que comparan los espectros experimentales con bibliotecas de espectros de referencia, que corresponden a proteínas con estructuras secundarias conocidas, lo que permite estimar de forma cuantitativa el contenido de hélices α , segmentos β y estructuras desordenadas.

En este trabajo se utilizaron dos algoritmos distintos: **CONTIN LL** y **SELCON3**.

- CONTIN LL es un método basado en el ajuste por mínimos cuadrados regularizados, que permite obtener resultados suaves y estables, incluso en presencia de ruido experimental. Es especialmente útil cuando se requiere una alta resolución en la estimación de componentes estructurales [39, 40].
- SELCON3, por su parte, es un algoritmo que emplea análisis de componentes principales y selecciona subconjuntos de espectros de referencia que se asemejan al espectro analizado, lo que le permite adaptarse bien a una amplia gama de conformaciones y condiciones experimentales [41, 42].

También se utilizaron dos bibliotecas de referencia: **Set 4** y **Set 7**, ambas compuestas por proteínas cuya estructura ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear [43, 4].

- Set 4 contiene 43 proteínas con estructuras secundarias variadas, lo que lo hace adecuado para muestras con contenido mixto de hélice y lámina [6, 43].
- Set 7 incluye 33 proteínas que abarcan una mayor diversidad conformacional y es particularmente útil para analizar proteínas parcialmente desplegadas o con regiones desordenadas [6, 43].

Sitio web: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

4. BeStSel: además del análisis con *DichroWeb*, se utilizó el servidor *BeStSel* (*Beta Structure Selection*) para la estimación del contenido de estructuras secundarias a partir de espectros de dicroísmo circular en el rango lejano. *BeStSel* permite un análisis más preciso de las estructuras β al distinguir entre diferentes tipos de láminas β paralelas y antiparalelas, lo que proporciona una descripción más detallada del contenido estructural de proteínas, especialmente aquellas con abundante contenido β [12, 8, 9, 10, 11, 13]. Este método se basa en una base de datos de espectros experimentales cuidadosamente seleccionados y ofrece buenos resultados incluso para

proteínas parcialmente desordenadas o con estructuras mixtas.

Sitio web: <https://bestsel.elte.hu>

5. UniProt: esta plataforma de datos se emplea para obtener los valores del contenido de estructura secundaria correspondiente a los modelos cristalográficos utilizados para el análisis de las proteínas, mencionados anteriormente en la Tabla ?? [2].

Sitio web: <https://www.uniprot.org>

6. ProtParam (ExPASy): la herramienta en línea *ProtParam*, disponible en el servidor ExPASy, para calcular propiedades físico-químicas a partir de la secuencia primaria de las proteínas. Entre los parámetros obtenidos se incluyen el peso molecular, el punto isoeléctrico teórico, la fórmula química, la composición de aminoácidos, el índice de estabilidad y la hidropatía global (GRAVY) [25]. Esta información es bastante útil para conocer propiedades biofísicoquímicas como el índice GRAVY y el peso molecular (calculado a partir, del coeficiente de extinción molar proporcionado por el programa).

Sitio web: <https://web.expasy.org/protparam/>

7. PROPKA v2.0: es una herramienta computacional que permite predecir pKa a partir de estructuras tridimensionales, considerando el entorno local de cada residuo en la proteína [44]. Esta herramienta es útil para predecir posibles cambios en la ionización de grupos funcionales bajo distintas condiciones de pH, lo que puede tener implicaciones en la estabilidad estructural y actividad funcional [16]. En particular esta aplicación nos ayudó a estimar los valores de pKa de los residuos ionizables y determinar el valor de ΔpK_a a alta temperatura (80 °C), así, como calcular la carga neta a diferentes pH de las proteínas.

Sitio web: <https://www.ddl.unimi.it/vegaol/propka.htm>

8. OriginPro 2021: software utilizado para el análisis y procesamiento gráfico de los datos experimentales de dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca.

Desarrollador: OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

9. ProteinTools: se utilizó el servidor en línea *ProteinTools* para analizar características estructurales complementarias a partir de archivos PDB. Esta herramienta desarrollada por la *Universidad de Bayreuth*, permite obtener, la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, y la formación de enlaces de hidrógeno, puentes salinos y clústers hidrofóbicos a partir de modelos cristalinos de las proteínas [24]. El análisis

sis generado por *ProteinTools* contribuyó a una mejor comprensión de la estabilidad estructural.

Sitio web: <https://proteintools.uni-bayreuth.de/>

10. PyMOL (versión 2.5.5, Schrödinger, LLC) [20, 21, 22]: esta herramienta permite la visualización tridimensional de las estructuras cristalinas. Para nuestro caso en particular utilizamos esta herramienta para visualizar nuestras proteínas y resaltar interacciones intramoleculares, con la información proporcionada por *ProteinTools* [24].

Sitio web: <https://pymol.org>

Resultados

5.1. Resultados de lisozima

En el cromatograma (Figura 5.1), se confirmó la alta pureza de la proteína utilizada, ya que se observó un solo pico, siguiendo la señal a 280 nm.

Este resultado también se confirmó en el gel de poliacrilamida (Figura 5.2), donde se observó una banda única, bien definida, lo que respalda que la muestra de proteína está libre de impurezas y es altamente homogénea.

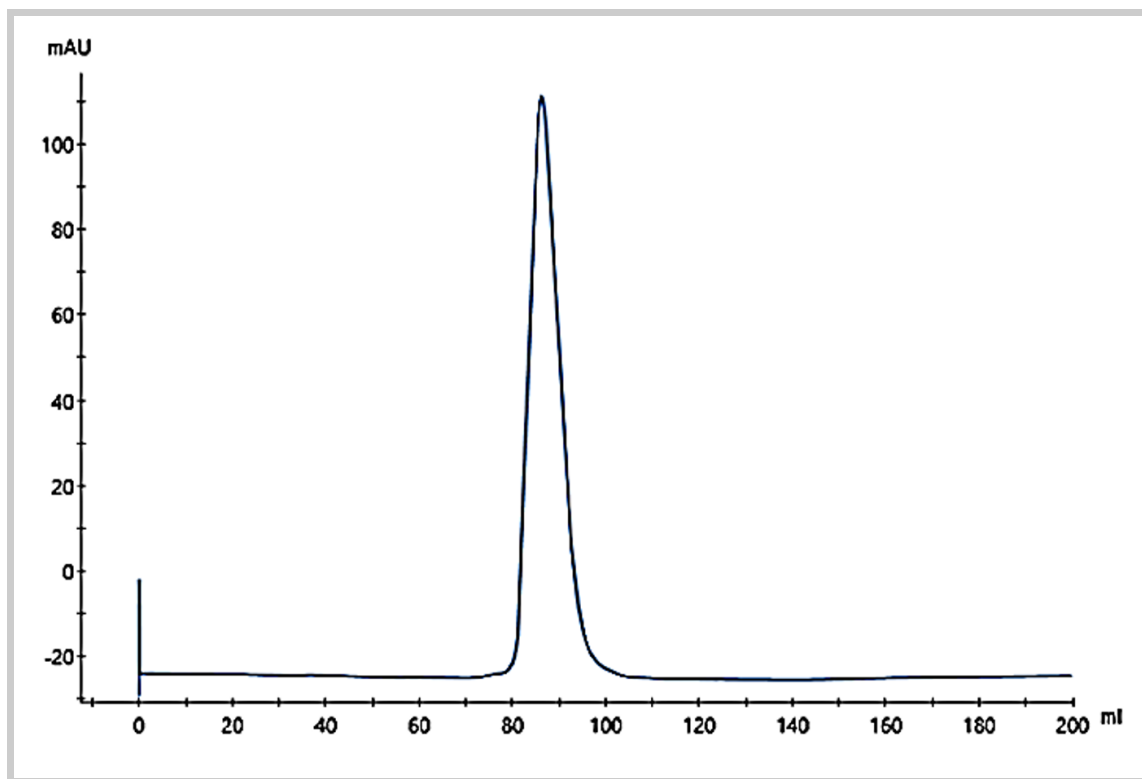


Figura 5.1: Cromatograma de lisozima a pH 7, siguiendo la señal UV a 280 nm. La cromatografía se realizó en una columna de exclusión molecular (Hiload 16/600 Superdex).

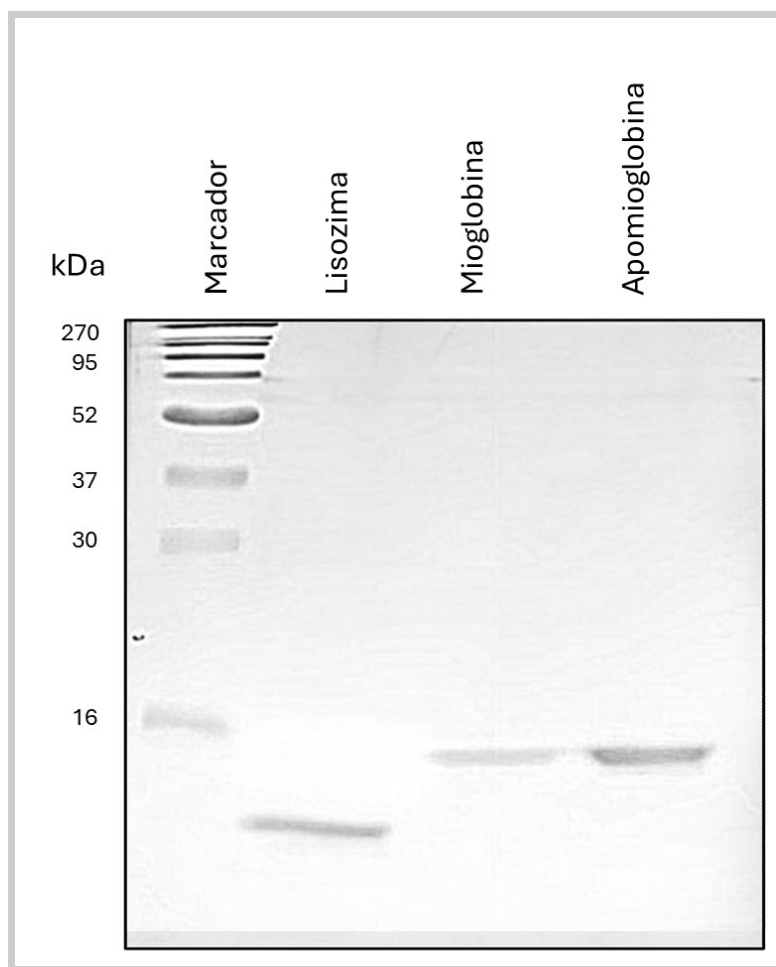


Figura 5.2: Electroforesis en gel de poliacrilamida Bis-Tris (4-20 %), de las proteínas lisozima, mioglobina y apomioglobina.

5.1.1. Espectrometría de masas en lisozima

El espectro de masas de la lisozima, registrado en el rango de 6000 Da a 16 000 Da, muestra un pico principal en 14 303 Da, correspondiente a la masa molecular esperada, lo que concuerda con los valores reportados en bases de datos como *UniProt* o *PDB* (~ 14.3 kDa).

Adicionalmente, se detecta un pico en 7148.96 Da, cuya masa es aproximadamente la mitad del pico principal. Esta señal podría corresponder a una especie con doble carga positiva ($2+$), es un fenómeno que se observa con frecuencia en ciertos tipos de compuestos especialmente para moléculas grandes como proteínas y péptidos.

También se aprecian señales de menor intensidad en 9529.39 Da y 10 727.51 Da, que podrían asociarse a fragmentos peptídicos, productos de degradación o pérdida de pequeñas modificaciones. La nitidez del espectro y la dominancia del pico intacto indican una

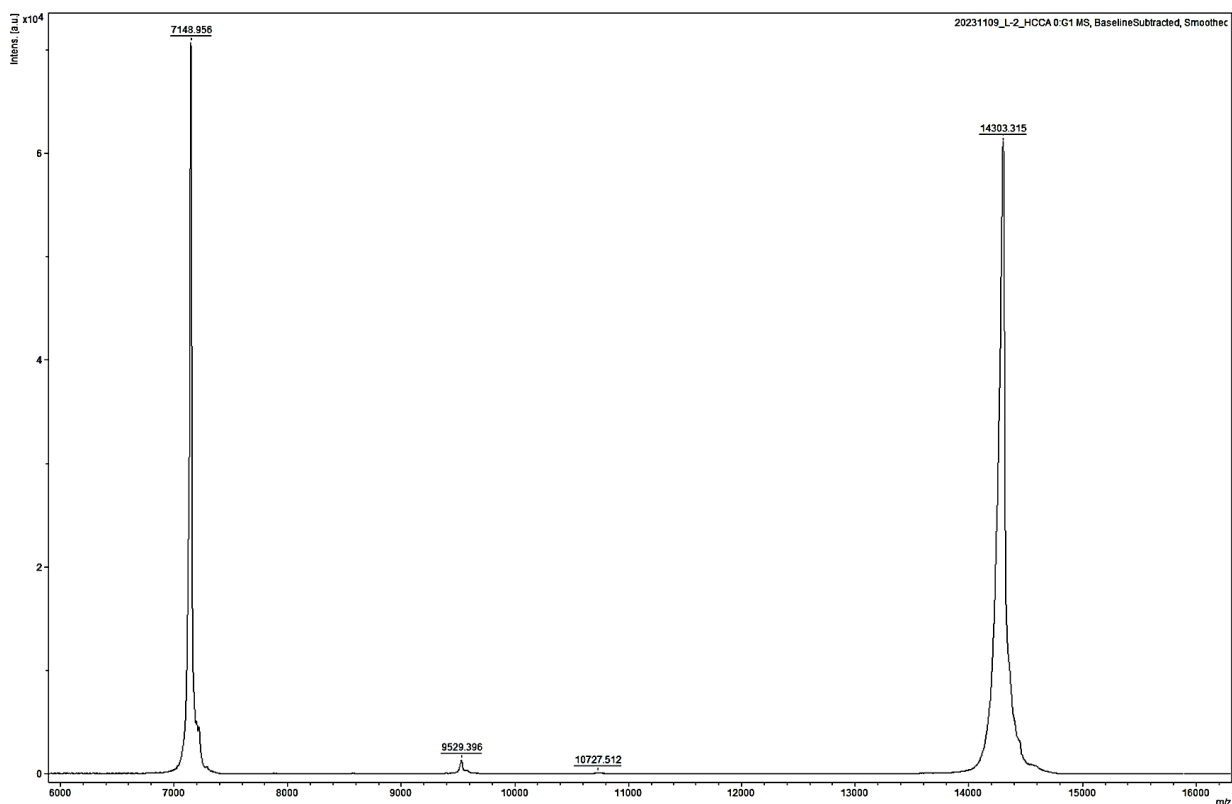


Figura 5.3: Espectro de masas de la lisozima obtenido por MALDI-TOF en el rango de 6000 Da a 16 000 Da. El pico principal a 14 303 Da corresponde a la forma intacta de la proteína. También se observa un pico en 7148.96 Da, posiblemente asociado a una especie con doble carga (2+).

preparación adecuada de la muestra, con bajo nivel de impurezas.

5.1.2. Dicroísmo Circular obtenidos con lisozima

La Figura 5.4 muestra los espectros DC obtenidos a 25 °C a diferentes valores de pH, los cuales exhiben características similares, consistentes con una estructura secundaria predominantemente de alfa hélice. Este patrón de espectros sugiere que la estructura secundaria de la proteína se mantiene estable en diferentes condiciones de pH.

Para el análisis de los resultados obtenidos en DC se realizó una desconvolución de los espectros usando tres algoritmos ampliamente conocidos (CONTIN LL, SELCON 3 y Best Sel) [3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

La Tabla 5.1 muestra la comparación de los resultados obtenidos de estos 3 algoritmos con la estructura cristalina de la proteína. Los algoritmos CONTIN LL y SELCON 3 proporcionan resultados que se asemejan más a la estructura cristalina en ambos casos.

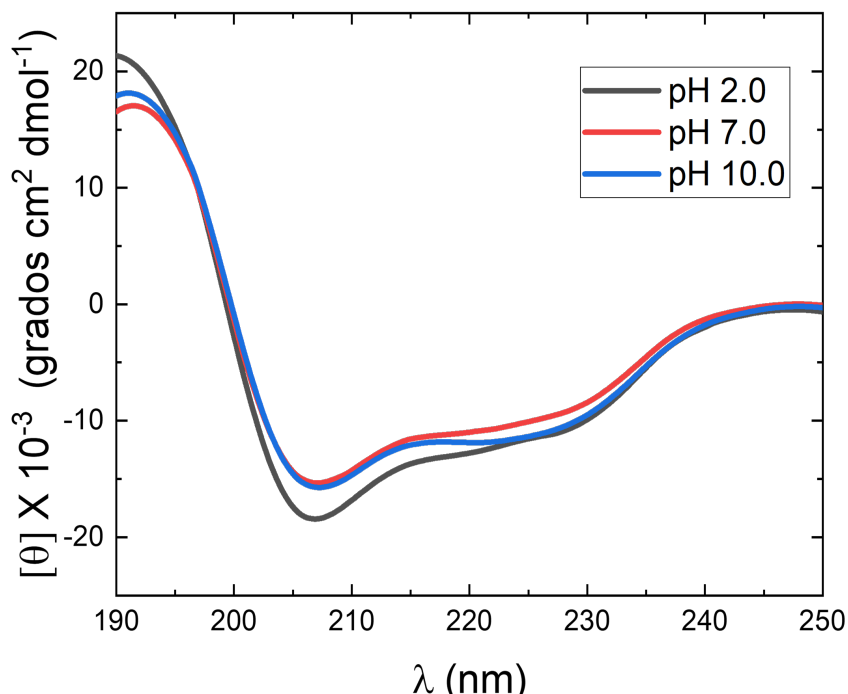


Figura 5.4: Espectros DC de lisozima nativa; 25 °C; pH 2.0 (línea negra), 7.0 (línea roja) y 10.0 (línea azul), respectivamente.

Tabla 5.1: Contenido de estructuras secundarias (fracciones) en lisozima nativa 25°C.

^aDatos obtenidos de UniProt [2], basados en la determinación por difracción de rayos-X de la estructura cristalina de la lisozima. ^bDatos obtenidos del espectro DC, con los métodos en el servidor online *Dichroweb* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) [3, 4, 5], usando el set de referencia 4 [6, 7]. ^cDatos obtenidos del espectro DC con el método del servidor online *BestSel* (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) [8, 9, 10, 11, 12, 13]. El término ^dNRMSD (normalized-root-mean-square deviation) es una medida de las diferencias de valores de un espectro experimental y su correspondiente espectro calculado por el método de análisis correspondiente).

