

FORMACIÓN DE PATRONES DE PELÍCULAS DE BIO-PELÍCULAS: EVIDENCIA DEL PLEGAMIENTO Y DESPLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

M.L Gómez López, J. González-Gutiérrez, Y. J. P. Carreón Herrera
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

Resumen

El estudio de patrones formados a partir de la evaporación de gotas de bio-fluidos ha permitido desarrollar estrategias para el diagnóstico de desórdenes en la salud y patologías. Presentamos un estudio experimental sobre la textura de depósitos de proteínas. Encontramos que las proteínas nativas generan depósitos con cristales ramificados, mientras que las proteínas en estado desplegado inducen la formación de agregados en el centro del depósito. Sobre la base del perfil de densidad radial de masa, se revela una transición morfológica entre los diferentes conjuntos de depósitos producidos a diferente concentración relativa de proteínas en estados plegado y desplegado. Esto permite definir, para diferentes concentraciones de NaCl, el intervalo de concentraciones relativas de proteínas que permite la formación de depósitos con la habilidad de develar la presencia de proteínas desplegadas. Interesantemente, este intervalo de concentraciones incrementa a bajas concentraciones de NaCl. Finalmente, discutimos el uso potencial de los depósitos de gotas secas como una herramienta capaz de revelar cambios conformacionales en proteínas

Introducción

Los depósitos de gotas secas se encuentran ubicuos en muchas áreas del conocimiento humano. En el área de la salud, las características estructurales de los depósitos permiten detectar enfermedades como hepatitis viral, la malaria, adenovirus, el parto prematuro, entre muchos otros padecimientos(1,2,3). La formación de depósitos a partir de la evaporación de gotas depende de complejos mecanismos de transporte de masa resultado de la competencia entre flujos Capilares y los flujos de Marangoni. Ambos dependen estrechamente de la temperatura del sustrato, la humedad relativa, concentración de sales, tamaño de gota y los componentes de la solución.

Se ha mostrado que un buen punto de partida para comprender los mecanismos de transporte y los procesos de agregación dentro de una gota de un bio-fluido de relevancia es el estudio de soluciones de proteínas. Por ejemplo, Yojana J.P. Carreón et al. (2017) (4) estudiaron los patrones reminiscentes de gotas que contienen BSA y lisozima (dos tipos de proteínas). Encontraron que emergen patrones específicos capaces de revelar la presencia de una proteína. Más aun, las sales que están ubicuas en los biofluidos, al interactuar con proteínas generan estructuras complejas tales como: agregados amorfos, formaciones dendríticas, formaciones en forma de rosetas, entre otras (5). Estas características morfológicas sirven como biomarcadores e impulsan el potencial uso de las características estructurales de los patrones para el diagnóstico de desórdenes en la salud.

Objetivo

Probar que la formación de patrones de gotas secas pueden detectar la presencia proteína en estado desplegado

Metodología

Se usó polvo de albúmina de suero bovino (BSA) y cloruro de sodio (NaCl) para preparar soluciones concentradas de BSA y NaCl. Estas soluciones concentradas al 2.00 wt % se diluyeron en agua DI en cantidades variables para crear las concentraciones: BSA ($\phi = 1\text{wt} \%$) y NaCl ($\phi = 0.1, 0.5$ y $1 \text{ wt} \%$). La solución de BSA desplegada se obtiene de la solución de BSA Nativa. Esta última se somete a un baño maría a 90°C durante 10 min. Producimos patrones a partir de la evaporación de gotas con diferente concentración de proteína en estado nativo y desnaturalizado, para tres diferentes concentraciones de NaCl (0.1, 0.5 y 1% wt).

Las soluciones se mezclaron de acuerdo a las concentraciones relativas deseadas ($\phi_r = 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 25:75, 0:100$).