Lisozima	Algoritmo	Hélices (total)	Segmentos β (total)	Giros β	No ordenada	Total	^d NRMSD
	^a Estructura cristalina	0.43	0.18	0.15	0.24	1.00	
	^b CONTIN LL	0.43	0.12	0.19	0.26	1.00	0.03
	^b SELCON 3	0.42	0.08	0.22	0.26	0.98	0.20
	^c BestSel	0.33	0.09	0.13	0.45	1.00	0.01

Por otro lado, la Tabla 5.2 presenta una comparación de los valores de estructura secundaria de la proteína nativa a 25°C, a diferentes valores de pH. Los resultados no muestran cambios significativos en la estructura nativa de la proteína en respuesta a las variaciones de pH. Esto sugiere que la estructura nativa de la lisozima permanece estable frente a cambios en el entorno ácido-base.

Tabla 5.2: Fracciones de estructura secundaria de lisozima a 25 °C en diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos por los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con el set de referencia 4. Entre paréntesis se encuentra la desviación al valor promedio.

Tipo de estructura	pH 2.0	pH 7.0	pH 10.0
Hélices	0.45 (0.01)	0.43 (0.01)	0.46 (0.01)
Segmentos β	0.09 (0.03)	0.10 (0.02)	0.08 (0.02)
Giros β	0.20 (0.01)	0.21 (0.03)	0.21 (0.02)
No ordenada	0.28 (0.03)	0.26 (0.01)	0.25 (0.01)

El perfil de desnaturalización térmica a los diferentes pH se puede observar en la Figura 5.5. En los diferentes perfiles, las gráficas sigmoides de elipticidad son reflejo de las alteraciones conformacionales en la estructura secundaria de la lisozima durante el proceso de desnaturalización térmica. La variación del pH influye en la estabilidad de la estructura proteica y genera distintos perfiles de desnaturalización, como se muestra en el gráfico.

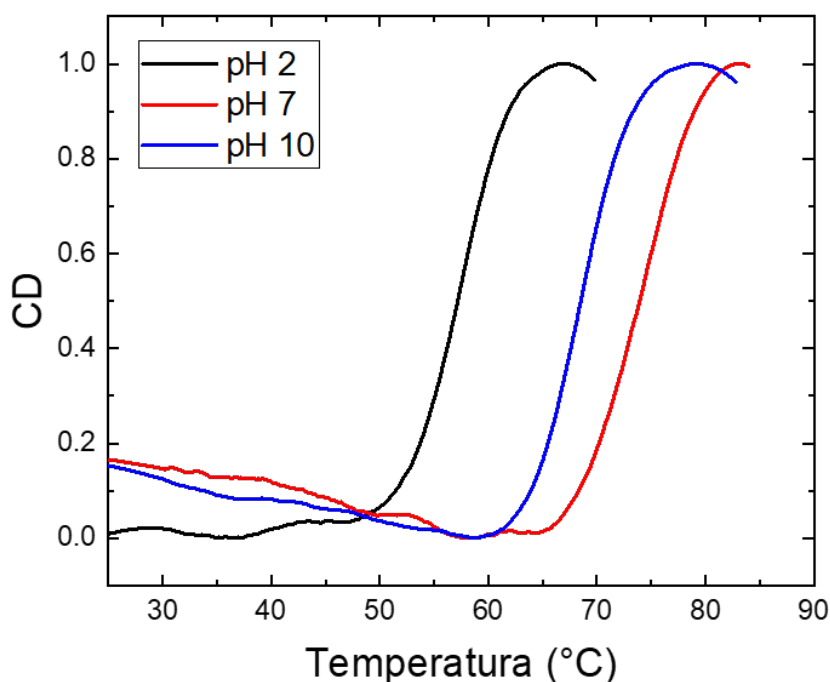


Figura 5.5: Transiciones térmicas de lisozima nativa a desnaturalizada; pH 2.0 desde los 25 °C a 70 °C (línea negra), pH 7.0 desde los 25 °C a 84.6 °C (línea roja) y pH 10.0 desde los 25 °C a 82.8 °C (línea azul). Las gráficas se normalizaron para efectos de comparación.

La Figura 5.6 muestra los espectros de DC desnaturalizados de la lisozima a los distintos pH. Los espectros de lisozima difieren claramente, lo que indica una diferencia significativa en las estructuras secundarias residuales. Estas variaciones en los espectros

reflejan cambios en la conformación de la proteína desnaturalizada bajo diferentes condiciones de pH, lo que podría indicar que el pH influye en la estructura de la lisozima desnaturalizada.

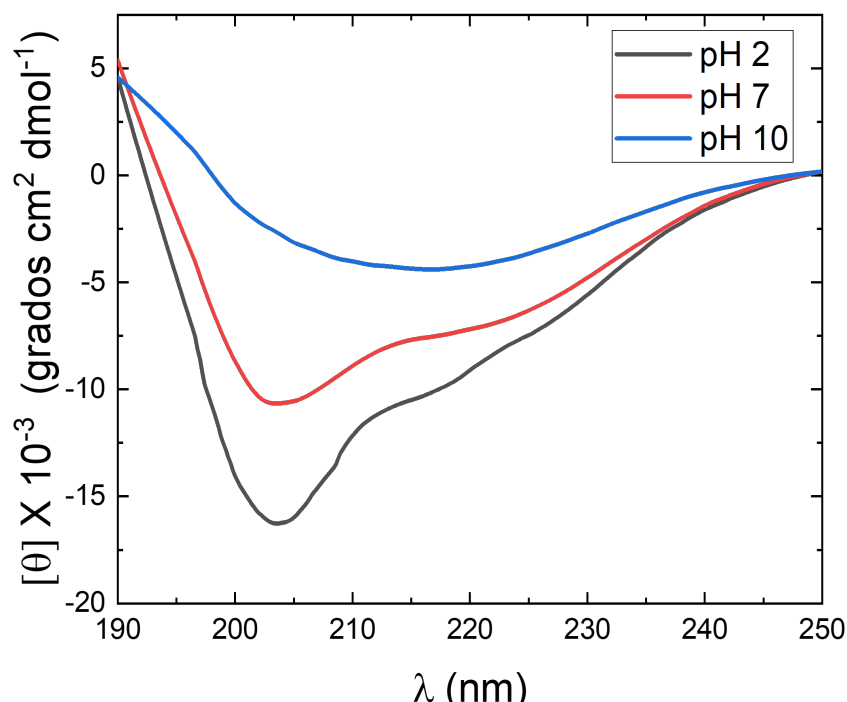


Figura 5.6: Espectros DC de lisozima desnaturalizada térmicamente a diferentes valores de pH. pH 2.0 a 70 °C, pH 7.0 a 84.6 °C y pH 10.0 a 82.8 °C.

Los resultados de la desconvolución de los espectros DT para los distintos valores de pH se presentan en la Tabla 5.3. Un aspecto destacado en los resultados de lisozima es que, a pH 2.0 y 7.0, se observa una mayor proporción de estructura desordenada en comparación con el pH 10.0. Por otro lado, a pH 10.0 se evidencia una mayor cantidad de segmentos beta y estructura desordenada. Es importante destacar, que estos valores únicamente se observan con el set de datos 7 de *Dicroweb* [6, 7].

Tabla 5.3: Fracciones de estructuras secundarias en la lisozima desnaturalizada térmicamente, a los diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos mediante los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con los diferentes sets de referencia. La desviación respecto al valor promedio se indica entre paréntesis.

Estructura	pH 2.0		pH 7.0		pH 10.0	
Set de datos	Set 4	Set 7	Set 4	Set 7	Set 4	Set 7
Hélices	0.23 (0.01)	0.21 (0.00)	0.19 (0.00)	0.18 (0.01)	0.15 (0.04)	0.12 (0.01)
Segmentos β	0.21 (0.05)	0.04 (0.00)	0.24 (0.00)	0.16 (0.01)	0.36 (0.04)	0.32 (0.05)
Giros β	0.26 (0.01)	0.11 (0.00)	0.23 (0.00)	0.15 (0.01)	0.20 (0.04)	0.17 (0.04)
No ordenada	0.31 (0.02)	0.65 (0.00)	0.34 (0.01)	0.52 (0.02)	0.30 (0.04)	0.39 (0.05)

5.1.3. Fluorescencia de la lisozima

La Figura 5.7 muestra el decaimiento de la fluorescencia intrínseca de lisozima, debido al desplegamiento (y/o desnaturalización estructural) de la lisozima. La aparición del decaimiento más notable se puede apreciar a 90°C. En el estado nativo, la proteína se encuentra a 25°C y, por lo tanto, su estructura no se encuentra alterada, presentando el espectro de mayor intensidad respecto de los demás.

También notamos un desplazamiento del máximo hacia el rojo de alrededor de 9 nm, como resultado de la desnaturalización de la proteína. Inicialmente, la intensidad máxima se monitorea a 325 nm en la proteína nativa a 25°C luego de excitar a 280 nm, mientras que a 90°C se registra un máximo en 334 nm excitando a la misma longitud de onda.

Este comportamiento en el decaimiento de fluorescencia es similar a pH 2, con un desplazamiento hacia el rojo de alrededor de 12 nm (324 nm a 336 nm) Ver Apéndice 7.3, sección A.1.

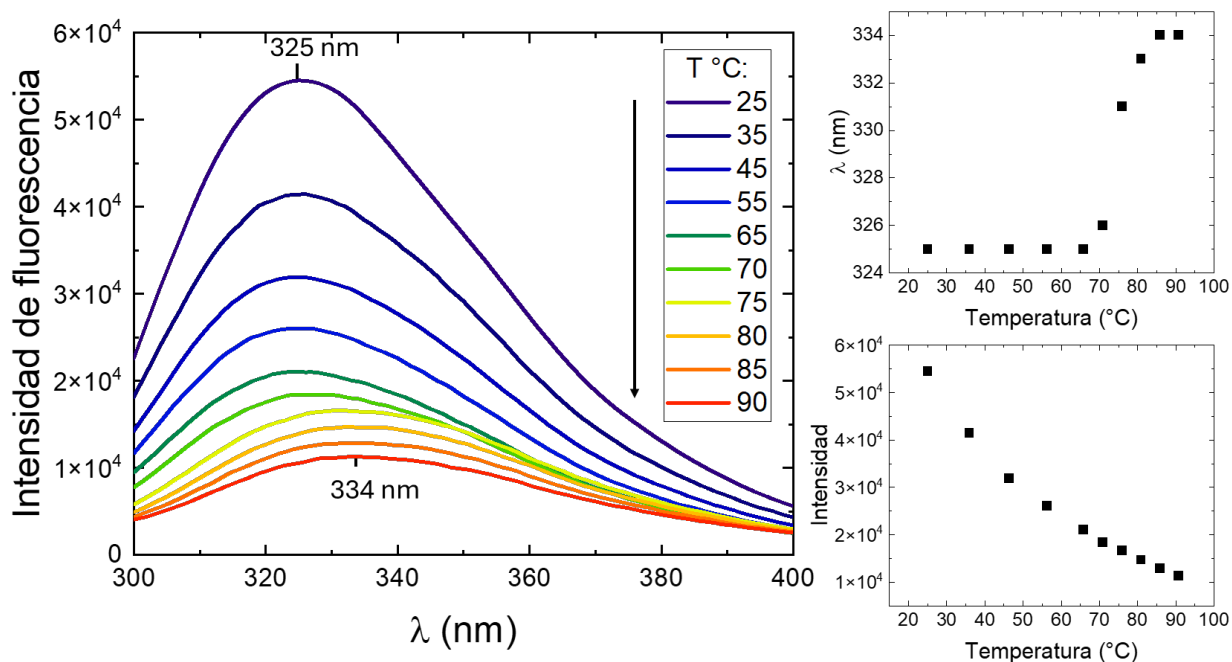


Figura 5.7: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de lisozima a pH 7, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.

En la Figura 5.8 se presentan los espectros de fluorescencia intrínseca de lisozima a pH 10. Se observa un decaimiento en la intensidad de fluorescencia desde los 25°C hasta los 55°C. A los 60°C, se registra un notable incremento en la intensidad, alcanzando su máximo a los 65 °C, sin embargo, posterior a esta temperatura, se observa nuevamente un decaimiento en la intensidad, llegando a los 80°C. A esta temperatura, se nota un ligero desplazamiento hacia el rojo en el máximo de intensidad de alrededor de 6 nm. A 25°C, el máximo se registró a 327 nm, mientras que a 80°C fue a 333 nm.

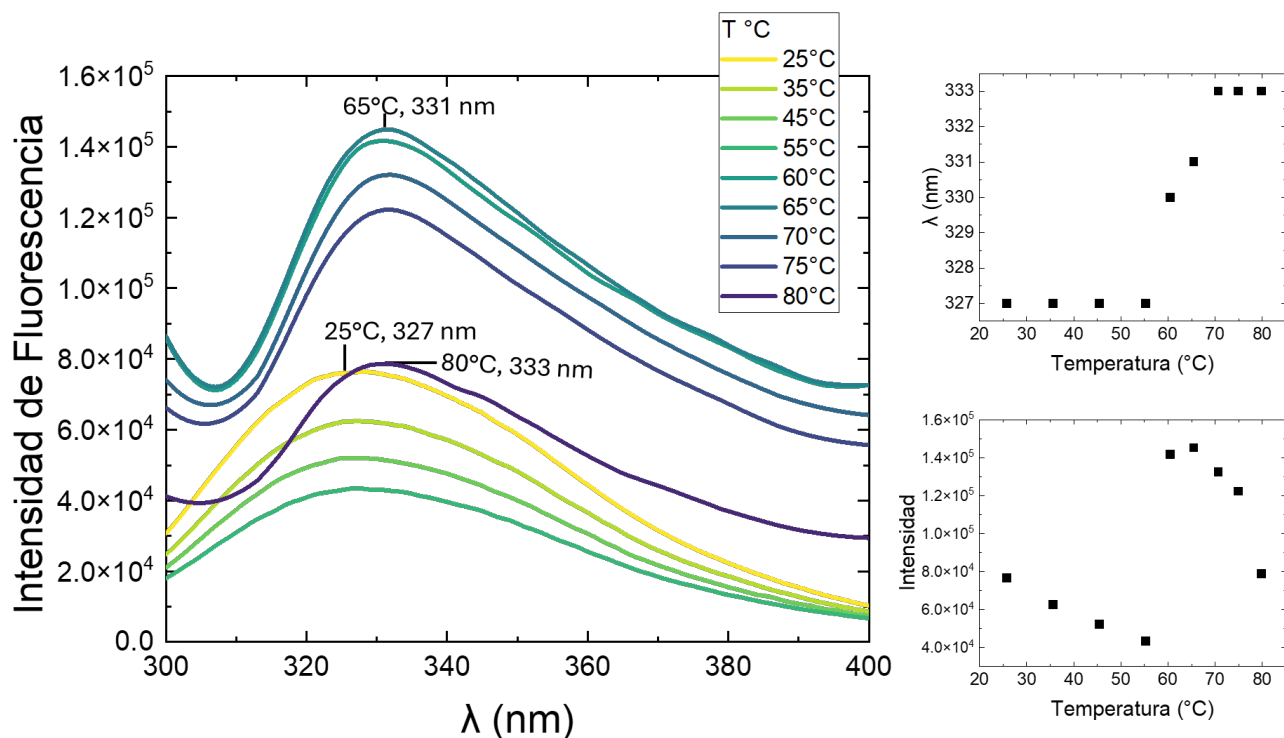


Figura 5.8: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de lisozima a pH 10, excitando a 280nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme aumenta la temperatura.

5.1.4. Grupos protonables en lisozima

Los valores de pKa de los aminoácidos protonables a 25°C se muestran en la Tabla 5.4, obtenidos mediante el servidor *Propka* <https://www.ddl.unimi.it/vegaol/propka.htm> [16] (la lista de los grupos protonables completa se encuentra en el Apéndice 7.3, sección A.2). Para determinar sus cambios de pKa (ΔpK_a) se empleó la ecuación de Van't Hoff ((Para mayor detalle ver Apéndice C y Anexo A)), utilizando las entalpías descritas en (Krajewska, 2016) [45].

El signo negativo se colocó en los valores de ΔpK_a , como una manera de representar que el pka disminuye al aumentar la temperatura en la proteína.

Tabla 5.4: Cálculo de pKa (25 °C) y Δ pKa (80 °C) de los grupos ionizables en la proteína de lisozima a pH 7, usando el modelo cristalografico PDB ID:193L [14].

Aminoácido	pKa 25 °C	Δ pKa (80 °C)	Aminoácido	pKa 25 °C	Δ pKa (80 °C)
HIS 15A	7.15	-0.8458	ARG 5A	12.36	-1.3643
TYR 20A	8.75	-0.6821	ARG 14A	12.29	-1.3643
TYR 23A	10	-0.6821	ARG 21A	12.29	-1.3643
TYR 53A	13.03	-0.6821	ARG 45A	11.8	-1.3643
N+ 1A	7.58	-1.14	ARG 61A	11.8	-1.3643
LYS 1A	10.22	-1.4734	ARG 68A	11.94	-1.3643
LYS 13A	10.5	-1.4734	ARG 73A	12.29	-1.3643
LYS 33A	10.36	-1.4734	ARG 112A	12.5	-1.3643
LYS 96A	10.08	-1.4734	ARG 114A	12.01	-1.3643
LYS 97A	10.43	-1.4734	ARG 125A	12.22	-1.3643
LYS 116A	10.5	-1.4734	ARG 128A	12.5	-1.3643

5.2. Resultados de Mioglobina y apomioglobina

En el cromatograma de mioglobina se identifica un pico predominante junto con dos pequeñas impurezas adicionales; sin embargo, se consideró que estas impurezas no alcanzaban una cantidad significativa como para influir en los estudios DC, como se muestra en la figura 5.9.

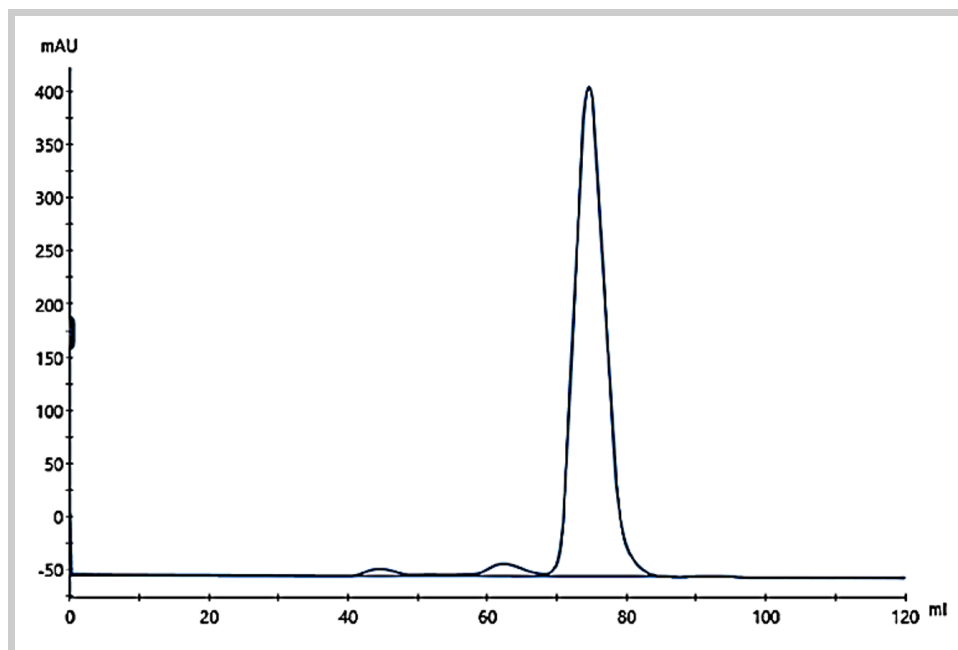


Figura 5.9: Cromatograma de mioglobina a pH 7. La cromatografía se realizó en una columna de exclusión molecular (Hiload 16/600 Superdex).

Para la proteína de apomioglobina no se llevó a cabo cromatografía de exclusión molecular, debido a la disponibilidad limitada con la que se contaba de esta proteína para su estudio. Sin embargo, se realizaron los estudios de electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 5.2) y espectrometría de masas como se muestra más adelante. La pureza de las muestras de ambas proteínas se confirma en la Figura 5.2, donde se observan una sola banda bien definida y con tamaño similar para cada proteína.

5.2.1. Espectrometría de masas de las proteínas de mioglobina y su apoproteína

En los espectros de masas obtenidos para las muestras de mioglobina y apomioglobina (Figura 5.10), se observa una señal principal correspondiente a una masa de aproximadamente 16 950 Da en ambos casos.

Esta masa coincide con la de la apomioglobina, es decir, la proteína sin su grupo hemo. Sin embargo, la mioglobina debería presentar una masa mayor de (aproximadamente 17 082 Da), considerando la presencia del grupo hemo, cuya masa individual es de aproximadamente 616 Da [46]. No obstante, la suma directa de 16 950 Da (apomioglobina) + 616 Da (grupo hemo) da como resultado 17 566 Da, una cifra que no corresponde con el valor teórico de la mioglobina. Esta diferencia se debe a que el grupo hemo se une a la cadena polipeptídica mediante interacciones no covalentes, y su incorporación no equivale a una suma de masas, sino que implica reorganizaciones estructurales o pérdida de pequeños grupos atómicos [47, 48].

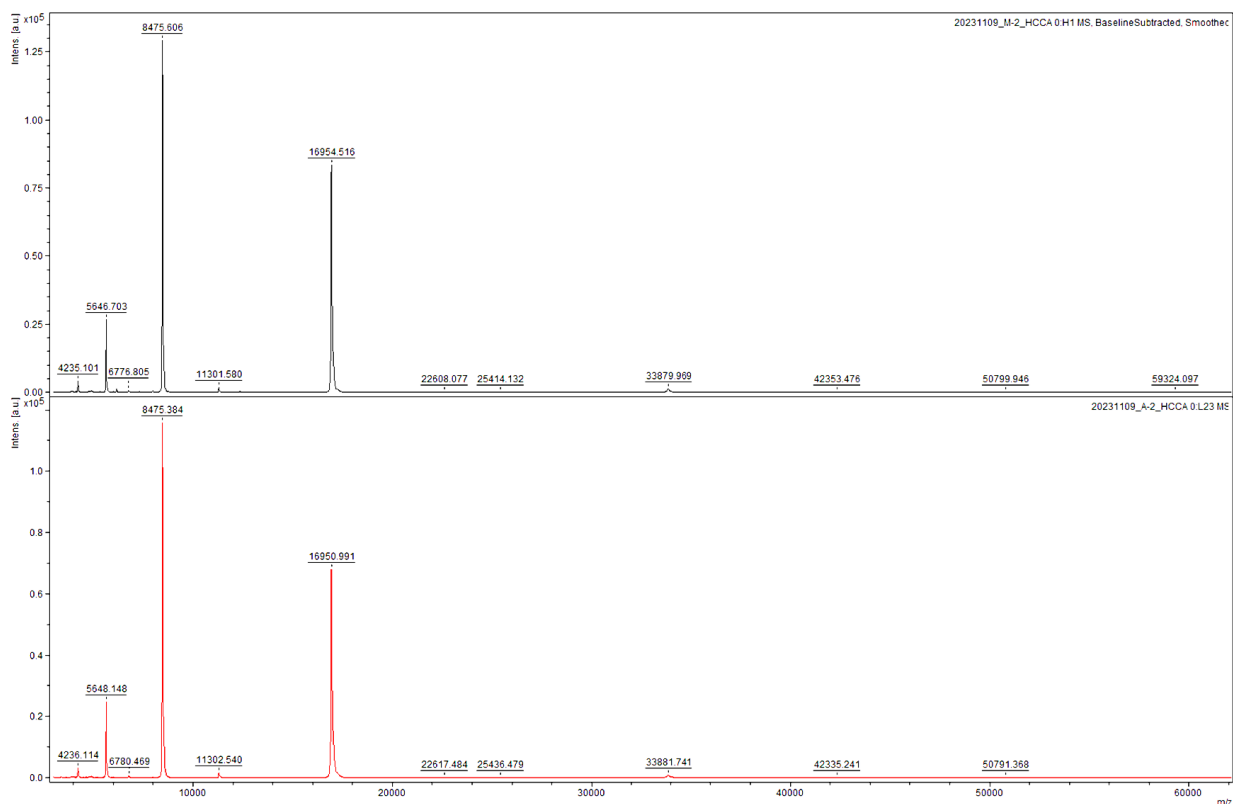


Figura 5.10: Espectros de masas de mioglobina y apomioglobina obtenidos mediante MALDI-TOF en un rango de 0 a 60,000 m/z. Se observa un pico principal en torno a 16 950 Da para ambas proteínas. Señal de que el grupo hemo se ha separado de la mioglobina.

Además, estudios previos han reportado que la masa determinada experimentalmente por espectrometría de masas para la mioglobina es cercana a los 16 950 Da, debido a que el grupo hemo puede perderse durante el proceso de ionización/desorción en MALDI-TOF [46]. Esto explicaría por qué ambas muestras presentan la misma señal de 16 950 Da, correspondiente a la cadena polipeptídica.

Este fenómeno se ve reforzado por el análisis de las masas bajas (Figura 5.11), donde se detecta un pico de 616.26 Da únicamente en la muestra de mioglobina. Esta señal es atribuible al grupo hemo libre, que se desprende de la proteína durante el proceso de ionización.

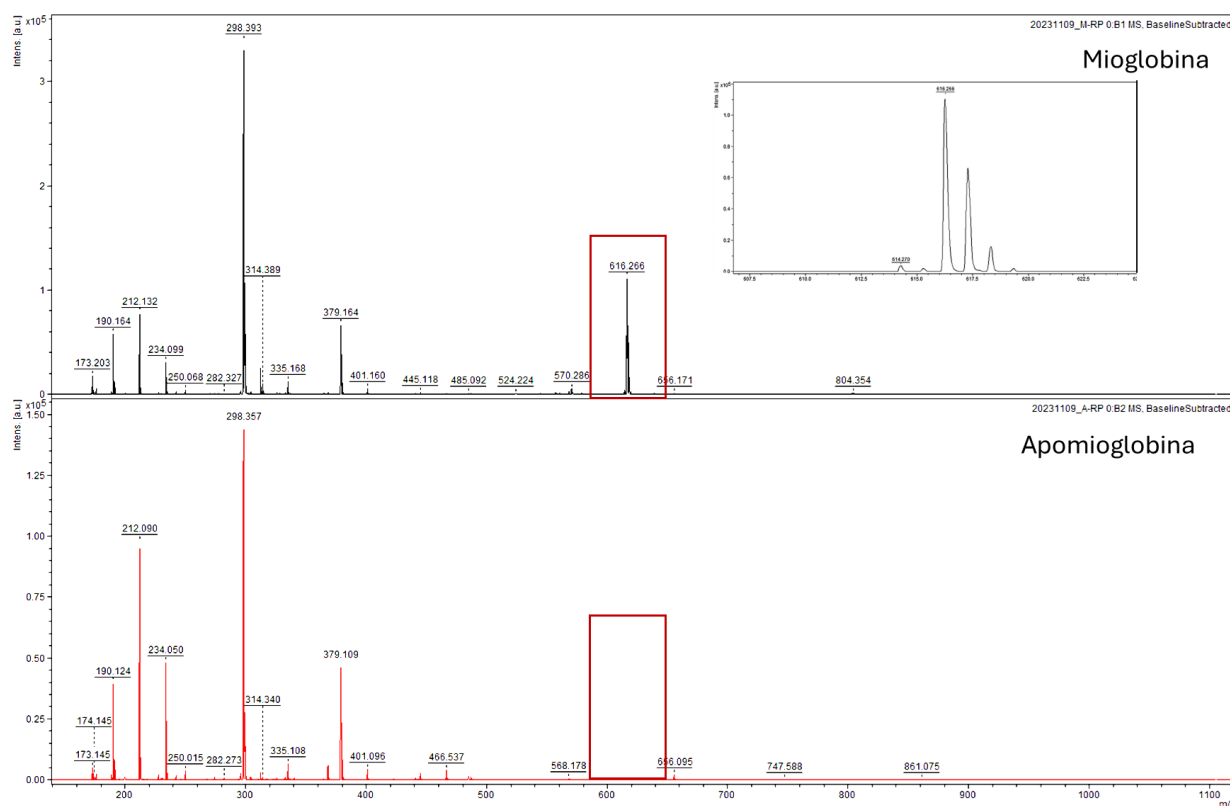


Figura 5.11: Espectros de masas en el intervalo bajo (100–1100 m/z) correspondientes a la detección del grupo hemo. En la muestra de mioglobina se observa un pico en 616.26 Da, el cual corresponde a la masa del grupo hemo disociado.

5.2.2. Dicroísmo Circular de las proteínas de Mioglobina y Apomioglobina

Las Figuras 5.12 y 5.13 presentan los espectros de dicroísmo correspondientes a las proteínas mioglobina y apomioglobina en su forma nativa a la temperatura de 25°C, a diferentes valores de pH. Se observa una notable similitud entre los espectros obtenidos, para ambas proteínas, con una superposición casi completa entre pH 5 y pH 7, en el caso de mioglobina, mientras que para la apomioglobina mantienen la misma forma con diferente intensidad en elipticidad molar. Esta consistencia sugiere una estabilidad estructural de las proteínas ante los cambios de ambientes ácido-base. Sin embargo, es importante destacar que, a pesar de esta estabilidad relativa ante cambios en el pH, tanto la mioglobina como la apomioglobina experimentan desnaturalización a pH inferiores a 5. Este hallazgo subraya la importancia de las condiciones ambientales en la estabilidad y funcionalidad de las proteínas. Además, la morfología característica de los espectros exhibe una clara señal de estructuras secundarias, predominante de hélices alfa.

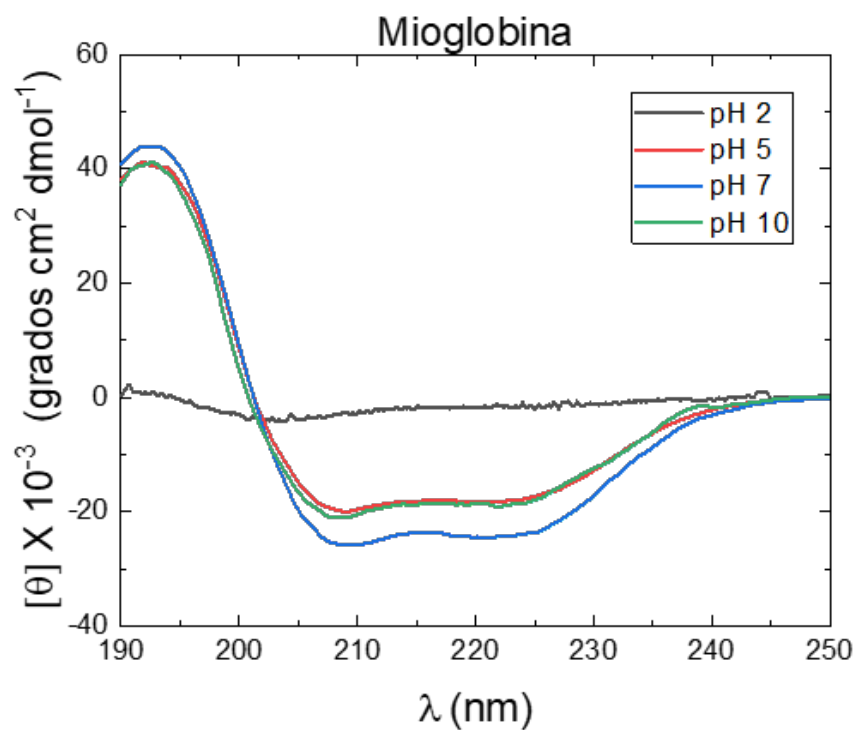


Figura 5.12: Espectros DC de mioglobina nativa a 25 °C; pH 2.0 (línea negra), pH 5 (línea roja) pH 7.0 (línea azul) y pH 10.0 (línea verde), respectivamente.

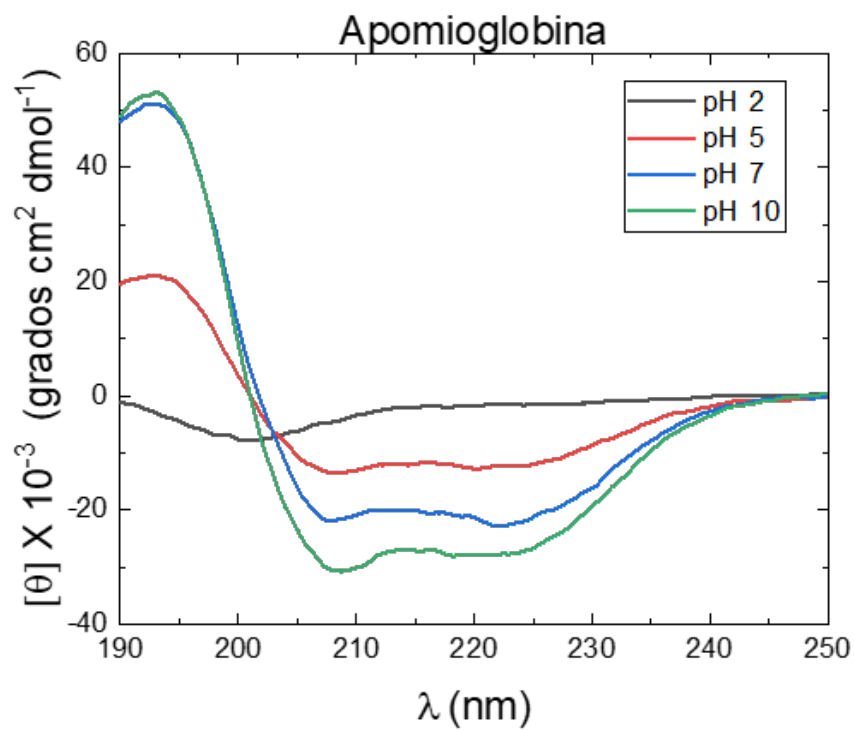


Figura 5.13: Espectros DC de apomioglobina nativa a 25 °C; pH 2.0 (línea negra), pH 5 (línea roja) pH 7.0 (línea azul) y pH 10.0 (línea verde), respectivamente.

Al igual que en el análisis de lisozima, se llevó a cabo una desconvolución de los espectros DC, utilizando los mismos algoritmos empleados previamente. La Tabla 5.5 presenta una comparación entre la estructura cristalina de referencia y los resultados obtenidos de la desconvolución de los espectros de ambas proteínas a pH 7, utilizando el set de referencia 4. Se observa que el algoritmo CONTIN LL y SELCON 3 son los más similares, dado que exhiben valores más cercanos a la estructura cristalina y un menor NRMSD.

Tabla 5.5: Contenido de estructuras secundarias (fracciones) de mioglobina y apomioglobina nativa a 25 °C pH 7.

	Algoritmo	Hélices (total)	Segmentos β (total)	Giros β	No ordenada	Total	^d NRMSD
	^a Estructura cristalina	0.79	—	0.05	0.17	1.01	—
Mioglobina	^b CONTIN LL	0.68	0.01	0.19	0.19	1.07	0.027
	^b SELCON 3	0.66	0.04	0.11	0.20	1.01	0.186
	^c BestSel	0.61	0.02	0.10	0.29	1.02	0.128
Apomioglobina	^b CONTIN LL	0.67	0.02	0.12	0.19	1.00	0.035
	^b SELCON 3	0.69	0.01	0.11	0.19	0.99	0.126
	^c BestSel	0.61	0.00	0.12	0.27	1.00	0.134

Por otro lado, la Tabla 5.6 muestra una comparación de la desconvolución de los espectros nativos de ambas proteínas a los diferentes valores de pH. Los resultados obtenidos demuestran que no se producen cambios significativos en la estructura secundaria de la proteína en respuesta a las variaciones de pH, consistente con lo observado en las Figuras 5.12 y 5.13.

Los perfiles de desnaturalización térmica a los diferentes pH se pueden observar en las Figuras 5.14 y 5.15. Los perfiles térmicos revelan cambios en la elipticidad, lo que refleja las alteraciones conformacionales en la estructura secundaria de las proteínas durante el proceso de desnaturalización térmica. También se observa que la variación del pH tiene un impacto en la estabilidad de la estructura proteica, especialmente en la mioglobina a pH 10, provocando que la proteína se desnaturalice a una temperatura más baja a comparación con otros pH. En el caso de apomioglobina se observa que a pH 10 la transición es mucho más marcada y definida lo que podría indicar un mayor cambio estructural. Cabe destacar que la apomioglobina muestra una desnaturalización a temperaturas cercanas en los tres pH evaluados. Estos resultados resaltan la importancia de considerar el pH como un factor

Tabla 5.6: Fracciones de estructura secundaria de mioglobina y apomioglobina a 25 °C a diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos por los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con el set de referencia 4. Entre paréntesis se encuentra la desviación al valor promedio.