Las gotas de las soluciones se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio limpio, dentro de una caja petri, usando una micropipeta. Las gotas se evaporaron en condiciones ambientales controladas

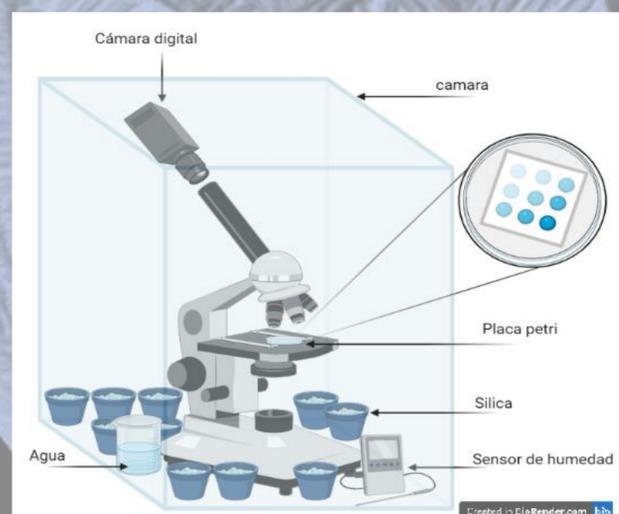


Fig.1 Representación Esquemática del arreglo Experimental

Utilizamos el perfil de densidad radial $I(r)$ para realizar el análisis estructural de los patrones. Para los objetos 2D, esta cantidad es dada por la siguiente expresión:

$$I(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} i(r, \theta) d\theta$$

Resultados

Encontramos que es posible diferenciar significativamente, entre el grupo de depósitos con proteínas en estado nativo y depósitos en estado desnaturalizado, con una concentración de NaCl al 0.1 wt%

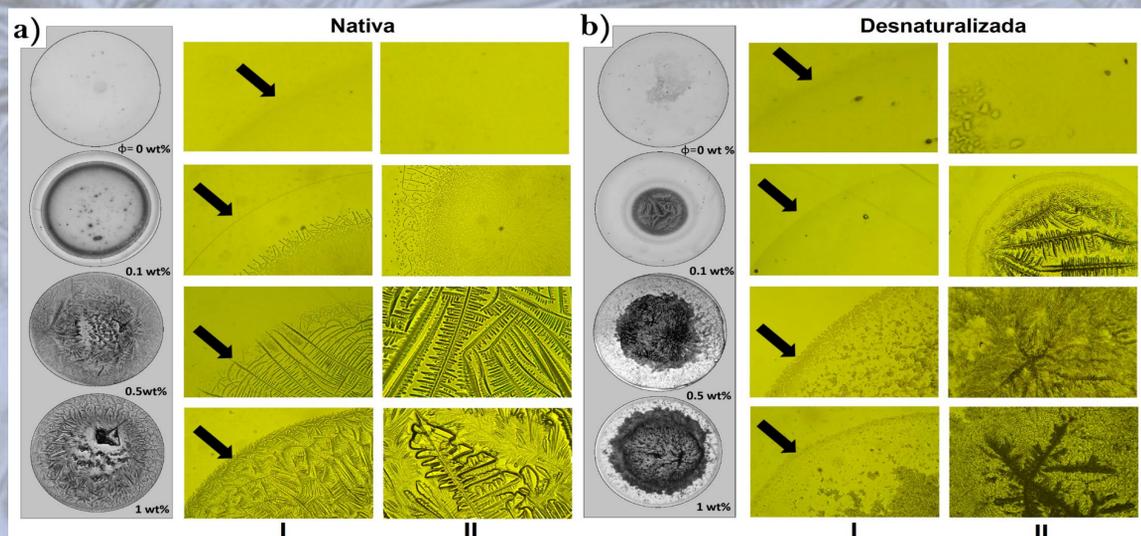


Fig. 2 Depósitos formados durante la evaporación de gotas conteniendo BSA, a diferentes concentraciones de NaCl ($\phi=0-1\text{wt} \%$). En (I) se aprecia un acercamiento de la orilla del depósito y en (II) se observa un acercamiento de la parte central de los depósitos.