	Mioglobina			Apomioglobina		
Tipo de estructura	pH 5.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 10.0
Hélices	0.57 (0.01)	0.67 (0.01)	0.59 (0.01)	0.38 (0.00)	0.68 (0.01)	0.72 (0.06)
Segmentos β	0.05 (0.01)	0.03 (0.03)	0.06 (0.03)	0.29 (0.01)	0.03 (0.01)	-0.00 (0.00)
Giros β	0.14 (0.02)	0.12 (0.01)	0.15 (0.03)	0.20 (0.00)	0.11 (0.01)	0.13 (0.04)
No ordenada	0.24 (0.01)	0.26 (0.01)	0.21 (0.04)	0.28 (0.01)	0.19 (0.01)	0.15 (0.01)

determinante en la estabilidad y funcionalidad de esta proteína.

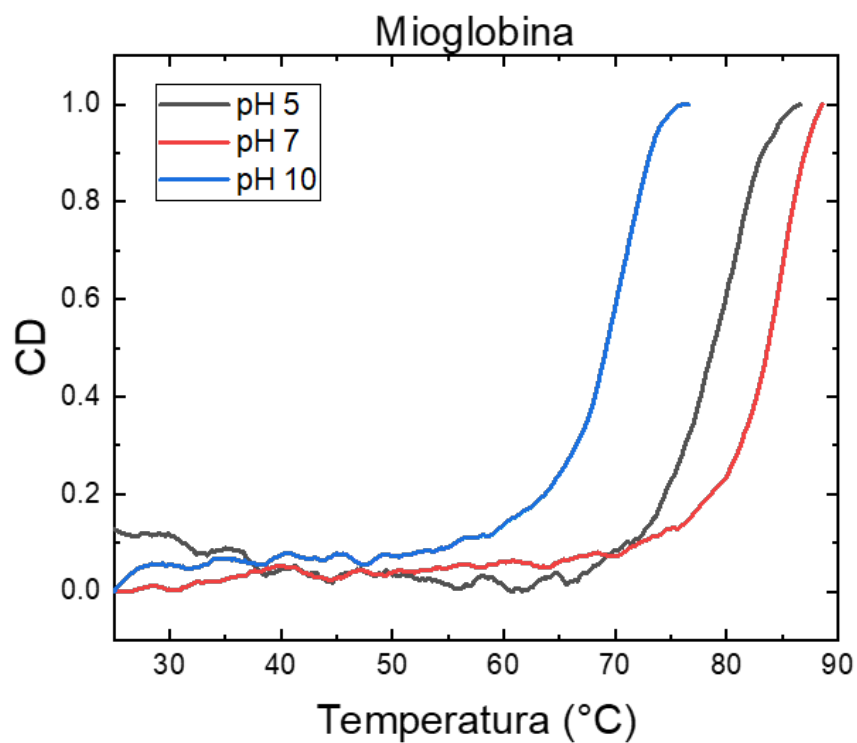


Figura 5.14: Transiciones térmicas de mioglobina nativa a desnaturada; pH 5.0 desde los 25 °C a 86 °C (línea negra), pH 7.0 desde los 25 °C a 88 °C (línea roja) y pH 10.0 desde los 25 °C a 76°C (línea azul). Las gráficas se normalizaron para efectos de comparación.

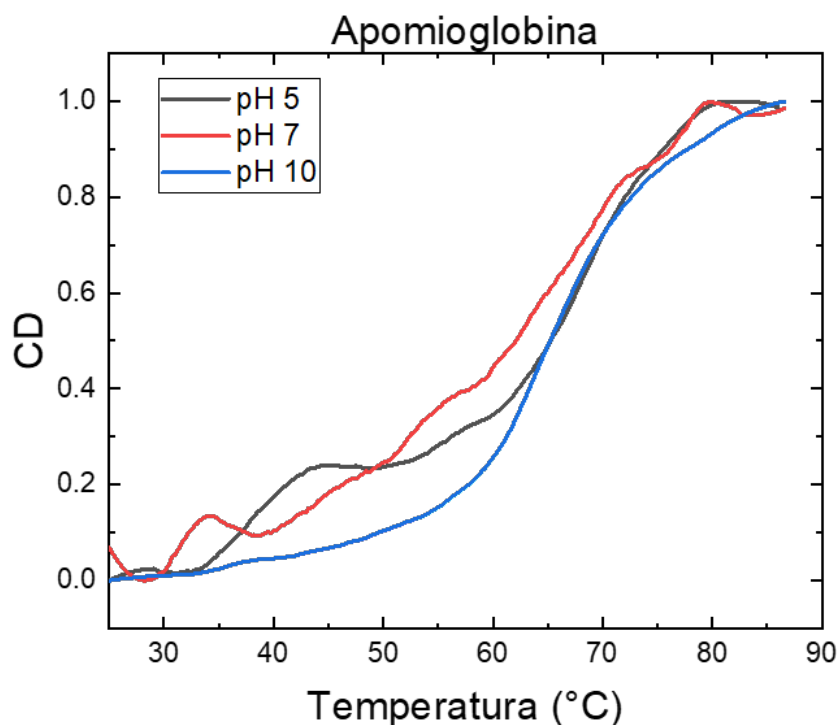


Figura 5.15: Transiciones térmicas de apomioglobina nativa a desnaturalizada; Apomioglobina: pH 5.0 desde los 25 °C a 86 °C (línea negra), pH 7.0 desde los 25 °C a 86.6 °C (línea roja) y pH 10.0 desde los 25 °C a 86.6 °C (línea azul). Las gráficas se normalizaron para efectos de comparación.

Las siguientes Figuras 5.16 y 5.17 presentan los espectros DC de la mioglobina y la apomioglobina desnaturalizadas. Los espectros de la mioglobina muestran una forma similar entre ellos. Esta consistencia en los espectros DC sugiere que la mioglobina mantiene una conformación estructural similar independiente del pH del medio, consistente con lo observado en la Figura 5.12. Por otro lado, se observa una mayor diferencia en los espectros de la apomioglobina desnaturalizada a pH 10, mientras que a pH 5 y 7 los espectros son bastante similares. Estos resultados indican que la estructura desnaturalizada de la apomioglobina es más sensible a cambios en el pH básico en comparación con la mioglobina.

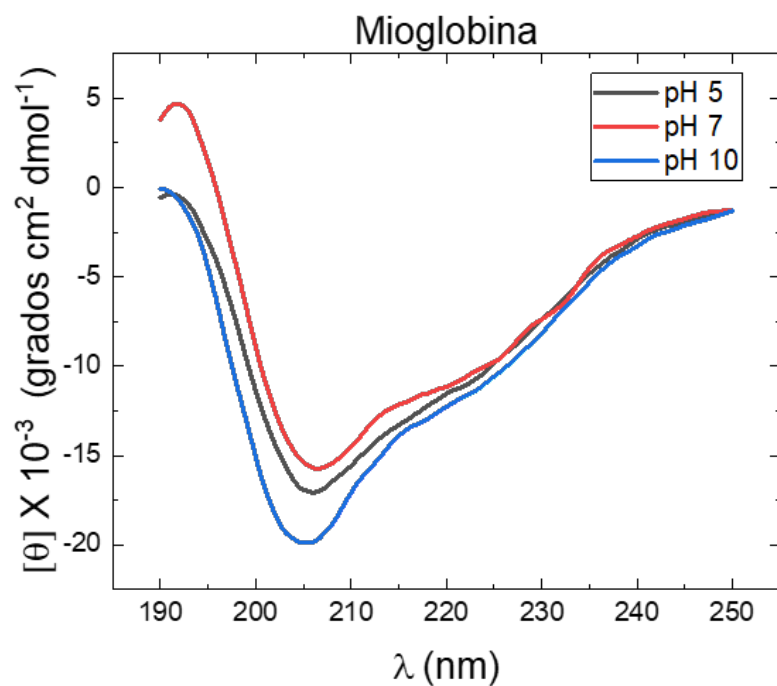


Figura 5.16: Espectros DC de mioglobina desnaturalizada termicamente a los diferentes valores de pH estudiados; **pH 5.0 a 86 °C** (línea negra), **pH 7.0 a 88 °C** (línea roja) y **pH 10.0 a 76 °C** (línea azul). Las gráficas se ajustaron con la altura del inicio del espectro a pH 7 para efectos de comparación.

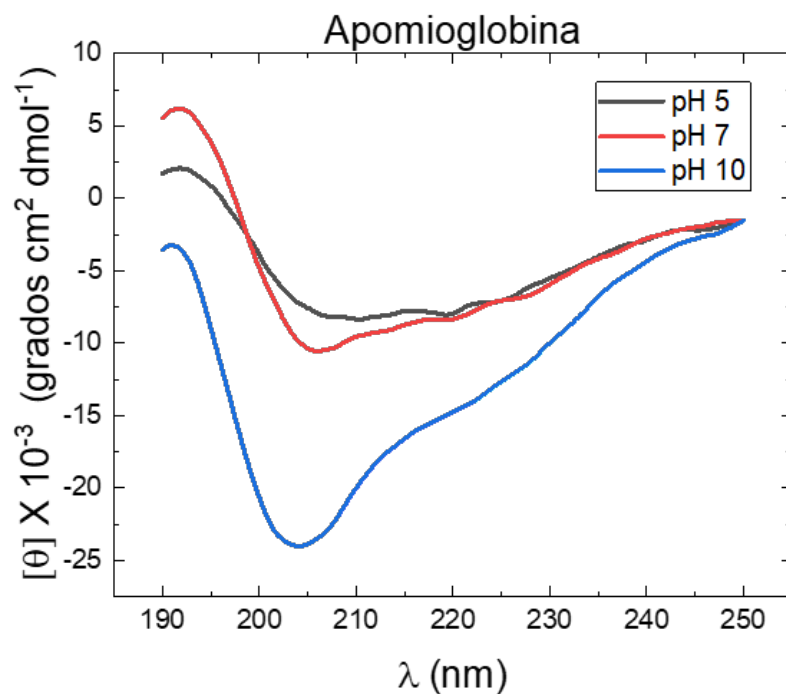


Figura 5.17: Espectros DC de apomioglobina desnaturalizada termicamente a diferentes valores de pH; **pH 5.0 a 86 °C** (línea negra), **pH 7.0 a 86.6 °C** (línea roja) y **pH 10.0 a 86.6 °C** (línea azul). Las gráficas se ajustaron con la altura del inicio del espectro a pH 7 para efectos de comparación.

La siguiente tabla, presenta los resultados de la desconvolución de los espectros DT de las proteínas, utilizando el promedio de los algoritmos SELCON 3 y CONTIN LL con el set de referencia 7 [6, 7]. Este conjunto de datos se seleccionó debido a que mostró mejores resultados con los espectros desnaturalizados en comparación con el set 4 [6, 7], como se observó en el caso de la lisozima (Tabla 5.3). Es importante destacar que, en el caso de la apomioglobina a pH 10, no se promediaron ambos algoritmos debido a que el RMSD del método SELCON 3 era demasiado alto (2.974), lo que indicaba una discrepancia significativa entre los datos experimentales y los calculados por el algoritmo. Por lo tanto, se descartaron estos valores y solo se reportaron los resultados obtenidos mediante el algoritmo CONTIN LL. Dados los datos obtenidos, ambas proteínas muestran una mayor cantidad de estructura desordenada, siendo pH 5 y 7 muy similares y pH 10 el que presenta la mayor cantidad de estructura desordenada en ambas proteínas.

Tabla 5.7: Fracciones de estructura secundaria de mioglobina y apomioglobina desnaturalizadas a diferentes valores de pH. Los valores de la Tabla son el promedio de los valores obtenidos por los métodos CONTIN LL y SELCON 3 con el set de referencia 7. Entre paréntesis se encuentra la desviación al valor promedio.

	Mioglobina			Apomioglobina		
Estructura	pH 5.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 10.0
Hélices	0.25 (0.01)	0.27 (0.02)	0.23 (0.00)	0.16 (0.00)	0.22 (0.01)	0.26
Segmentos β	0.13 (0.09)	0.13 (0.12)	0.03 (0.00)	0.21 (0.00)	0.16 (0.02)	0.03
Giros β	0.17 (0.04)	0.18 (0.06)	0.13 (0.00)	0.17 (0.00)	0.17 (0.03)	0.12
No ordenada	0.43 (0.17)	0.41 (0.17)	0.59 (0.00)	0.45 (0.01)	0.45 (0.05)	0.59

5.2.3. Fluorescencia de la mioglobina

En la Figura 5.18 se muestran los cambios observados en los espectros de fluorescencia de la mioglobina a pH 7, excitando a 280 nm. A 25 °C, el máximo de emisión se localiza cerca de 327 nm. Conforme la temperatura incrementa, el máximo de emisión se desplaza ligeramente hacia longitudes de onda más largas, alcanzando aproximadamente 331 nm a 90 °C. Asimismo, se registra un aumento en la intensidad de fluorescencia a partir de los 72.5 °C conforme la temperatura se eleva, alcanzando su punto máximo a 90 °C. Estos cambios en los espectros se producen de manera progresiva, lo que indica una posible transición estructural relevante en la proteína, en este rango de temperatura.

Este mismo comportamiento se observa a pH 5, donde inicialmente hay una disminución de la fluorescencia (hasta los 55°C), y después comienza a incrementar la intensidad de fluorescencia teniendo el pico más alto en intensidad a los 90°C. Asimismo, hay un corrimiento hacia longitudes más largas, iniciando a los 25°C con una longitud de onda de aproximadamente 314 nm y a los 90°C está en 330 nm (Ver Apéndice B).

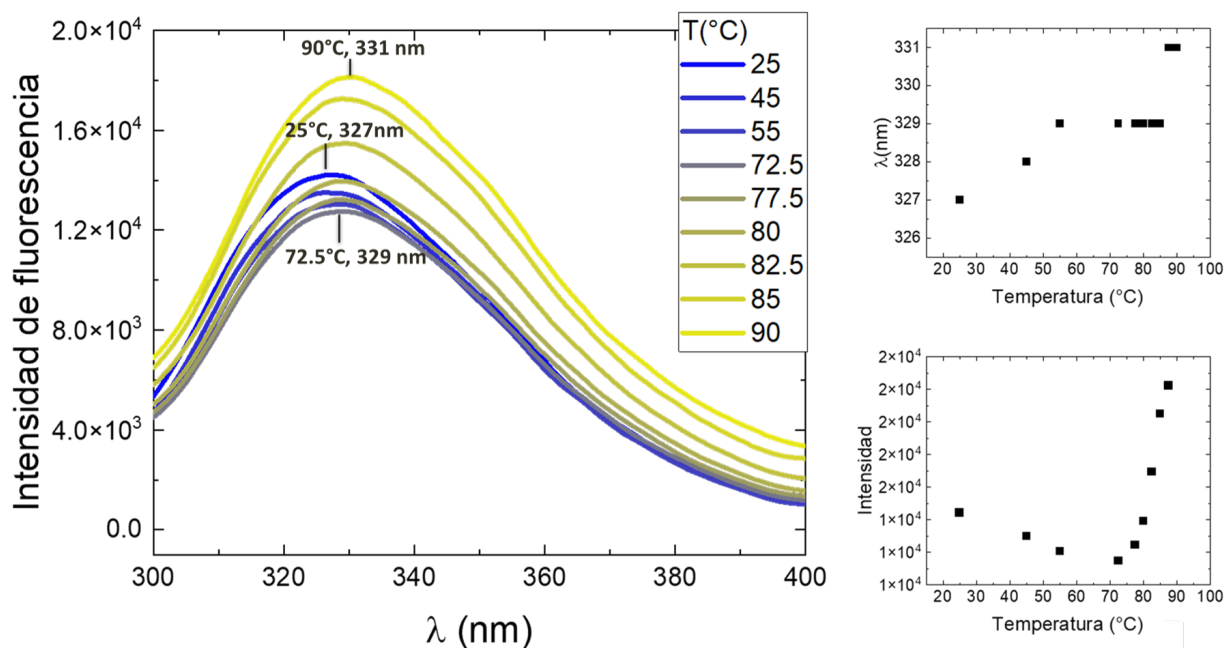


Figura 5.18: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de mioglobina a pH 7, excitando a 280 nm. En las gráficas pequeñas a la derecha se visualiza de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como, la disminución de la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.

A continuación, se presentan los espectros de fluorescencia de la mioglobina a pH 10, registrados a distintas temperaturas (Figura 5.19). A 25°C, el espectro muestra un máximo de emisión en 328 nm, con una intensidad de fluorescencia relativamente alta. Conforme se incrementa la temperatura, se observa un desplazamiento gradual del máximo de emisión hacia longitudes de onda mayores, alcanzando 331 nm a 70°C y 335 nm a 80°C. Este desplazamiento indica un cambio en el entorno químico de los residuos fluorescentes.

Simultáneamente, la intensidad de fluorescencia disminuye con el aumento de la temperatura, hasta los 60°C. En este intervalo de 60°C a 70°C, ocurre nuevamente un aumento en la intensidad, marcando un punto de transición térmica. A temperaturas más altas, entre 70°C y 80°C, la proteína parece estar completamente desnaturalizada y comienza a formar agregados, lo que explica el quenching observado y el desplazamiento hacia longitudes de onda mayores.

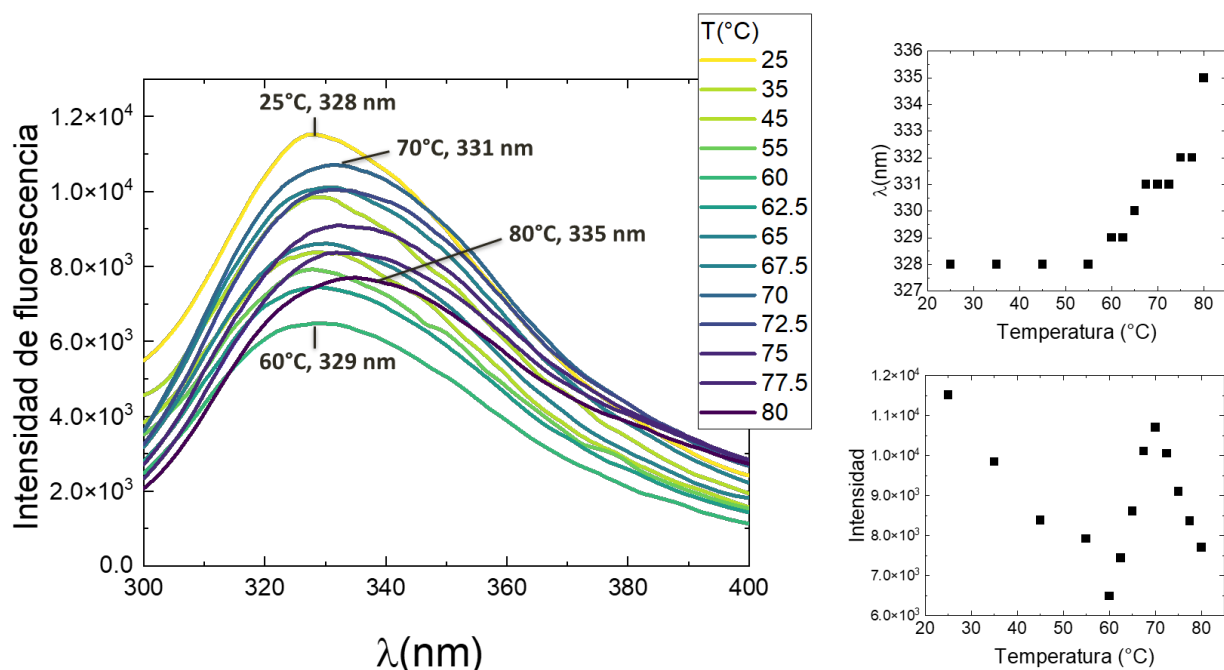


Figura 5.19: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de mioglobina a pH 10, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.

5.2.4. Fluorescencia de la apomioglobina

La figura 5.20 presenta los espectros de fluorescencia de apomioglobina en solución *buffer* a pH 10, registrados desde los 25 °C hasta 90 °C, con una longitud de excitación en 280 nm. A 25 °C se aprecia un espectro con un máximo de emisión cerca de 319 nm con una intensidad y forma característica de una proteína bien estructurada en su estado nativo, donde los residuos aromáticos se encuentran en un entorno hidrofóbico. A medida que aumenta la temperatura, la intensidad de fluorescencia disminuye gradualmente, mientras que el máximo de emisión experimenta un corrimiento hacia longitudes de onda mayores, de igual manera que sucedió en los casos anteriores con las proteínas de lisozima y mioglobina. Lo que sugiere una mayor exposición de los residuos aromáticos al solvente. A partir de los 75 °C aproximadamente, los espectros de fluorescencia presentan una forma más aplanada y de menor intensidad, lo que indica una gran pérdida de la estructura terciaria en la proteína.

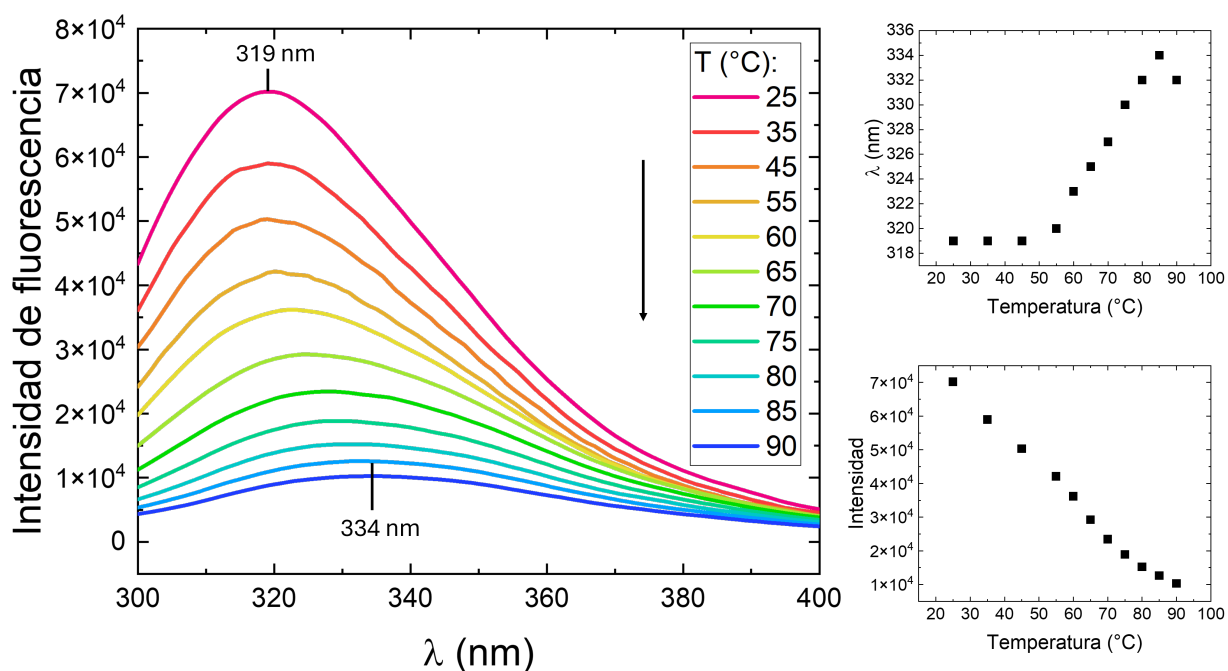


Figura 5.20: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de apomioglobina a pH 10, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.

Este mismo comportamiento en la fluorescencia se observa en los pH 7 y 5 (Ver Apéndice B sección B.3), donde inicialmente la intensidad de fluorescencia es alta y disminuye conforme aumenta la temperatura. Para pH 7 el espectro de mayor intensidad es a 25 °C con el máximo a 317nm, mientras el de menor intensidad fue a 90 °C con un máximo de intensidad de 327 nm. Finalmente para pH 5 la mayor intensidad registrada a temperatura ambiente fue a 318 nm, con un corrimiento hacia los 332 nm.

5.2.5. Grupos protonables en Mioglobina

Tabla 5.8: Cálculo de pKa (25°C) y Δ (80°C) de los grupos ionizables en la proteína de mioglobina a pH 7, usando como modelo cristalografico el PDB ID: 2FRF [15].

Residuo	pKa	Δpka (80°C)	Residuo	pKa	Δpka (80°C)
GLU 41A	4.78	-0.1637	LYS 47A	10.5	-1.4732
GLU 52A	4.64	-0.1637	LYS 50A	10.43	-1.4732
HIS 24A	7.08	-0.8457	LYS 56A	10.15	-1.4732
HIS 36A	6.36	-0.8457	LYS 62A	10.43	-1.4732
HIS 48A	7.02	-0.8457	LYS 63A	10.43	-1.4732
HIS 64A	6.43	-0.8457	LYS 77A	10.29	-1.4732
HIS 81A	6.5	-0.8457	LYS 78A	10.5	-1.1458
HIS 82A	7.3	-0.8457	LYS 79A	10.5	-1.4732
HIS 93A	6.5	-0.8457	LYS 87A	10.5	-1.4732
HIS 97A	6.5	-0.8457	LYS 96A	10.5	-1.4732
HIS 113A	6.22	-0.8457	LYS 98A	10.5	-1.4732
HIS 116A	6.5	-0.8457	LYS 102A	10.5	-1.4732
HIS 119A	6.36	-0.8457	LYS 118A	10.22	-1.4732
N+ 16A	8	-1.1458	LYS 133A	10.01	-1.4732
LYS 42A	10.5	-1.4732	LYS 145A	10.5	-1.4732
LYS 45A	10.22	-1.4732	LYS 147A	10.5	-1.4732

Los principales grupos protonables de la mioglobina que muestran cambios relevantes entre pH 5, 7 y 10 se muestran en la Tabla 5.8 (para visualizar la lista completa de los residuos protonables, ver Apéndice B.2). Para cada uno de ellos se determinaron sus valores de pKa, mediante el servidor *Propka* [16] así como sus valores de ΔpKa a 80 °C, utilizando las entalpías reportadas en [45] (Ver Apéndice C, Anexo A). En general, se observó un desplazamiento negativo en los valores de ΔpKa , lo cual indica que estos residuos se desprotonan a un pH más bajo a temperaturas altas que a temperatura ambiente.

Discusión y análisis de resultados

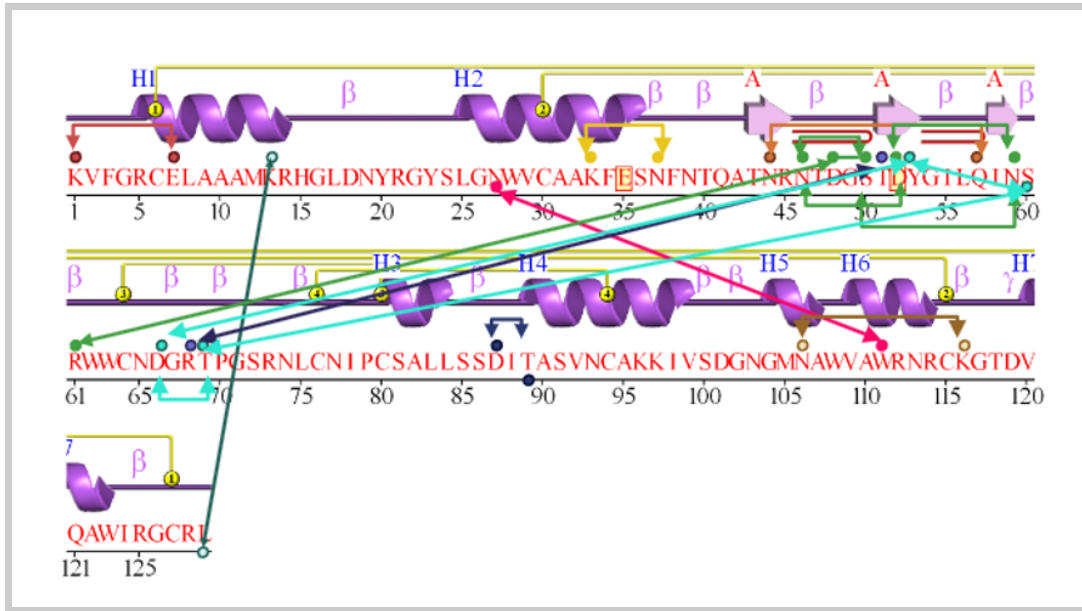
6.1. Lisozima

Los espectros DC de la lisozima, así como la desconvolución de los mismos mediante los algoritmos CONTIN LL y SELCON 3, muestran una gran resistencia a la desestabilización de la estructura secundaria bajo diferentes condiciones de pH (2.0, 7.0 y 10.0) a 25 °C. [49]; esta estabilidad se ve reflejada en la conservación de las señales características del espectro de DC, predominantemente de hélices alfa, y en los resultados obtenidos con los algoritmos CONTIN LL y SELCON 3 (Tabla 5.2), en los cuales no se observan cambios significativos en las fracciones de hélices alfa, segmentos beta y regiones desordenadas. Esta característica ayuda al mantenimiento de su actividad catalítica en un rango amplio de pH, para desempeñar su función en la defensa inmunológica [45].

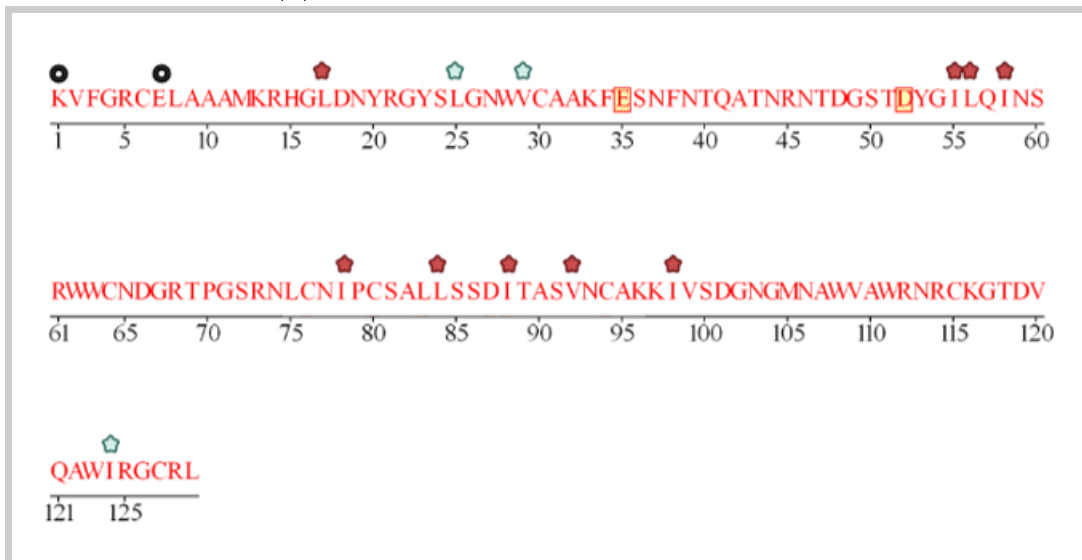
6.1.1. Contribución a la estabilidad de la proteína

En la Figura 6.1 se muestran las interacciones intramoleculares, a lo largo de la secuencia de aminoácidos, destacando los puentes disulfuro, puentes salinos, residuos hidrofóbicos, las hélices alfa, hojas beta y las redes de hidrógeno presentes en la lisozima. La formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteínas podría ayudar a explicar la estabilidad de la estructura terciaria de la proteína, en ambientes extremos; debido a que estas uniones covalentes limitan la flexibilidad conformacional y protegen los grupos hidrofóbicos de alteraciones en el ambiente, mientras que las redes de puentes de hidrógeno entre cadenas laterales también influyen en la resistencia a la desnaturalización [50, 51]. La Figura 6.2 ilustra las redes de puentes de hidrógeno en la proteína, y cómo se encuentran distribuidas en la forma compacta de la proteína.

(a) Redes de hidrógeno, estructura secundaria y puentes disulfuro.



(b) Puentes salinos y clusters hidrofobicos.



Leyenda gráfica:

Clúster Hidrofóbico: 1 (red star), 2 (green star), Puente Salino: (black circle), Estructura secundaria: (purple helix and arrow),
 Red de hidrógeno: 0 (red), 1 (green), 2 (yellow), 3 (brown), 4 (blue), 5 (pink), 6 (orange), 7 (cyan), 8 (black), 9 (black), Puente disulfuro: (yellow bar with 1)

Figura 6.1: Representación de las interacciones intramoleculares en la secuencia de aminoácidos de la lisozima. La imagen fue generada a partir del análisis estructural con *PDBsum* (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>) [23] y editada con *BioRender* (<https://www.biorender.com/>).

Redes de hidrogeno en lisozima			
Clúster	Donador - Aceptor	Clúster	Donador - Aceptor
0	LYS1 – GLU7	4	ARG61 – ASP48
1	LYS13 – LEU129	4	SER50 – ASP48
2	LYS33 – ASN37	5	ARG68 – THR51
3	ASN44 – GLN57	6	TRP111 – ASN27
4	ASN46 – SER50	7	LYS116 – ASN106
4	ASN46 – ASP52	8	TYR53 – ASP66
4	ASN59 – ASP52	8	SER60 – THR69
4	ASN59 – SER50	8	THR69 – ASP66
4	ARG61 – ASP48	9	THR89 – ASP87

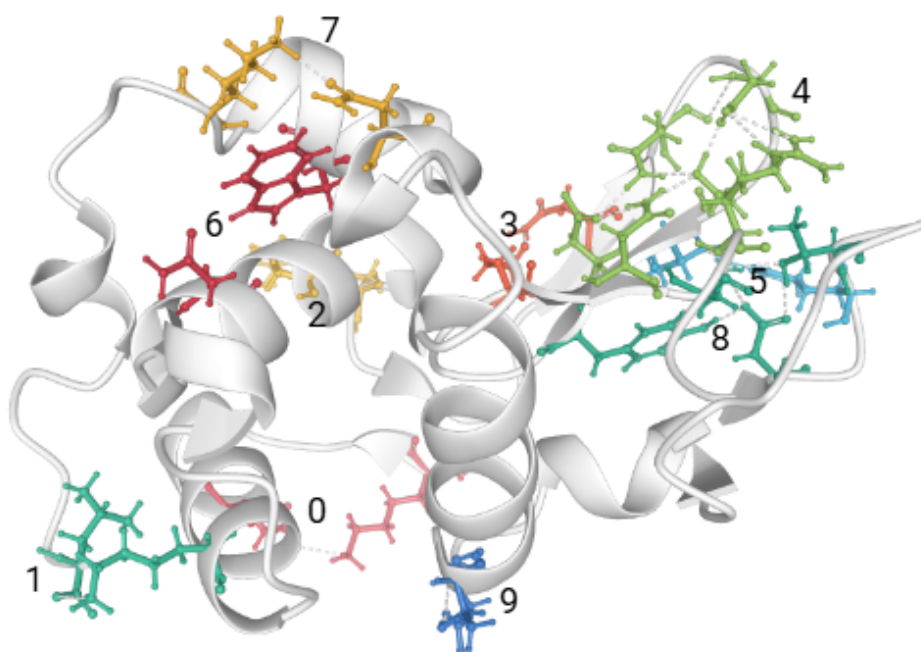


Figura 6.2: Tabla y representación tridimensional de los diferentes *clústers* de redes de hidrógeno. En la tabla se indican los residuos que participan como donadores y aceptores en los puentes de hidrógeno dentro de cada *clúster* identificados en la plataforma *ProteinTools* (<https://proteintools.uni-bayreuth.de/>) [24], usando como referencia el modelo cristalografico PDB ID: 193L [14]. La representación tridimensional de las redes de puentes de hidrógeno fue visualizada en *PyMOL* [20, 21, 22].

Además, en la Figura 6.3 se muestran los clústeres hidrofóbicos de la lisozima; el clúster principal (rojo) compuesto principalmente por aminoácidos no polares e hidrofóbicos como isoleucina, leucina y valina, constituye el núcleo hidrofóbico de la proteína. Este núcleo contribuye a la estabilidad de la estructura nativa, incluso en entornos ácidos o alcalinos, al favorecer el empaquetamiento interno y minimizar la exposición de los residuos hidrofóbicos al entorno [52, 53].

Por otro lado, también se observa un clúster hidrofóbico secundario (verde), ubicado en una región más periférica, que también aporta estabilidad local al ayudar a mantener unidas ciertas partes cercanas de la proteína, facilitando que esa zona conserve su forma [51].