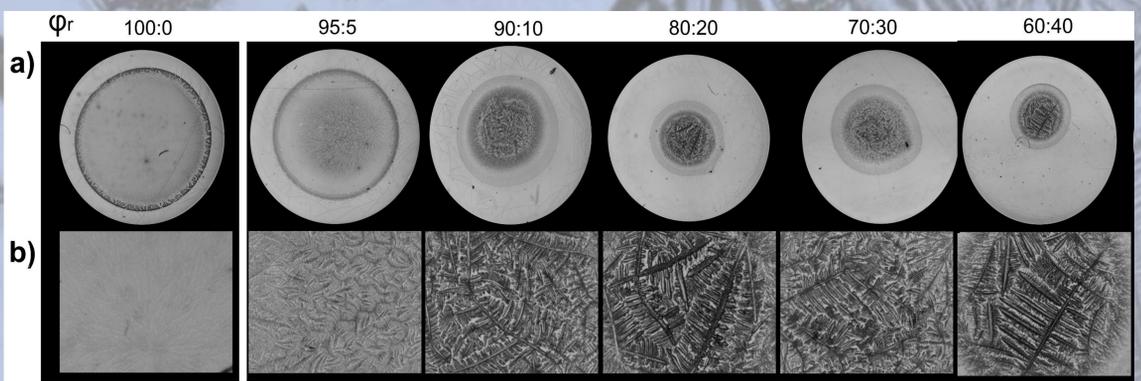


Fig. 3 Depósitos con diferentes concentraciones relativas de BSA nativa y desnaturalizada.

Demostramos que es posible lograr una precisión del 100 % en la identificación de proteínas desplegadas con una concentración relativa del 5 %. El patrón de ojo es la característica más distintiva de proteínas desplegadas.

El perfil de densidad radial nos permite distinguir entre los dos grupos de depósitos.

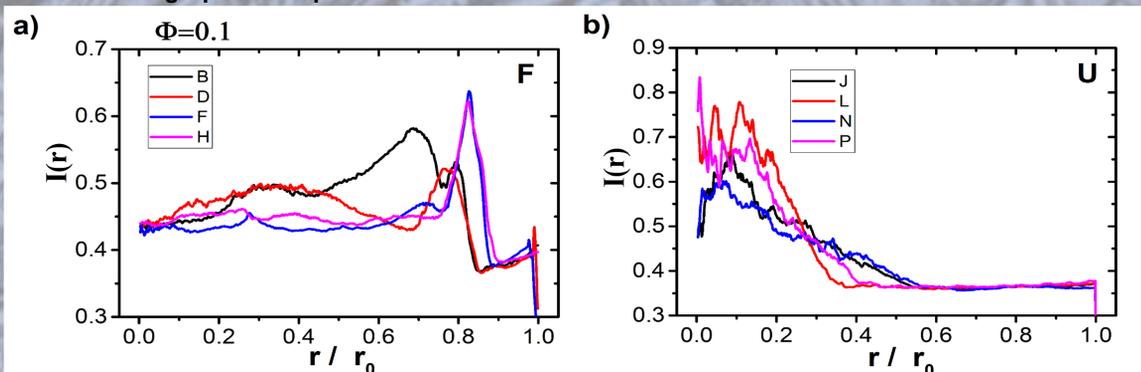


Fig. 4 Perfil radial de depósitos con $\phi=0.1\text{wt} \%$

Conclusiones

Se ha mostrado que a través del análisis estructural de gotas secas de proteínas con bajas concentraciones de NaCl (0.1 wt) es posible evidenciar el plegamiento irreversible de proteínas. Ventajas de nuestro método: 1) Las pruebas de identificación se pueden implementar fácilmente en laboratorios básicos donde se dispone de un microscopio óptico y cualquier placa térmica. 2) La implementación del método no requiere personal altamente capacitado. 3) El análisis de textura no es computacionalmente costoso.

Referencias

- Ayantika Sett, et al. Rapid estimation of the β -sheet content of human serum albumin from the drying patterns of hsa-nanoparticle droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 540:177– 185, 2018.
- Joshua R Trantum, et al. Biomarker-mediated disruption of coffee-ring formation as a low resource diagnostic indicator. *Langmuir*, 28(4):2187–2193, 2012.
- Cheng Zhi Huang, et al. Microscopic determination of t_e x0002_ tetracycline based on aluminum-sensitized fluorescence of a self-ordered ring formed by a sessile droplet on glass slide support. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 34(1):103–114, 2004.
- Carreón, Yojana JP, et al. "Patterns produced by dried droplets of protein binary mixtures suspended in water." *Colloids and Surfaces B: Bio interfaces* 161 103-110. (2018)
- Carreón, Y.J.P., Ríos-Ramírez, M., Moctezuma, R.E. et al. Texture analysis of protein deposits produced by droplet evaporation. *Sci Rep* 8, 9580 (2018)