Clústeres hidrofóbicos Lisozima		
Clúster	Aminoácido	Posición
1	ILE	78
	ILE	58
	ILE	98
	ILE	55
	ILE	88
	LEU	83
	LEU	56
	LEU	17
	Val	92
2	ILE	124
	LEU	25
	LEU	129
	Val	29

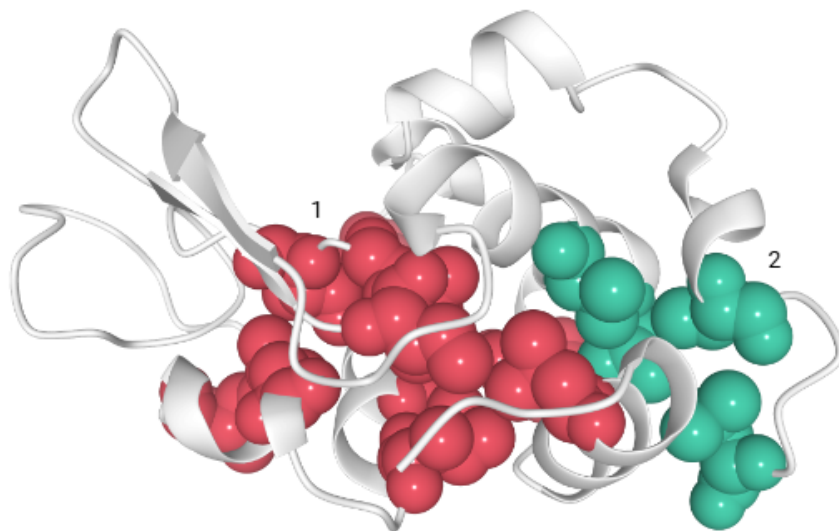


Figura 6.3: Representación de los *clústers* hidrofóbicos de la lisozima a partir de la información obtenida en *ProteinTools* [24] y representados mediante *PyMOL* [20, 21, 22] utilizando el modelo cristalográfico de la lisozima (PDB ID: 193L [14]). Los residuos hidrofóbicos que forman el núcleo principal se muestran en rojo (clúster 1), el clúster hidrofóbico secundario se visualiza en verde (clúster 2).

Los puentes salinos son interacciones electrostáticas que contribuyen a la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas y, en algunos casos, ayudan a mantener la estructura secundaria; estas funcionan como anclas entre partes de la cadena polipeptídica, evitando que se repelan o se desorganicen. En el caso de la lisozima, existe un puente salino formado entre el grupo Glu 7 y Lys 1 (Figura 6.4).

Aunque los puentes salinos ayudan a la estabilidad de la proteína estos son muy sensibles al cambio de pH, ya que, la formación de estos depende de la ionización de los grupos, en condiciones neutras ayudan a que la proteína sea más estable ante cambios como la temperatura, y en zonas donde hay varios grupos con la misma carga, los puentes salinos también ayudan a contrarrestar estas repulsiones y ayudan a compactar la proteína.

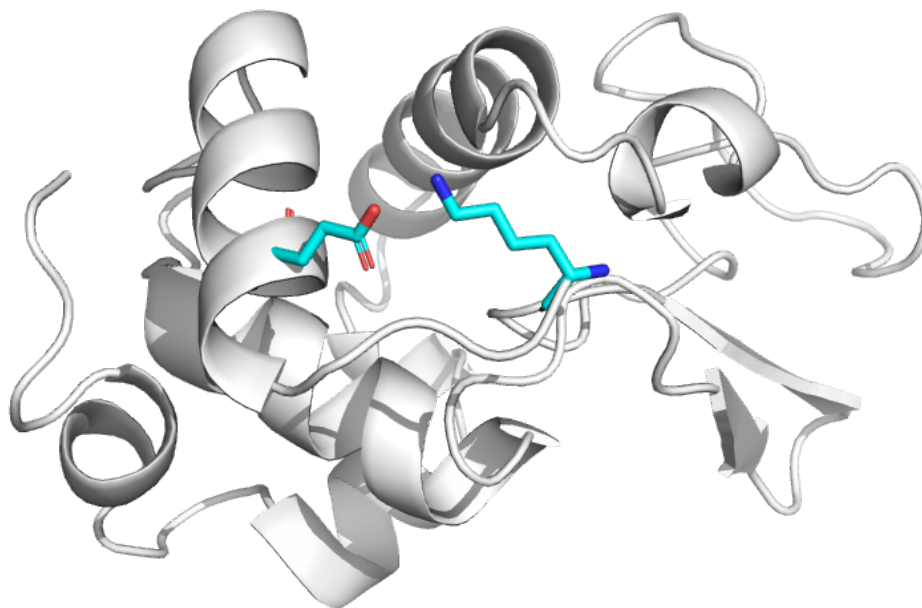


Figura 6.4: Puente salino en la proteína de lisozima, formado entre el grupo Glu 7 y Lys 1. Obtenida con el programa *ProteinTools* [24] y visualizado a través del software *PyMol* [20, 21, 22], (PDB ID: 193L [14]).

6.1.2. Análisis de la desnaturalización térmica de lisozima por DC

De acuerdo con lo experimentado, los perfiles de desnaturalización térmica (5.5) muestran diferencias en la estabilidad térmica dependiendo del pH; la transición térmica a pH 7.0 finaliza a una temperatura mayor (84.6°C) en comparación con pH 2.0 (70°C) y pH 10.0 (82.8°C). Esto indicaría que a pH neutro hay una mayor resistencia a la temperatura que en ambientes ácidos o alcalinos. Esto puede deberse a la desprotonación o protonación de algunos residuos sensibles al pH, afectando las interacciones intramoleculares y, por tanto, afectando también a la estabilidad de la proteína [54]. Este aspecto se analizará más adelante con mayor detalle. Por otro lado, los espectros DC de lisozima desnaturalizada (Figura 5.6) muestran diferencias en la estructura secundaria. Al realizar el análisis de los espectros desnaturalizados mediante los algoritmos ya mencionados anteriormente, notamos que tanto en medio ácido, neutro o alcalino, hay una disminución en el contenido de hélices alfa; sin embargo, a pH 10 en particular, esta disminución viene acompañada por un incremento en el contenido de segmentos beta y estructura desordenada, en comparación con los otros pH. De estos datos se puede inferir que, en medios alcalinos, la lisozima adopta una conformación parcialmente desnaturalizada o no pierde completamente su organización estructural, sino que mantiene cierto orden residual [43]. Esta reorganización podría estar favorecida por la formación de nuevas interacciones entre cadenas laterales expuestas, tras la pérdida de la estructura nativa, como resultado del calentamiento.

En condiciones ácidas (pH 2), la pérdida de estructura secundaria se ve reflejada por un aumento de estructura desordenada, esto puede atribuirse a la pérdida de las interacciones intramoleculares y a la protonación de grupos carboxilos de los residuos de ácido aspártico y glutámico, que, a este pH, se encuentran predominantemente protonados, lo cual impide la formación de interacciones electrostáticas como puentes salinos, con residuos básicos, como lisina o arginina. Además, en la lisozima, los residuos básicos como lisina o histidina se encuentran protonados en condiciones ácidas, lo que provoca una acumulación de cargas positivas, generando repulsión entre residuos cercanos y disminuyendo aún más la estabilidad de la proteína.

6.1.3. Análisis de la desnaturalización térmica de lisozima por fluorescencia

El análisis de fluorescencia nos permite evaluar los cambios estructurales en la lisozima, siguiendo los residuos aromáticos presentes en la proteína, principalmente por triptófano, tirosina y fenilalanina. En general, el triptófano es el principal contribuyente a

la señal de fluorescencia cuando se excita a 280 nanómetros, lo que permite medir cambios en su entorno ante variaciones de pH y/o temperatura. En nuestro caso los espectros de los 3 diferentes pH que se han estudiado en este trabajo, revelaron un desplazamiento hacia el rojo durante la desnaturalización, que se asocia principalmente con la exposición de triptófano al solvente. Este desplazamiento fue más evidente a pH 2, lo cual podría estar relacionado con la menor estabilidad térmica observada a este pH. Adicionalmente, el aumento en la intensidad de fluorescencia a pH 10 entre 60° y 65 °C (5.8) podría reflejar una reorganización estructural temporal antes del colapso conformacional [55].

En la siguiente sección se presentará un análisis detallado de los aspectos de fluorescencia obtenidos, destacando las variaciones en el microambiente de los residuos aromáticos en función del pH.

6.1.4. Contribución de los grupos protonables a la estabilidad de la lisozima

Los residuos protonables en la lisozima, como histidina (**HIS 15A**), tirosina (**TYR 20A, TYR 23A, TYR 53A**), lisina (**LYS 1A, LYS 13A, LYS 33A, LYS 96A, LYS 97A, LYS 116A**) y arginina (**ARG 5A, ARG 14A, ARG 21A, ARG 45A, ARG 61A, ARG 68A, ARG 73A, ARG 112A, ARG 114A, ARG 125A, ARG 128A**) juegan un papel importante en la estabilidad de la estructura secundaria y terciaria de la proteína. A pH 7, se encuentran en estados de protonación específicos que mantienen interacciones como los puentes de hidrógeno y el puente salino, que son esenciales para mantener la estructura proteica; mientras que en pH extremos (2.0 y 10.0), se observa un cambio en la intensidad de fluorescencia asociado a la alteración en los estados de protonación de estos residuos, causando perturbaciones en el entorno hidrofóbico y en las interacciones internas. Por ejemplo, la histidina con pKa de 7.15 cerca del pH neutro puede estar parcialmente protonada, facilitando puentes de hidrógeno. Sin embargo, en pH ácido, la histidina se encuentra completamente protonada, reforzando estas interacciones, mientras que en pH alcalino su desprotonación podría desestabilizar dichos puentes. Los residuos de lisina y arginina, con pKa superior a 10, permanecen protonadas en todo el rango de pH estudiado (2.0, 7.0 y 10.0); al estar protonadas contribuyen con cargas positivas que estabilizan la estructura mediante interacciones con residuos negativos. Esto podría ayudar a que la estructura secundaria de la lisozima se conserve en un amplio rango de pH como se observó en los espectros de dicroísmo.

Una vez realizada la desnaturalización térmica de la proteína, los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular a alta temperatura revelan diferencias significativas entre los tres pH analizados, lo cual indica la presencia de estructuras residuales. Estas estructuras representan regiones parcialmente organizadas que persisten incluso en condiciones desestabilizantes. La presencia de estas estructuras puede explicarse por la retención de interacciones internas ya antes mencionadas. Lo que indica que la protonación o desprotonación de residuos clave como lisina, arginina, tirosina o histidina, etc. puede alterar la red de interacciones, resultando en desnaturalizaciones con retención de elementos parcialmente estructurados. Así, el espectro resultante muestra una mezcla de regiones desordenadas con otras parcialmente estructuradas.

Por tanto, la existencia de estructuras residuales es una consecuencia de cómo los distintos pH modulan las interacciones moleculares y, en consecuencia, los caminos de desnaturalización térmica.

6.1.5. Comparación de los estados desnaturalizados térmicamente: influencia del pH y de la naturaleza estructural de las proteínas

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que los estados DT de las proteínas estudiadas no son homogéneos, sino que presentan formas estructurales diferentes en función del pH del medio. Lo que se ha observado es que este comportamiento no solo depende de las condiciones externas como la temperatura o el pH sino también de la naturaleza estructural de cada proteína y de su composición en términos de carga neta e hidrofobicidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden resumirse en las observaciones siguientes:

1. En el caso de la lisozima se observó un cambio en el contenido de segmentos beta a pH 10 ($f\beta = 0.32$) en contraste con el observado a pH 7 ($f\beta = 0.16$) y sobre todo a pH 2 ($f\beta = 0.04$), lo que indica una transición hacia conformaciones ricas en estructura beta bajo condiciones alcalinas [56]. Este cambio se ve acompañado de una disminución en el contenido de hélices α ($f\alpha = 0.21$ a 0.12) y de una disminución en la fracción de estructura no ordenada ($fNO = 0.65$ a 0.39).

Este fenómeno se correlaciona con los espectros de fluorescencia, mientras que en pH 7 y 2 se observa un corrimiento hacia el rojo de 9 y 12 nanómetros respectivamente,

indicando una mayor exposición del triptófano a entornos polares. En el caso de pH 10 dicho desplazamiento es menor (alrededor de 6 nm), lo cual sugiere una organización diferente del entorno de los cromóforos fluorescentes, posiblemente causado por una mayor compactación intramolecular o por la formación de estructuras beta que limitan la exposición del triptófano al solvente.

2. En contraste, la mioglobina, con estructura nativa casi en su mayoría helicoidal, no forma segmentos beta significativos en ningún pH al desnaturalizarse térmicamente ($f\beta = 0.13$ en pH 5 y 7; $f\beta = 0.03$ en pH 10) y presenta un notable aumento en la fracción no ordenada ($fNO = 0.43$ en pH 5; $fNO = 0.41$ en pH 7; $fNO = 0.59$ en pH 10) y bastante mayor que el de hélice alfa ($f\alpha = 0.25$ en pH 5; $f\alpha = 0.27$ en pH 7; $f\alpha = 0.23$ en pH 10) (ver tabla 5.7). Estos resultados sugieren que la ausencia de segmentos beta en la conformación nativa restringe la capacidad de la proteína para adoptar este tipo de estructura en el estado DT. Sin embargo, la mioglobina así como su apoproteína, forman estados DT a pH 7 y pH 10 ya que presentan un aumento importante en la fracción no ordenada ($fNO = 0.41$ en pH 7; $fNO = 0.59$ en pH 10), en concordancia con los valores de estructura secundaria, la estructura global del estado DT parece tener una solvatación extensa en ambos valores de pH, como lo indican los espectros de fluorescencia intrínseca.
3. El caso de la apomioglobina refuerza esta conclusión: aunque se trata de la misma cadena polipeptídica que la mioglobina, la ausencia del grupo hemo aumenta la flexibilidad estructural y permite una mayor formación de segmentos β a pH 5 y 7 ($f\beta = 0.21$ y 0.16 , respectivamente), pero no así en pH 10 ($f\beta = 0.028$), donde predomina una conformación no ordenada ($fNO = 0.59$).

Si bien se realizaron análisis estructurales comparativos entre lisozima, mioglobina y apomioglobina, el estudio en profundidad de los estados desnaturalizados se enfocó únicamente en lisozima, que mostró mayor riqueza conformacional en los estados DT. Esto debido a que tanto la mioglobina como la apomioglobina muestran mayormente estructura desordenada independientemente del pH del medio, lo que indica que ambas proteínas en sus estados DT adoptan conformaciones mayormente desplegadas. Por lo que se consideró que un análisis detallado sobre sus interacciones intramoleculares no aportaría información relevante sobre posibles transiciones conformacionales.

Basándonos en los resultados anteriores, proponemos tentativamente que un requisito para la formación de abundante estructura beta en un estado DT es la preexistencia de esta estructura en la proteína nativa; es decir, si alguna parte de los segmentos beta es más resistente al aumento de temperatura que las regiones de alfa hélice, serviría entonces como

centro de formación de nuevas regiones beta. Con respecto a este punto, en simulaciones de dinámica molecular de los cambios conformacionales inducidos por alta temperatura en la lisozima [56], se ha propuesto que una ruta que llevaría a la formación de fibrillas involucra una formación inicial de segmentos beta en moléculas individuales; subsecuentemente, las moléculas con segmentos beta se ensamblarían para dar lugar a hojas beta intermoleculares que forman la estructura básica de las fibrillas.

Sin embargo, queda entonces por explicar por qué el estado DT en la lisozima forma abundante estructura beta solamente en un pH elevado. En relación con esto último, y como se mencionó en la sección *Introducción* de esta tesis, la yTIM muestra resultados contrastantes ya que forma un estado DT con más estructura beta en un pH cercano a 7.0, mientras que a pH entre 9.0 y 10.0 el estado DT posee más regiones no ordenadas (ver Fig. 1.2). Como un intento de interpretar estos resultados, nos basamos en el análisis de proteínas desordenadas de forma nativa (*natively unfolded proteins*) en condiciones fisiológicas, comparativamente con proteínas pequeñas plegadas, es decir, con estructura tridimensional bien definida [57]. Estos autores han encontrado que las *natively unfolded proteins* están localizadas dentro de una región específica de un espacio carga—hidrofobicidad, en el cual una combinación de baja hidrofobicidad y gran carga neta representan las características que distinguen las proteínas no estructuradas; en este espacio, la separación entre los dos grupos de moléculas está dada por la expresión: $\langle R \rangle = 2.785 \langle H \rangle = 1.151$, donde $\langle R \rangle$ es la carga neta media de la molécula y $\langle H \rangle$ es la hidrofobicidad media de la misma.

Siguiendo el enfoque señalado por Uversky, et al. [57], se calculó la carga que tendrían la lisozima y la yTIM a alta temperatura (ca. 80 °C), en diferentes valores de pH (ver sección A.3 y apéndice 7.3); se calculó también el índice GRAVY (grand average index), que indica la hidropatía global de una proteína. Los resultados se muestran en la Figura 6.5.

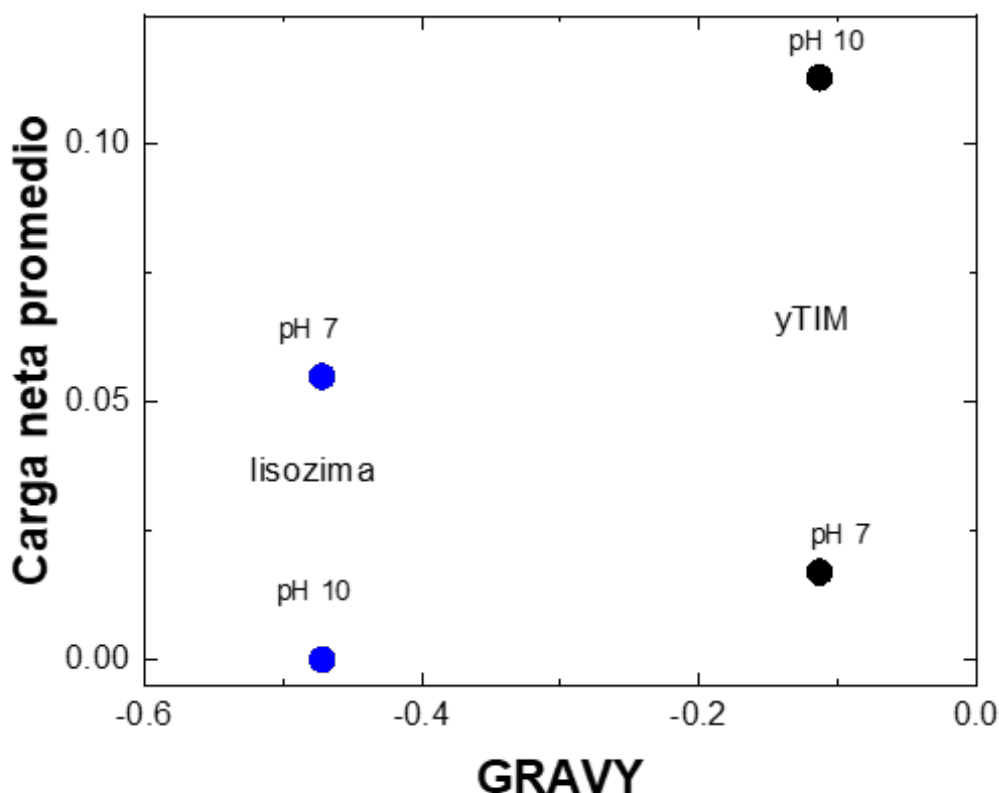


Figura 6.5: Carga neta promedio versus hidropatía en lisozima (azul) y yTIM (negro). La carga neta promedio se expresa como el valor absoluto de la carga total dividida entre el número de aminoácidos. La hidropatía se calculó usando ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) [25] que proporciona el índice GRAVY; en esta escala, el carácter hidrofóbico aumenta hacia la derecha.

En la figura es evidente que los valores de pH en los que las proteínas consideradas forman estados DT con más estructura no ordenada aparecen en la parte superior de la figura; esto parece indicar que una menor hidrofobicidad aunada a una carga neta relativamente mayor son factores para la formación de más estructura desordenada en un estado desnaturalizado térmicamente.

Conclusiones y perspectivas

Por lo tanto, proponemos que la formación de diferentes tipos de estados DT depende de las siguientes variables:

7.1. Conclusión General:

Valores de pH extremos inducen cambios en la ionización de los residuos protonables, rompiendo algunas interacciones intramoleculares, favoreciendo o dificultando ciertos tipos de reordenamiento estructural.

7.2. Conclusión para cada proteína en particular:

1. Contenido estructural nativo: Proteínas con segmentos beta nativos son más propensas a formar estructuras beta en condiciones desnaturalizantes a pH alcalino cuando el pH genera una carga neta pequeña.
2. Hidrofobicidad global: Una baja hidrofobicidad favorece estados menos estructurados
3. Efectos térmicos: El calentamiento desestabiliza las estructuras nativas y, en algunos casos, puede inducir agregación o formación de nuevas interacciones intramoleculares.

7.3. Perspectivas

Una línea futura de trabajo consiste en aplicar la metodología empleada en este estudio a otras proteínas con diferentes características estructurales, como variaciones en contenido secundario, tamaño o hidrofobicidad. Incrementar la base de datos experimental

mediante el análisis de un conjunto más amplio de proteínas, que ayude a confirmar o descartar las hipótesis propuestas (conclusiones) en este trabajo.

Referencias

- [1] E Fabiani, AM Stadler, D Madern, MM Koza, Moeava Tehei, M Hirai, and G Zaccai. Dynamics of apomyoglobin in the α -to- β transition and of partially unfolded aggregated protein. *European biophysics journal*, 38:237–244, 2009.
- [2] UniProt Consortium. Uniprot: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1):D523–D531, 2023.
- [3] A. J. Miles, S. G. Ramalli, and B. A. Wallace. Dichroweb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein Science*, 2021.
- [4] L. Whitmore and B. A. Wallace. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89:392–400, 2008.
- [5] L. Whitmore and B. A. Wallace. Dichroweb: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32:W668–W673, 2004.
- [6] Narayana Sreerama and Robert W. Woody. Estimation of protein secondary structure from cd spectra: Comparison of contin, selcon, and cdsstr methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, 287(2):252–260, 2000.
- [7] Narasimha Sreerama, Sergei Yu Venyaminov, and Robert W. Woody. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Analytical Biochemistry*, 287(2):243–251, 2000.
- [8] A. et al. Micsonai. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 50:W511–W518, 2022.
- [9] A. et al. Micsonai. Cdspectra: database and tool for circular dichroism spectra classification of proteins. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9:863141, 2022.

- [10] A. Micsonai, J. Kardos, C. Behrens, and M. Micsonai. Circular dichroism spectroscopy for protein secondary structure analysis. In B.A. Wallace, editor, *Methods in Molecular Biology*, volume 2199, pages 173–209. Humana Press, 2021.
- [11] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, and J. Kardos. Bestsel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, 46(W1):W315–W322, 2018.
- [12] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y. H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, and J. Kardos. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24):E3095–E3103, 2015.
- [13] József Kardos, Márton Péter Nyiri, Éva Moussong, Frank Wien, Tamás Molnár, Nikolett Murvai, Vilmos Tóth, Henrietta Vadász, Judit Kun, Frédéric Jamme, et al. Guide to the structural characterization of protein aggregates and amyloid fibrils by cd spectroscopy. *Protein Science*, 34(3):e70066, 2025.
- [14] MC Vaney, S Maignan, M Ries-Kautt, and A Ducruix. High-resolution structure (1.33 Å) of a hew lysozyme tetragonal crystal grown in the apcf apparatus. data and structural comparison with a crystal grown under microgravity from spacehab-01 mission. *Biological Crystallography*, 52(3):505–517, 1996.
- [15] Daniel M Copeland, Alexei S Soares, Ann H West, and George B Richter-Addo. Crystal structures of the nitrite and nitric oxide complexes of horse heart myoglobin. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(8):1413–1425, 2006.
- [16] Hui Li, Andrew D. Robertson, and Jan H. Jensen. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pka values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4):704–721, 2005.
- [17] Norman J. Greenfield. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1:2876, 2007.
- [18] Ponciano García-Gutiérrez, Menandro Camarillo-Cadena, Liliana I Vera-Robles, Rafael A Zubillaga, and Andrés Hernández-Arana. Circular dichroism spectroscopic assessment of structural changes upon protein thermal unfolding at contrasting ph: Comparison with molecular dynamics simulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 274:121039, 2022.
- [19] Pratibha Kumari, Monika Kumari, and Hemant K Kashyap. How pure and hydrated reline deep eutectic solvents affect the conformation and stability of lysozyme: insights

- from atomistic molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(52):11919–11927, 2020.
- [20] Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.8. November 2015.
 - [21] Schrödinger, LLC. The AxPyMOL molecular graphics plugin for Microsoft Power-Point, version 1.8. November 2015.
 - [22] Schrödinger, LLC. The JyMOL molecular graphics development component, version 1.8. November 2015.
 - [23] Roman A. Laskowski, Joanna Jabłońska, Lenka Pravda, Radka S. Vařeková, and Janet M. Thornton. Pdbsum: Structural summaries of pdb entries. *Protein Science*, 27(1):129–134, 2018.
 - [24] Noelia Ferruz, Steffen Schmidt, and Birte Höcker. Proteintools: a toolkit to analyze protein structures. *Nucleic Acids Research*, 49(W1):W559–W566, 05 2021.
 - [25] Marc R. Wilkins, Elisabeth Gasteiger, Amos Bairoch, Jean-Claude Sanchez, Kirsten L. Williams, Ron D. Appel, and Denis F. Hochstrasser. Protein identification and analysis tools in the expasy server. *Methods in Molecular Biology*, 112:531–552, 1999.
 - [26] Thomas E. Creighton. *Proteins: Structures and Molecular Principles*. W. H. Freeman, New York, 1984. Capítulo 6.
 - [27] Thomas E. Creighton. *Proteins: Structures and Molecular Principles*. W. H. Freeman, New York, 1984. Capítulo 7.
 - [28] StudySmarter. Desnaturalización de las proteínas, n.d. Consultado el 21 de mayo de 2025.
 - [29] Bijan Ranjbar and Pooria Gill. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses—a review. *Chemical Biology & Drug Design*, 74:101–120, 2009.
 - [30] Reinhard Schweitzer-Stenner. Conformational propensities and residual structures in unfolded peptides and proteins. *Molecular BioSystems*, 8:122–133, 2012.
 - [31] Koichi Matsuo, Yoshie Sakurada, Ryuta Yonehara, Mikio Kataoka, and Kunihiro Gekko. Secondary-structure analysis of denatured proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *Biophysical journal*, 92(11):4088–4096, 2007.
 - [32] Elisia A Paiz, Karen A Lewis, and Steven T Whitten. Structural and energetic characterization of the denatured state from the perspectives of peptides, the coil library, and intrinsically disordered proteins. *Molecules*, 26(3):634, 2021.

- [33] Ariana Labastida-Polito, Georgina Garza-Ramos, Menandro Camarillo-Cadena, Rafael A Zubillaga, and Andrés Hernández-Arana. Complex kinetics and residual structure in the thermal unfolding of yeast triosephosphate isomerase. *BMC biochemistry*, 16:1–10, 2015.
- [34] Jui-Yoa Chang and Li Li. The unfolding mechanism and the disulfide structures of denatured lysozyme. *FEBS letters*, 511(1-3):73–78, 2002.
- [35] Shintaro Sugai and Masamichi Ikeguchi. Conformational comparison between α -lactalbumin and lysozyme. *Advances in biophysics*, 30:37–84, 1994.
- [36] GA Millikan. Muscle hemoglobin. *Physiological Reviews*, 19(4):503–523, 1939.
- [37] U. Flogel, M. W. Merx, A. Godecke, U. K. M. Decking, and J. Schrader. Myoglobin: a scavenger of bioactive no. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98:735–740, 2001.
- [38] Helen M. Berman, John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov, and Philip E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1):235–242, 2000.
- [39] S. W. Provencher. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications*, 27(3):213–227, 1982.
- [40] Ivo HM van Stokkum, Hans JW Spoelder, Michael Bloemendal, Rienk Van Grondelle, and Frans CA Groen. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Analytical biochemistry*, 191(1):110–118, 1990.
- [41] Narasimha Sreerama and Robert W Woody. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Analytical biochemistry*, 209(1):32–44, 1993.
- [42] Narasimha Sreerama, Sergei YU Venyaminov, and Robert W Woody. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein science*, 8(2):370–380, 1999.
- [43] Narasimha Sreerama and Robert W Woody. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of contin, selcon, and cdsstr methods with an expanded reference set. *Analytical biochemistry*, 287(2):252–260, 2000.
- [44] Mats H. M. Olsson, Christina R. Søndergaard, Maciej Rostkowski, and Jan H. Jensen. Propka3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pka predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2):525–537, 2011.

- [45] B. Krajewska. A combined temperature-ph study of urease kinetics. assigning pka values to ionizable groups of the active site involved in the catalytic reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 124:70–76, 2016.
- [46] Jason M. Teare, Anatoly N. Krutchinsky, and Brian T. Chait. The correct molecular weight of myoglobin, a common calibrant for mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(9):1361–1364, 2007.
- [47] Ruedi Aebersold and Matthias Mann. *Mass spectrometry-based proteomics*, volume 422. 2003.
- [48] Michael Karas and Franz Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20):2299–2301, 1988.
- [49] Sharon M Kelly, Thomas J Jess, and Nicholas C Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(2):119–139, 2005.
- [50] Thomas E Creighton. Disulphide bonds and protein stability. *BioEssays*, 8(2-3):57–63, 1988.
- [51] Alan Fersht. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Macmillan, 1999.
- [52] Ken A Dill. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31):7133–7155, 1990.
- [53] C Nick Pace, Hailong Fu, Katrina Lee Fryar, John Landua, Saul R Trevino, David Schell, Richard L Thurlkill, Satoshi Imura, J Martin Scholtz, Ketan Gajiwala, et al. Contribution of hydrogen bonds to protein stability. *Protein Science*, 23(5):652–661, 2014.
- [54] Akio Kato and Shuryo Nakai. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Protein structure*, 624(1):13–20, 1980.
- [55] Joseph R Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 2006.
- [56] Elena Ermakova, Olga Makshakova, Yuriy Zuev, and Igor Sedov. Beta-rich intermediates in denaturation of lysozyme: accelerated molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(24):13953–13964, 2022.
- [57] Vladimir N Uversky, Joel R Gillespie, and Anthony L Fink. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 41(3):415–427, 2000.

APÉNDICE A

Lisozima de clara de huevo

Este apéndice presenta los resultados y algunos análisis de la lisozima de clara de huevo que no se incorporaron en el cuerpo principal del documento.

A.1 Fluorescencia

En los resultados de fluorescencia de lisozima se discutieron los espectros a pH 7.0 y 10.0 para mostrar los cambios más relevantes; en este apartado se incluye el espectro registrado a pH 2.0, el cual no fue incorporado previamente debido a que mostró un comportamiento espectral muy similar al observado a pH 7.0.

Este resultado muestra que, bajo condiciones ácidas, la lisozima conserva características estructurales similares a las observadas a pH neutro, al menos desde el punto de vista del entorno del triptófano (principal contribuyente a la fluorescencia intrínseca).

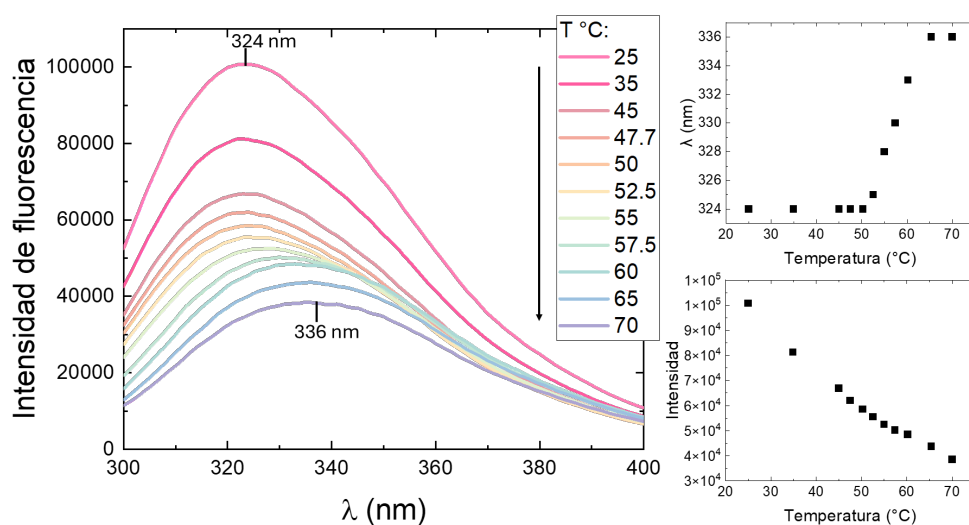


Figura A.1: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de lisozima a pH 2, excitando a 280nm. Las gráficas pequeñas ilustran de forma más clara el comportamiento espectral, conforme incrementa la temperatura.

A.2 Grupos protonables

A continuación se muestra una tabla con todos los residuos protonables de la proteína, incluyendo aquellos que no fueron listados en la Tabla 5.4, al no proporcionar información relevante para el análisis de este trabajo. Por ejemplo, los grupos del ácido aspártico (ASP) tienen un valor de pK_a menor a 5, lo que indica que en pH 7.0 y 10.0 se encuentran desprotonados. Por lo tanto, al modificar el pH del medio, no contribuyen al comportamiento ácido-base global de la proteína.

Los valores de ΔpK_a se determinaron aplicando la ecuación de Van't Hoff como se muestra en el Apéndice C.

Tabla A.1: Residuos protonables de lisozima de clara de huevo, obtenidos con el programa *Propka* [16] y sus valores de ΔpK_a (Apéndice C).

Residuo	pK_a	ΔpK_a (80 °C)	Residuo	pK_a	ΔpK_a (80 °C)
ASP 18A	3.09	-0.1637	LYS 13A	10.5	-1.4732
ASP 48A	1.55	-0.1637	LYS 33A	10.36	-1.4732
ASP 52A	4.09	-0.1637	LYS 96A	10.08	-1.4732
ASP 66A	0.66	-0.1637	LYS 97A	10.43	-1.4732
ASP 87A	2.11	-0.1637	LYS 116A	10.5	-1.4732
ASP 101A	3.94	-0.1637	ARG 5A	12.36	-1.3641
ASP 119A	3.8	-0.1637	ARG 14A	12.29	-1.3641
GLU 7A	2.18	-0.1637	ARG 21A	12.22	-1.3641
GLU 35A	4.57	-0.1637	ARG 45A	11.8	-1.3641
C- 129A	2.61	-0.1637	ARG 61A	11.8	-1.3641
HIS 15A	7.15	-0.8465	ARG 68A	11.94	-1.3641
TYR 20A	8.75	-0.6820	ARG 73A	12.29	-1.3641
TYR 23A	10	-0.6820	ARG 112A	12.5	-1.3641
TYR 53A	13.03	-0.6820	ARG 114A	12.01	-1.3641
N+ 1A	7.58	-1.1458	ARG 125A	12.22	-1.3641
LYS 1A	10.22	-1.4732	ARG 128A	12.5	-1.3641

A.3 Cálculo de la Carga neta promedio

Este apéndice también presenta la tabla de cálculo de la carga neta total de la lisozima a diferentes valores de pH a temperatura ambiente (25 °C) y a altas temperaturas (80 °C), como forma de comparar el cambio en la carga neta, al elevar la temperatura. Para ello, se utilizaron las ecuaciones de Henderson-Hasselbalch para estimar el grado de protonación o desprotonación de los residuos ionizables (Asp, Glu, His, Lys, Arg, Tyr, Cys, N-terminal y C-terminal), considerando los valores de pK_a determinados con *Propka* [16] para cada tipo de residuo.

El cálculo se realizó aplicando la siguiente ecuación para residuos ácidos (Asp y Glu) y también para los grupos de TYR y C-terminal, debido a que se consideran como ácidos débiles:

$$f^- = \frac{-1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (\text{A.1})$$

Y para residuos básicos (como Lys, Arg, His y N-terminal):

$$f^+ = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (\text{A.2})$$

El valor de carga de cada residuo se obtiene multiplicando la fracción cargada por su carga característica (−1 para ácidos, +1 para básicos). Posteriormente, la carga total se obtiene sumando las contribuciones individuales. Finalmente, la carga neta promedio se obtiene al dividir entre el número de aminoácidos presentes en la proteína, para el caso en particular de lisozima que contiene 129 aminoácidos.

Ejemplo de cálculo: Asp 18A a 80 °C

Para ilustrar el procedimiento, se muestra el cálculo de la fracción de carga para el residuo **Asp 18A** a **pH 7.0** y **80 °C**, utilizando su pK_a corregido por temperatura.

Datos:

- $pK_a^{25^\circ C} = 3.09$
- $\Delta pK_a(80^\circ C) = -0.16$

- $pK_a^{80^\circ C} = 3.09 - 0.16 = 2.93$

- pH del medio = 7.0

Para residuos ácidos como el aspartato (Asp), se calcula la fracción de carga negativa con:

$$f^- = \frac{-1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} = \frac{-1}{1 + 10^{(2.93 - 7.0)}} \approx -0.9999$$

Resultado: el Asp 18A se encuentra prácticamente **desprotonado** a pH 7.0 y 80 °C. Su contribución al cálculo de carga neta será aproximadamente de -1.0 .

Tabla A.2: Determinación de la carga neta promedio a temperatura ambiente y a alta temperatura en los diferentes pH.

Residuo	pK_a	$\Delta pK_a(80^\circ\text{C})$	$pK_a(80^\circ\text{C})$	Carga a 80 °C			Carga a 25 °C		
				pH 2	pH 7	pH 10	pH 2	pH 7	pH 10
ASP 18A	3.09	-0.16	2.93	-0.11	-1.00	-1.00	-0.08	-1.00	-1.00
ASP 48A	1.55	-0.16	1.39	-0.80	-1.00	-1.00	-0.74	-1.00	-1.00
ASP 52A	4.09	-0.16	3.93	-0.01	-1.00	-1.00	-0.01	-1.00	-1.00
ASP 66A	0.66	-0.16	0.50	-0.97	-1.00	-1.00	-0.96	-1.00	-1.00
ASP 87A	2.11	-0.16	1.95	-0.53	-1.00	-1.00	-0.44	-1.00	-1.00
ASP 101A	3.94	-0.16	3.78	-0.02	-1.00	-1.00	-0.01	-1.00	-1.00
ASP 119A	3.80	-0.16	3.64	-0.02	-1.00	-1.00	-0.02	-1.00	-1.00
GLU 7A	2.18	-0.16	2.02	-0.49	-1.00	-1.00	-0.40	-1.00	-1.00
GLU 35A	4.57	-0.16	4.41	0.00	-1.00	-1.00	0.00	-1.00	-1.00
C- 129A	2.61	-0.16	2.45	-0.26	-1.00	-1.00	-0.20	-1.00	-1.00
HIS 15A	7.15	-0.85	6.30	1.00	0.17	0.00	1.00	0.59	0.00
TYR 20A	8.75	-0.68	8.07	0.00	-0.08	-0.01	0.00	-0.02	-0.95
TYR 23A	10.00	-0.68	9.32	0.00	0.00	-0.17	0.00	0.00	-0.50
TYR 53A	13.03	-0.68	12.35	0.00	0.00	-1.00	0.00	0.00	0.00
N+ 1A	7.58	-1.15	6.43	1.00	0.21	0.00	1.00	0.79	0.00
LYS 1A	10.22	-1.47	8.75	1.00	0.98	0.05	1.00	1.00	0.62
LYS 13A	10.50	-1.47	9.03	1.00	0.99	0.10	1.00	1.00	0.76
LYS 33A	10.36	-1.47	8.89	1.00	0.99	0.07	1.00	1.00	0.70
LYS 96A	10.08	-1.47	8.61	1.00	0.98	0.04	1.00	1.00	0.55
LYS 97A	10.43	-1.47	8.96	1.00	0.99	0.08	1.00	1.00	0.73
LYS 116A	10.50	-1.47	9.03	1.00	0.99	0.10	1.00	1.00	0.76
ARG 5A	12.36	-1.36	11.00	1.00	1.00	0.91	1.00	1.00	1.00
ARG 14A	12.29	-1.36	10.93	1.00	1.00	0.89	1.00	1.00	0.99
ARG 21A	12.22	-1.36	10.86	1.00	1.00	0.88	1.00	1.00	0.99
ARG 45A	11.80	-1.36	10.44	1.00	1.00	0.73	1.00	1.00	0.98
ARG 61A	11.80	-1.36	10.44	1.00	1.00	0.73	1.00	1.00	0.98
ARG 68A	11.94	-1.36	10.58	1.00	1.00	0.79	1.00	1.00	0.99
ARG 73A	12.29	-1.36	10.93	1.00	1.00	0.89	1.00	1.00	0.99
ARG 112A	12.50	-1.36	11.14	1.00	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00
ARG 114A	12.01	-1.36	10.65	1.00	1.00	0.82	1.00	1.00	0.99
ARG 125A	12.22	-1.36	10.86	1.00	1.00	0.88	1.00	1.00	0.99
ARG 128A	12.50	-1.36	11.14	1.00	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00
carga total				15.78	7.22	-1.36	16.16	8.36	3.59
carga neta promedio				0.12	0.06	-0.01	0.13	0.06	0.03

Mioglobina de equino y su apoproteína

En este apéndice se anexan los grupos protonables y espectros de fluorescencia, correspondientes a mioglobina y apomioglobina registrados a distintas temperaturas. Estas figuras no se incluyeron en el cuerpo principal de la tesis, debido a la alta similitud espectral observada en otros valores de pH. No obstante, se consideran relevantes para apoyar los análisis comparativos realizados a lo largo del estudio. Además, en este apartado se incluyen las imágenes sobre las interacciones intramoleculares de la mioglobina.

B.1 Fluorescencia en mioglobina

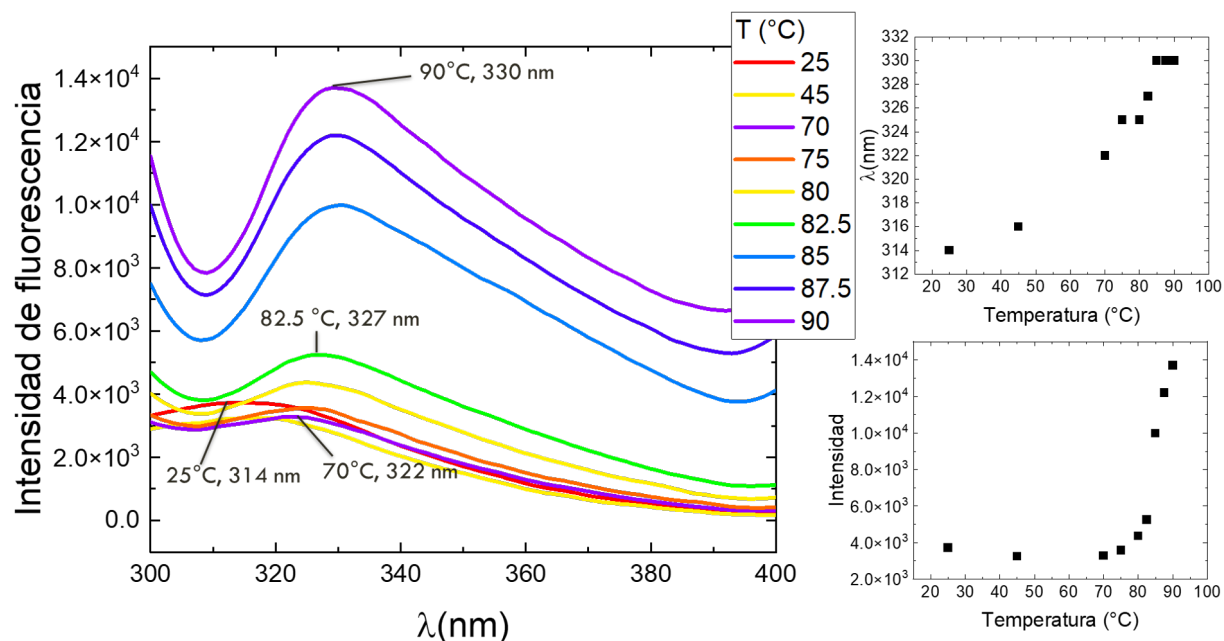


Figura B.1: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de mioglobina a pH 5, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.

B.2 Grupos protonables mioglobina

Tabla B.1: Residuos protonables de mioglobina, obtenidos con el programa *Propka* [16] (estos residuos tambien aplican para su apoproteína, ya que tienen la misma secuencia de aminoácidos) y sus valores de ΔpK_a (Apéndice C).

Residuo	pK_a	$\Delta pK_a(80^\circ\text{C})$	Residuo	pK_a	$\Delta pK_a(80^\circ\text{C})$
ASP 4A	3.7	-0.1637	HIS 113A	6.22	-0.8457
ASP 20A	3.19	-0.1637	HIS 116A	6.5	-0.8457
ASP 44A	3.07	-0.1637	HIS 119A	6.36	-0.8457
ASP 60A	3.87	-0.1637	TYR 103A	11.61	-0.6820
ASP 109A	3.8	-0.1637	TYR 146A	10	-0.6820
ASP 122A	2.89	-0.1637	N+ 16A	8	-1.1458
ASP 126A	3.53	-0.1637	LYS 42A	10.5	-1.4732
ASP 141A	3	-0.1637	LYS 45A	10.22	-1.4732
GLU 6A	2.38	-0.1637	LYS 47A	9.66	-1.1458
GLU 18A	3.48	-0.1637	LYS 47A	10.5	-1.4732
GLU 27A	3.7	-0.1637	LYS 50A	10.43	-1.4732
GLU 38A	3.78	-0.1637	LYS 50A	10.08	-1.4732
GLU 41A	4.78	-0.1637	LYS 56A	10.15	-1.4732
GLU 52A	4.64	-0.1637	LYS 62A	10.43	-1.4732
GLU 54A	3.52	-0.1637	LYS 63A	10.43	-1.4732
GLU 59A	4.44	-0.1637	LYS 77A	10.29	-1.4732
GLU 83A	3.7	-0.1637	LYS 77A	10.29	-1.4732
GLU 85A	4.25	-0.1637	LYS 78A	10.5	-1.4732
GLU 105A	3.76	-0.1637	LYS 79A	10.5	-1.4732
GLU 136A	4.43	-0.1637	LYS 87A	10.5	-1.4732
GLU 148A	4.5	-0.1637	LYS 96A	10.5	-1.4732
HIS 24A	7.08	-0.8457	LYS 98A	10.5	-1.4732
HIS 36A	6.36	-0.8457	LYS 102A	10.5	-1.4732
HIS 48A	7.02	-0.8457	LYS 118A	10.22	-1.4732
HIS 64A	6.43	-0.8457	LYS 133A	10.01	-1.4732
HIS 81A	6.5	-0.8457	LYS 145A	10.5	-1.4732
HIS 82A	7.3	-0.8457	LYS 147A	10.5	-1.4732
HIS 93A	6.5	-0.8457	ARG 31A	12.5	-1.4732
HIS 97A	6.5	-0.8457	ARG 139A	12.5	-1.4732

B.3 Fluorescencia en apomioglobina

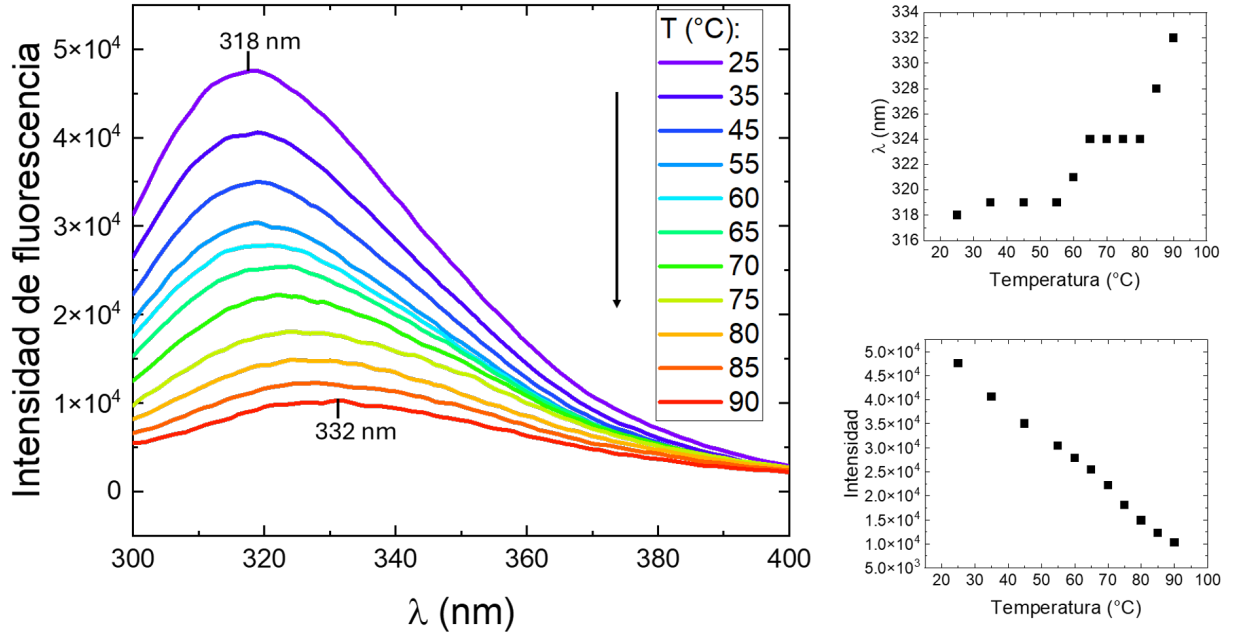


Figura B.2: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de apomioglobina a pH 5, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.

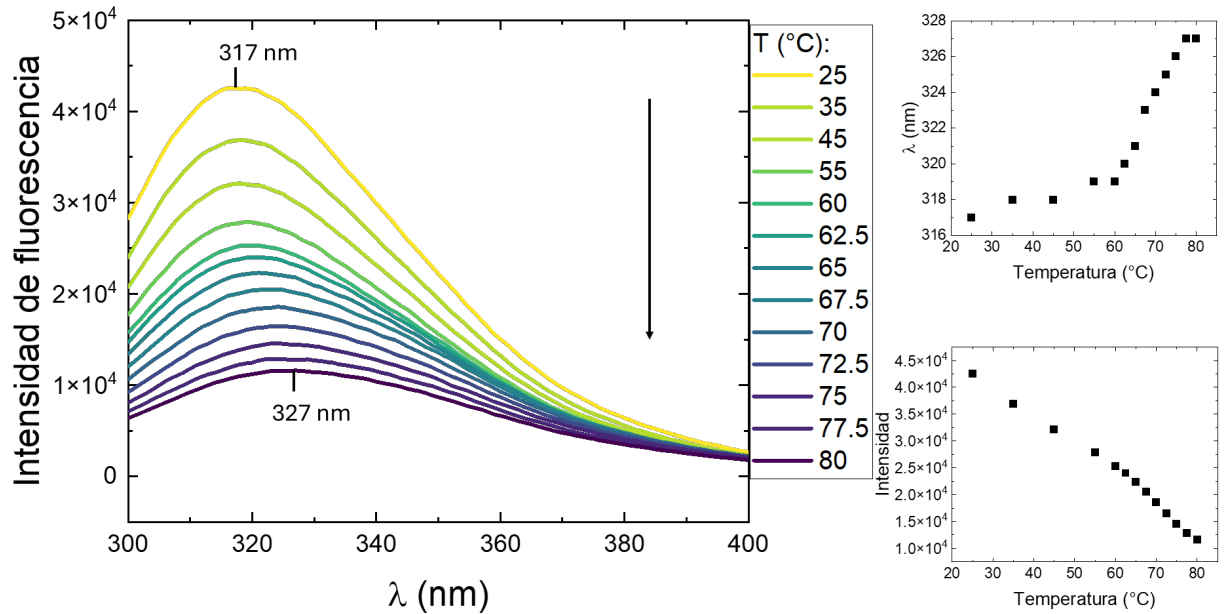


Figura B.3: Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a diferentes temperaturas de apomioglobina a pH 7, excitando a 280 nm. Las gráficas pequeñas a la derecha ilustran de forma más clara el comportamiento del corrimiento espectral, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia conforme incrementa la temperatura.

APÉNDICE C

Cálculo de ΔpK_a con temperatura mediante la ecuación de Van't Hoff

El equilibrio ácido-base de un grupo ionizable en una proteína puede describirse mediante su constante de disociación K_a , la cual está relacionada con el pK_a por la ecuación:

$$pK_a = -\log_{10} K_a \quad (\text{C.1})$$

La dependencia de K_a con la temperatura se puede describir usando la ecuación de Van't Hoff:

$$\frac{d \ln K_a}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad (\text{C.2})$$

Donde:

- R es la constante de los gases: 8.314 J/mol·K,
- T es la temperatura absoluta en Kelvin.
- ΔH° es la entalpía estándar del proceso de ionización (en J/mol),

Integrando esta ecuación entre dos temperaturas, T_1 y T_2 , se obtiene:

$$\ln \left(\frac{K_{a2}}{K_{a1}} \right) = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (\text{C.3})$$

Multiplicando ambos lados por -1 y usando la relación entre pK_a y K_a :

$$\Delta pK_a = pK_{a2} - pK_{a1} = -\log_{10} \left(\frac{K_{a2}}{K_{a1}} \right) \quad (\text{C.4})$$

$$\Delta pK_a = \frac{-\Delta H^\circ}{2.303R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (\text{C.5})$$

Esta es la forma final de la ecuación de Van't Hoff para estimar el cambio de pK_a en función de la temperatura.

Ejemplo:

Para el residuo **His 15A**, cuya entalpía estándar de ionización reportada como $\Delta H^\circ = 31000$ J/mol [45] (ver A), se desea estimar el cambio en su pK_a al aumentar la temperatura de $T_1 = 298$ K (25°C) a $T_2 = 353$ K (80°C). Sustituyendo en la ecuación:

$$\Delta pK_a = \frac{-31000}{2.303 \cdot 8.314} \left(\frac{1}{353} - \frac{1}{298} \right) = 0.8457 \quad (\text{C.6})$$

Este resultado indica que el pK_a disminuye aproximadamente 0.85 unidades en His 15A, lo que indica que el residuo tiende a desprotonarse más fácilmente a temperaturas elevadas.

Entalpías estándar de ionización de residuos protonables utilizadas en el cálculo de ΔpK_a

Este anexo presenta los valores de entalpía estándar (ΔH°) asociados a la ionización de residuos aminoácidos protonables, los cuales fueron utilizados para estimar los cambios en los valores de pK_a en función de la temperatura mediante la ecuación de Van't Hoff. Dichos valores fueron tomados del estudio de (Krajewska (2006)) [45].

Grupo	pK_a	ΔH° (KJ/mol)
α Carboxilo (al final de la cadena polipeptídica)	3.0-3.2	± 6
β - o γ -Carboxilo (de ácido aspártico o glutámico)	3.0-5.0	± 6
Imidazol (de histidina)	5.5-7.0	28-31
α -Amino (al final de la cadena polipeptídica)	7.5-8.5	42-54
ϵ -Amino (de lisina)	9.5-10.6	42-54
Sulfhidrilo (de cisteína)	8.0-8.5	27-29
OH fenólico (de tirosina)	9.8-10.5	25
Guanidinio (de arginina)	11.6-12.6	50-54



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00133

Matrícula: 2221801129

Estructuras de proteínas
desnaturalizadas
termicamente.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 13 del mes de agosto del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA
DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA
DR. LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (QUÍMICA)

DE: BRENDA ESTHER REYES SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



BRENDA ESTHER REYES SANCHEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

VOCAL

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ
CARDOZA

SECRETARIO

DR. LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA