



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**DESARROLLO DE NUEVOS BIOSENSORES FLUORESCENTES DE
CALMODULINA (CaM.ALEXA FLUOR)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

David Escobedo Ríos



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARCO ANTONIO ORTIZ JIMENEZ

VOCAL: JOSE PEDRAZA CHAVERRI

SECRETARIO: MARTIN GONZALEZ ANDRADE

1er. SUPLENTE: NORMA ANGELICA CAMACHO DE LA ROSA

2° SUPLENTE: TZVENTANKA DIMITROVA DINKOVA

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

MARTIN GONZALEZ ANDRADE

SUSTENTANTE:

DAVID ESCOBEDO RIOS

Contenido

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Sensores y biosensores	5
2.2. Biosensores fluorescentes.....	7
2.3. Principios básicos de fluorescencia.....	10
2.4. Biotecnología aplicada a las biomoléculas	19
2.5. Calmodulina.....	22
3. OBJETIVO GENERAL	26
4. OBJETIVOS PARTICULARES	26
5. METODOLOGÍA	26
5.1. Optimización Geométrica de las estructuras <i>in silico</i>	26
5.2. Expresión y purificación de CaM L39C-V91 y CaM M124C	27
5.3. Modificación química con los fluoróforos Alexa350, Alexa -488 y Alexa-532 de las cisteínas reactivas de las proteínas mutantes de CaM L39C-V91 y CaM M124C.	28
5.4. Determinación de la concentración de proteína	28
5.5. Monitoreo por geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	29
5.6. Bioensayo de unión a la CaM utilizando como inhibidor clásico a la clorpromazina (CPZ)	29
5.7. Rendimiento cuántico	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1. Identificación de la construcción de las mutantes de CaM 39-91 y 124	31
6.2. Purificación de las mutantes CaM M124C y CaM L39C/V91C.....	32
6.3. Modificación química con los fluoróforos alexas.....	35
6.4. Ensayos de unión del inhibidor clásico CPZ y rendimiento cuántico ϕ	35
7. CONCLUSIONES	41
8. Referencias.....	42

1. RESUMEN

Los biosensores son sistemas que presentan un mecanismo híbrido, que transforman la información de las interacciones químicas en señales analizables por medio de mecanismos bioquímicos. Estos sistemas están constituidos por un sistema receptor que generalmente es un componente biológico (proteínas, canales iónicos, células, etc.) que interacciona específicamente con un analito y transduce la señal a un sistema detector, siendo este último de tipo espectroscópico, eléctrico, mecánico, etc. La importancia de estos sistemas ha ido en aumento, ya que son herramientas de diagnóstico, de análisis y de investigación en las ciencias de la salud, en la industria alimentaria y farmacéutica.

El uso de proteínas como el componente biológico de los biosensores, proporciona una alta especificidad en las reacciones. La proteína calmodulina (CaM) participa en un número importante de eventos biológicos, relacionados con el mecanismo de acción de diferentes grupos de fármacos.

El objetivo del presente trabajo consiste en el desarrollo de nuevos biosensores de CaM con diferentes propiedades espectroscópicas, utilizando la gama de fluoróforos Alexa Fluor® maleimida con rangos de emisión de fluorescencia desde 350 a 532 nm; para contar con biosensores más robustos y muestrear mayor diversidad de moléculas bioactivas de la CaM sin interferencias espectroscópicas.

De manera general, esta investigación incluye: a) la obtención del gen correspondiente; b) la construcción de un sistema de sobreexpresión mediante el empleo de diversas técnicas de biología molecular (clonación, subclonación, etc.) y c) la modificación química con grupos reporteros (fluoróforos). Los biosensores CaM-Alexa Fluor®, se desarrollaron utilizando herramientas de biología molecular y modificaciones químicas con los fluoróforos Alexa 350, 448 y 532 en diferentes posiciones de la CaM, una doble mutante en las posiciones 39 y 91 (CaM L39C-V91C); y otra en la posición 124 (CaM M124C). Los seis biosensores presentaron una alta eficiencia cuántica, mantienen sus propiedades bioactivas y responden de manera correcta al inhibidor clásico de la CaM, cambian la intensidad fluorescente al unírsele la clorpromazina.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Sensores y biosensores

El estudio de la química analítica está enfocado en la caracterización química de un material mediante el análisis cualitativo y cuantitativo, esta ciencia se encarga de proporcionar los métodos y las herramientas necesarias para la obtención de resultados exactos, precisos y sensibles[1].

Para el análisis químico cualitativo lo importante es definir qué especies químicas hay en cada muestra, mientras que la química analítica cuantitativa se encarga del análisis en cantidad y estructura de una muestra, ya sea natural o sintética. Las herramientas utilizadas en el análisis cuantitativo describen características físicas y químicas del o los compuestos a analizar, que a menudo son sistemas complejos (biomédico, industrial o ambiental), por lo que se requiere de instrumentos de medición con alto grado de reconocimiento para el analito de interés. Estos instrumentos deben contar con la capacidad para traducir diversas interacciones a una señal física medible; por ello se desarrollaron los sensores[2].

Un sensor es una herramienta analítica que está conformada principalmente por dos unidades, una receptora o de reconocimiento molecular y la otra transductora de la señal [2]. El reconocimiento del analito genera una señal “primaria”, la cual puede ser de carácter fisicoquímico, óptico, másico, térmico, etc. Esta señal será transmitida al elemento transductor, que transformará la señal primaria en una señal secundaria que podrá ser cuantificable.

Los sensores pueden ser de varios tipos dependiendo de su funcionamiento, del tipo de señal que proporcionan, de los elementos utilizados para su fabricación o de la naturaleza de su función. En esta última clasificación encontramos los sensores magnéticos, térmicos, químicos, barométricos, fotoeléctricos, de movimiento, de humedad, etc [3].

Los sensores químicos son de importancia en el ámbito de la química, la industria alimentaria y la industria farmacéutica; ya que pueden monitorear una o más variables en un sistema complejo. Este tipo de sensores cuentan con la capacidad de censar, un analito o un conjunto de analitos de interés. Por ejemplo, en los fermentadores cuentan con sensores de pH, de ácidos orgánicos provenientes del metabolismo y sensores de oxígeno, los cuales se utilizan para mantener las condiciones óptimas para la fermentación.

Un inconveniente de los sensores químicos es la selectividad, debido a que muchos de ellos no reconocen a nivel molecular ciertas estructuras y están limitados sólo a una reacción específica (oxidaciones, reducciones, etc.) [4]. Este

reconocimiento molecular se lleva a cabo en los sistemas biológicos para la comunicación celular, responsable del metabolismo, protección y organización de diferentes organismos; todo ello mediante interacciones entre enzimas y ligandos (sustratos, inhibidores, anticuerpos o, proteínas receptoras). Lo anterior ha dado lugar a diferentes sistemas de biosensores, algunos ya comerciales como biosensores enzimáticos, inmunosensores y genosensores [2].

Por otro lado, los biosensores son dispositivos analíticos conformados de un componente receptor y un componente transductor, el componente receptor es una molécula biológica capaz de interactuar de forma sensible y específica con un analito [5].

Los biosensores se pueden clasificar de distintas formas, un ejemplo de esta clasificación es la siguiente [6],:

- A) Naturaleza del parámetro que se desea medir: (biosensor químico o bioquímico).
- B) Intervención en el proceso bioquímico.
- C) Firma de inmovilización y especie inmovilizada: transitoria (muestra, producto de la reacción) o permanente (reactivo, catalizador).
- D) Tipo de transductor: óptico, eléctrico, térmico, acústico, etc.
- E) Funcionamiento: reversible o irreversible (desechable).
- F) Forma externa: tipo sonda, o de flujo.
- G) Modo de operación continuo o discontinuo.

El uso de biosensores tiene como ventajas la lectura rápida de los analitos en la muestra a analizar, la miniaturización de dispositivos y la automatización de los procesos de análisis de laboratorio reduciendo en muchos de los casos los costos y los errores debidos a la intervención humana [4]. Otras ventajas de los biosensores son [2]:

- A) Mecanismo de acción bien caracterizado.
- B) Mecanismo catalítico rápido y sensible, amplificador de la señal.
- C) Posibilidad de integración a distintos modos de transducción.
- D) Posibilidad de transducción directa y continua.
- E) Disponibilidad de materiales enzimáticos de distinta clase, origen, actividad y estabilidad.
- F) Posibilidad de determinar grupos de sustancias mediante enzimas selectivas a dichos compuestos o mediante la inhibición enzimática, que producen determinados fármacos, sobre algunas enzimas.
- G) Procedimientos de inmovilización bien establecidos.
- H) Reutilizables.
- I) Precio moderado.

J) Producción masiva.

Una de las desventajas de los biosensores es la inestabilidad de las enzimas, ya que muchas de ellas se desnaturalizan a temperaturas elevadas, a cambios de pH o a *buffers* que contengan metales pesados que interfieran con su actividad, por ello se han desarrollado enzimas termoresistentes o biosensores desechables [7].

Los biosensores se han utilizado ampliamente en muchas industrias, como la alimentaria para medir carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y compuestos policíclicos, entre otros. En la detección de organismos patógenos en la industria agropecuaria, así como de organofosfatos y carbamatos en los pesticidas [8]. En la clínica, uno de los biosensores más utilizados son los medidores de glucosa (glucómetros), en tanto que en la industria farmacéutica, los biosensores se utilizan en procesos de selección (*Screening*) de posibles fármacos cuyo diseño está basado en química combinatoria y mediante la utilización del método *high throughput screening*, que utiliza una proteína como blanco molecular para que funcione como un biosensor de respuesta binaria de forma rápida y con un procesamiento mínimo de muestra, todo esto para seleccionar entre cientos o miles de posibles fármacos [4].

2.2 Biosensores fluorescentes

Entre los biosensores más utilizados están los electroquímicos, los cuales miden diferencias de potencial que son resultado de reacciones químicas, por ejemplo: el biosensor de glucosa, que es el más utilizado y fue desarrollado en 1962 por Lelad C. Clark. El segundo tipo de biosensores más utilizados son los ópticos, su importancia en el mercado es gracias al uso de fibras ópticas, eficiencia y miniaturización de láseres, estos biosensores pueden medir la difracción en la trayectoria de la luz o la intensidad de un espectro ya conocido [4].

La emisión fluorescente es muy utilizada en biosensores ópticos. Un marcador fluorescente es enlazado con el analito y la presencia de esta se detecta con una medida de fluorescencia [5]. La fluorescencia y la luminiscencia son procesos de emisión con importancia analítica, basados en la excitación de electrones por absorción de radiación electromagnética.

Las técnicas analíticas basadas en la detección de fluorescencia son muy populares debido a su alta sensibilidad y selectividad, junto con las ventajas de la resolución espacial y temporal, además de que pueden detectar de manera remota mediante la utilización de fibras ópticas. Cuando un analito es fluorescente, la detección fluorométrica directa es posible por medio de un espectrofluorómetro

que opera a base de la excitación y de la emisión a longitudes de onda apropiadas, es el caso para los hidrocarburos aromáticos (en los aceites crudos), proteínas (en el suero de la sangre, en la leche de vaca, etc), algunos medicamentos (morfina), clorofilas, etc.

Para los casos en que se trabaja con iones y moléculas que no son fluorescentes, se utilizan métodos indirectos como los que se mencionan a continuación:

- La derivatización: es la reacción del analito con un reactivo que conduce a un compuesto fluorescente. Se utiliza a menudo acoplado con cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia. Este método se utiliza actualmente en la bioquímica y en la química clínica.
- Formación de un complejo fluorescente, es la base de la mayoría de los métodos de iones y el reconocimiento molecular.
- Extinción de la fluorescencia: sucede cuando colisiona el analito con un compuesto fluorescente; a esta reacción se le conoce como enfriamiento colisional "*collisional quenching*". Este método es especialmente adecuado para la detección de gases como el oxígeno cuando está disuelto en agua o sangre; sulfatos ácido sulfurico, amoníaco, ácido clorhidrico, cloro, clorocarbonos, etc.
- Inmunoensayo de fluorescencia: Usando anticuerpos monoclonales conjugados con sondas fluorescentes, para poder detectar proteínas en cortes de tejido, detección de fármacos o de diversas sustancias biológicas de interés.

La espectroscopia de fluorescencia es muy usada en el área analítica y de investigación [9, 10]. Cuando se seleccionan adecuadamente el fluoróforo adecuado y la condición experimental, se puede llevar la sensibilidad absoluta a nivel de moléculas individuales; esto es suficiente y muy atractivo para muchas de las aplicaciones. Algunas características que posee la fluorescencia son: su velocidad de respuesta, la cual es de 10^{-8} a 10^{-10} segundos su alta resolución espacial. Adicionalmente, es un método no invasivo ni destructivo [11].

Las moléculas que tienen propiedades fluorescentes se les llaman fluoróforos, estos son moléculas que tienen un espectro de emisión y de absorción bien definidos y por lo general son compuestos de carbono poliaromáticos o con heterociclos. Según su estructura se pueden clasificar en [12]:

- Fluoróforos de estructura molecular pequeña: son estructuras químicas orgánicas de 300 a 2000 Da, de alta eficiencia cuántica y no contienen carga. Son utilizados para aplicaciones clínicas. Las condiciones como pH

ácido y la presencia de otras especies reactivas de oxígeno pueden influir en el rendimiento de estos fluoróforos.

- Nanocristales fluorescentes: Los *Quantum Dots* (Qdot), se caracterizan por una amplia gama de longitudes de onda de excitación, un pico de emisión estrecho, la resistencia al foto-blanqueo y una alta eficiencia cuántica (θ). Muchos de estos nanocristales se han conjugado con proteínas o péptidos, de tal forma que el nanocristal tiene una autofluorescencia, puede transferir y excitar a la proteína o péptido para que éste a su vez emita a otra longitud de onda. Esto se conoce como transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET). Una limitante de los nanocristales fluorescentes, para su aplicación *in vivo*, es que muchos de ellos contienen metales pesados como el plomo, además de que su tamaño es mayor que el límite para que sean excretados por depuración renal.
- Fluoróforos genéticamente codificados: son proteínas que provienen de una amplia gama de seres vivos que se encuentran en la naturaleza, algunas de ellas son alteradas genéticamente para obtener longitudes de onda que no se encuentran en la naturaleza y son transfectadas a una célula para su expresión. Las proteínas de fusión se han utilizado para rastrear el destino de proteínas específicas *in vivo*, algunas nuevas proteínas se han obtenido de forma que son excitables bajo condiciones muy específicas de manera que la fluorescencia sólo se observa en circunstancias biológicas precisas, por ejemplo durante la expresión de un gen particular. Una limitante de dichas proteínas, es su tamaño relativamente grande (30-50 kDa) que limita el *uso in vivo* de estos sistemas. Sin embargo se han utilizado para ensayos *in vitro* como biosensores.

Los fluoróforos también se pueden dividir en dos clasificaciones, los fluoróforos intrínsecos y extrínsecos [13]. Los primeros son las estructuras químicas con propiedades fluorescentes que se pueden encontrar en la naturaleza, el ejemplo más citado es el del grupo indol del aminoácido triptófano. También es posible encontrar otras moléculas como NADH, flavinas y derivados del piridoxal y clorofila [14].

Por otra parte, los fluoróforos extrínsecos son compuestos químicos que se añaden a una muestra carente de fluorescencia o para poder modificar sus propiedades espectrales. Una ventaja de estas sondas fluorescentes, es que permiten identificar exactamente en qué zona de la molécula se encuentra el fluoróforo; hay varios ejemplos de sondas unidas a moléculas, como es el caso de

los tensoactivos, las cadenas de polímero, fosfolípidos, proteínas, polinucleótidos, etc [10].

2.3 Principios básicos de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno de emisión de energía (fotones), para que esto ocurra, la molécula pasa por tres etapas (**Figura 1**). La primera corresponde a la excitación, en esta etapa un pequeño número de electrones son irradiados en una molécula por alguna fuente de energía, pasan de un estado de energía basal de singulete S_0 a un singulete excitado S_1 , donde un electrón cuenta con un nivel energético más alto. En algunos casos ocurre que el electrón llega a un estado triple excitado T_1 (**Figura 1**). La siguiente etapa es la de transición, en la cual la energía del electrón es parcialmente disipada de distintas formas, mediante la interacción con otras moléculas o al medio que las rodea. Por último, la etapa de emisión es donde los electrones regresan a un estado de S_0 por un proceso de “relajación”, que puede ser observado mediante fenómenos como la fluorescencia o la luminiscencia [15].

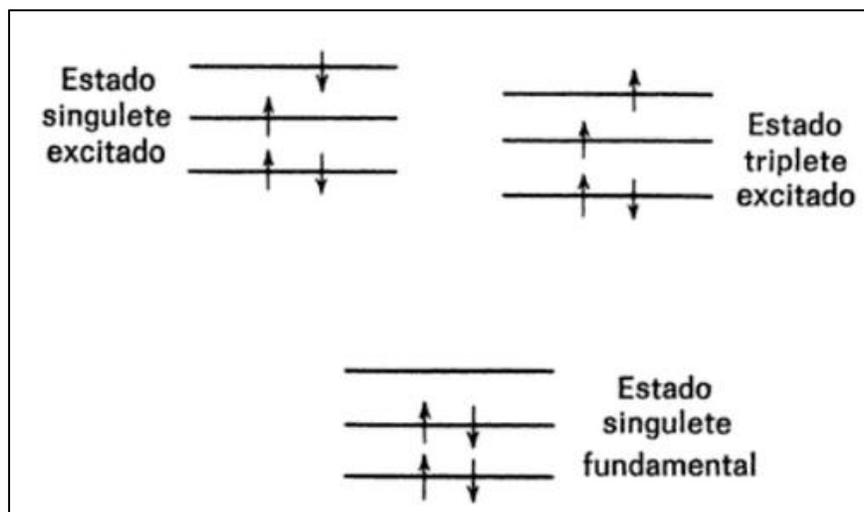


Figura 1. Fenómeno de fluorescencia. En esta representación, cada línea muestra un orbital después de la absorción de energía, y un electrón excita al siguiente orbital desocupado. Tal como se muestra esto puede ocurrir de dos maneras[15].

Para que la molécula pase del estado fundamental (S_0) al estado excitado (S_n) puede haber una absorción de luz (fotones) por parte de una molécula, o por medio de un proceso llamado sensibilización, en el cual una molécula transfiere energía a otra. Para que esto ocurra, la molécula donadora debe tener una energía mayor de excitación que la molécula aceptora. Cuando las dos moléculas

son fluoróforos, este tipo de transferencia de energía se le conoce como FRET por sus siglas en inglés (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) o Transferencia de energía de resonancia de Förster, aunque como se explicará a continuación, la fluorescencia no es transferida de molécula a molécula, por lo que el término es incorrecto y es preferible usar EET (transferencia de energía de excitación o la transferencia de energía electrónica) o RET (energía de resonancia transferencia) para referirse a este tipo de proceso [16].

En el fenómeno de FRET, una molécula donadora al pasar del estado excitado al estado fundamental y emitir un fotón, este espectro de emisión que se solapa con el espectro de absorción de la molécula aceptora, para que ambas lleguen al estado excitado; dado que también es un fluoróforo, ésta emitirá otro fotón al regresar a su estado fundamental (**Figura 2**). Este tipo de transferencia de energía depende directamente de la dirección del dipolo de las dos moléculas, en donde las orientaciones de la transición para el dipolo del donador y del aceptor deben estar aproximadamente en paralelo, este tipo de transferencia está limitado por la distancia entre las mismas [17].

El rango ideal para que la transferencia ocurra está definido por el radio de Foster, que depende de las propiedades espectrales del donador y aceptor [6].

El método de FRET es una de las alternativas para los estudios de espectroscopia de fluorescencia de correlación cruzada (FCCS), que se ha utilizado principalmente para analizar las interacciones de proteína–proteína y de proteína–DNA. Una de las ventajas, es que se puede realizar con una sola longitud de láser de excitación y un único canal de detección, siempre y cuando el par del fluoróforo tenga suficiente solapamiento espectral. La técnica limita la elección de los sitios de etiquetado de moléculas grandes, ya que los dos fluoróforos tienen que estar cercanos y sus momentos dipolares de emisión orientados en paralelo [18].

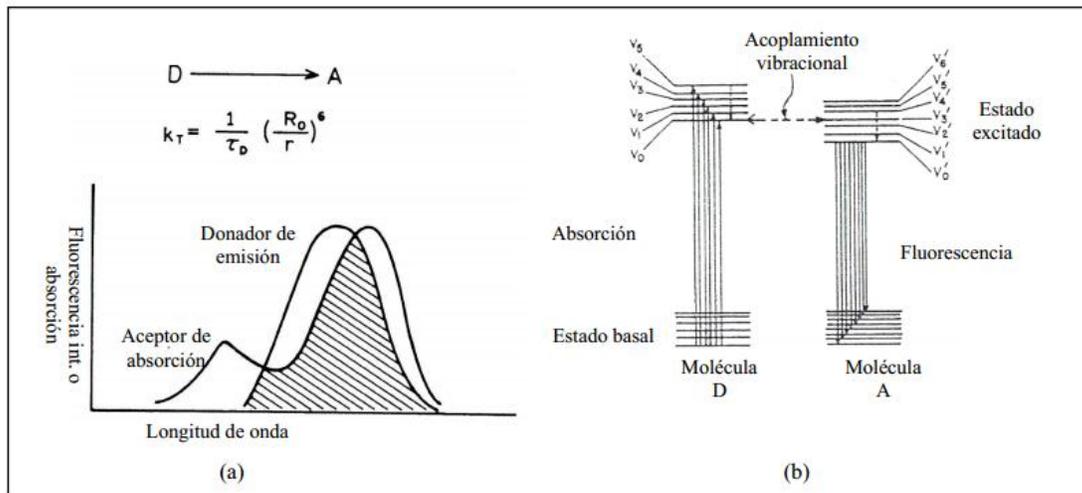


Figura 2. Método de FRET. (a) Sobrelapamiento espectral de FRET; (b) Mecanismo de transferencia de energía no colisional. [14]

El electrón que ya ha llegado a un nivel energético S_n ($n > 1$) regresará al estado fundamental S_0 [19] aunque, cuando ocurre que:

Una molécula llega a un estado excitado superior a S_1 la mayoría de las veces el electrón desciende por medio relajación vibracional hasta el primer estado de excitación ya que las distancias entre S_0 y S_1 son mayores que de S_1 a S_2 , S_3 , ... S_n , por lo que el tiempo de vida de los estados excitados superiores son, como consecuencia, tan cortos que raramente juegan un papel importante en la fotoquímica [20].

Los procesos por los que un electrón regresa de un estado excitado S_n a S_0 son los siguientes:

- A) Conversión no radiativa K_{NR} : son fenómenos de transición de un estado S_n a un estado S_0 sin emisión de fotones. Puede ocurrir cuando parte de la energía absorbida se disipa en el medio en forma de calor con una constante K_i , también ocurre cuando las moléculas excitadas liberan energía a las moléculas que se encuentren cerca de ellas, en un proceso llamado apagamiento colisional (*collisional quenching*). Con la constante de transferencia K_q se realiza la desactivación fluorescente y con una constante de transferencia K_g , ocurre la desactivación fosforescente. Cuando la transferencia de energía entre moléculas es a distancia, se le llama transferencia de energía a distancia o (*energy transfer at distance*), en este proceso hay una constante de transferencia K_d ; también está la conversión interna previamente mencionada, donde el electrón desciende

los diferentes estados vibracionales desde S_n hasta S_1 o S_0 sin emisión de energía, o por medio de una reacción química con una constante K_{ET} [14].

- B) Cruce entre sistemas: para que un electrón se transfiera de un estado excitado S_n a un estado triple excitado T_1 de menor energía que S_n , debe haber una inversión en el momento angular del *spin*, la cual es poco probable en las transferencias de electrones. A este fenómeno se le conoce como cruce de sistemas, con una constante de transferencia K_{isc} y por lo regular, el tiempo en que se lleva esta transición es de aproximadamente 10^{-8} segundos y el tiempo de vida del estado triple excitado puede llegar a durar de 10^{-4} segundos hasta días [15].
- C) Conversión radiativa: es la emisión de un fotón por medio de la luminiscencia, la cual puede ocurrir desde un estado de singulete excitado S_n (fluorescencia) con una constante de transferencia K_f y la emisión de un fotón, desde un estado triple excitado T_1 (fosforescencia) con una constante de transferencia K_p [21]. También puede transferirse la energía absorbida a otra molécula, para que la molécula aceptora se excite y pueda liberar esa energía en forma fluorescente, a este fenómeno se le conoce como FRET.

Todas estas transiciones se pueden resumir en el diagrama de Jablonski (**Figura 3**). Este es una representación gráfica de los diferentes estados electrónicos desde el estado fundamental S_0 , el singulete excitado S_1 y el estado triple excitado T_1 [22]. Comúnmente se muestran líneas horizontales que representan los diferentes estados electrónicos moleculares, que se desplazan verticalmente indicando las energías relativas y horizontalmente se muestra la multiplicidad por columnas, siendo S_0 y S_1 de multiplicidad 1 y T_1 con multiplicidad 3, estas columnas están interconectadas por flechas con líneas onduladas que representan transiciones no radiantes y con líneas rectas las transiciones radiantes [16].

La conversión radiante sucede desde un estado excitado S_n al nivel electrónico fundamental S_0 , pero a cualquiera de sus estados vibraciones. Este proceso se denomina fluorescencia. La fluorescencia es un proceso que puede ocurrir únicamente alrededor de 10^{-5} segundos [15].

El número de moléculas que presentan fluorescencia es limitado, porque se requiere de características estructurales que disminuyan la velocidad de los procesos de relajación no radiante y que aumenten la velocidad de relajación fluorescente. Puede suceder, que por motivos estructurales la relajación sea todavía más lenta y que pueda durar minutos he incluso horas. Cuando ocurre esto, se denomina al fenómeno fosforescencia [23].

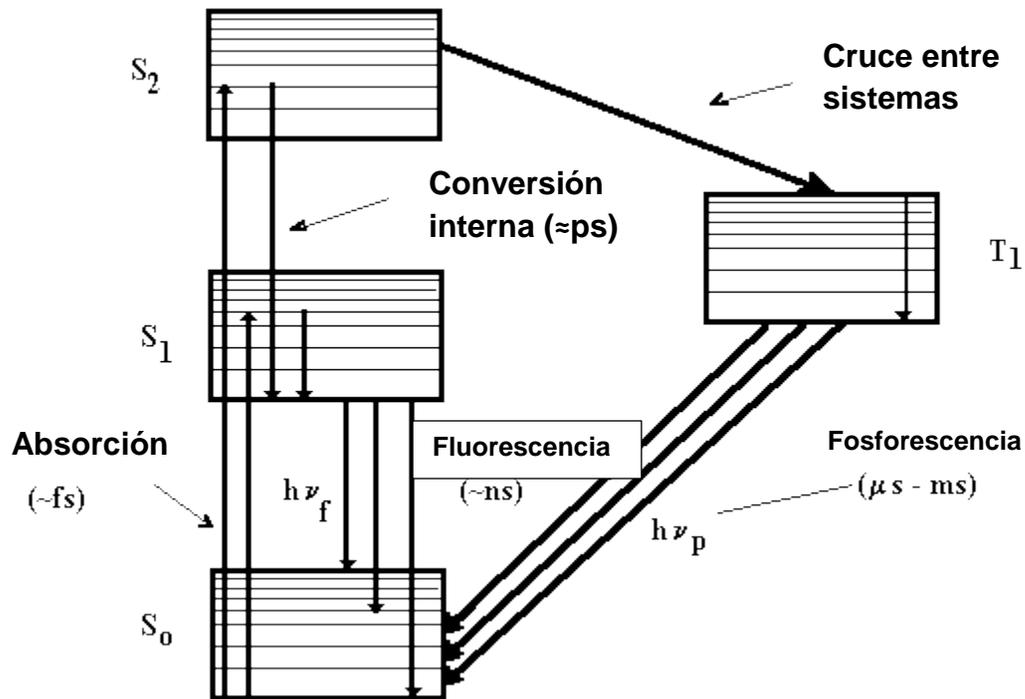


Figura 3: Diagrama de Jablonski (transiciones electrónicas) [24].

El espectro de fluorescencia es la representación gráfica de los máximos de emisión de los electrones al ser excitados a diferentes estados vibracionales. Cada nivel energético tiene múltiples estados vibracionales y no todas las moléculas se excitarán al mismo nivel de vibración; así se observa una ancha banda de emisión, bien controlada, por los niveles de vibración del estado excitado [25]. Por lo que es posible obtener dos tipos de espectros, un espectro de excitación/absorción y uno de emisión/fluorescencia.

El espectro de emisión es el resultado de la liberación de un fotón, cuando el electrón pasa de S_1 a S_0 , “directamente representaría la tasa de emisión de fotones por cada longitud de onda” [13]. Mientras que el espectro de excitación de fluorescencia, caracteriza la distribución de los electrones de la molécula en el estado fundamental [19]. Los espectros tienen un carácter simétrico (**Figura 4**). En la mayoría de los casos, el espectro sigue la regla de “imagen en el espejo de Frank-Condon”, la cual plantea que:

Todas las transiciones electrónicas son verticales, es decir, que se producen sin cambio en la posición de los núcleos. Como resultado, si una probabilidad de

transición en particular (factor de Franck-Condon) entre los niveles de vibración S_0 y S_1 es el más grande en la absorción, la transición recíproca también es más probable en la emisión [9].

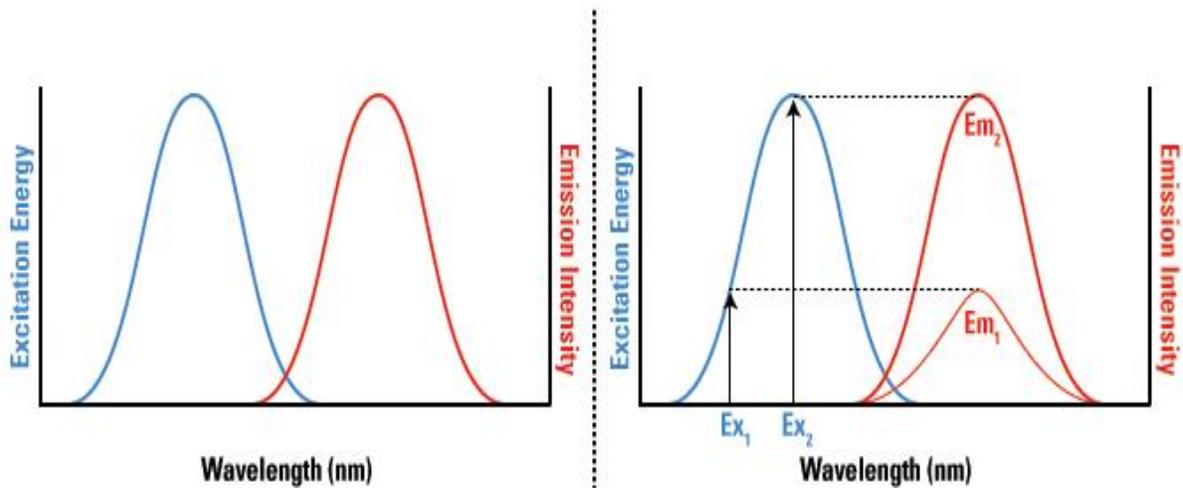


Figura 4: Relación entre el espectro de excitación (línea azul) y el espectro de fluorescencia (línea roja) [15].

Frecuentemente se observa que el espectro de fluorescencia está desplazado hacia la derecha con respecto al espectro de excitación, lo cual es debido a que la diferencia de energía de S_0 a S_1 es mayor que la transición de S_1 a S_0 . Así se pierde más energía como una forma no radiante en el proceso de absorción que en el de emisión [15].

Una de las interferencias más comunes en los espectros de fluorescencia, es el efecto de Raman. Como ya se ha mencionado, la fluorescencia es la emisión de un fotón que ha provocado cambios electrónicos en el fluoróforo, pero el efecto Raman sucede cuando el fotón nunca se absorbe, sólo se dispersa y provoca una transición vibracional o rotacional [25]. En un medio acuoso, los enlaces de tipo O-H son responsables del efecto Raman, la posición del pico Raman es dependiente de la longitud de onda de excitación [19].

Uno de los criterios para seleccionar sondas fluorescentes es la eficiencia cuántica (θ) que tenga la estructura, ya que cuanto más alto es el rendimiento cuántico, se necesita que se produzca menos luz de excitación de fluorescencia [12]. La eficiencia cuántica o rendimiento cuántico de la fluorescencia molar, se define

como el cociente entre el número de moléculas que presentan fluorescencia y el número total de moléculas excitadas, cuya expresión queda sintetizada como el cociente de fotones emitidos a fotones absorbidos [26]. El rendimiento cuántico de fluorescencia se obtiene mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia de una molécula, con otra molécula que sirve de referencia. El rendimiento cuántico se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\Phi_2 = \frac{OD_1 * \Sigma F_2}{OD_2 * \Sigma F_1} \Phi_1$$

Donde ϕ_2 es el rendimiento cuántico de la muestra, F_2 es la intensidad de fluorescencia de la molécula, OD_1 es la densidad óptica de la muestra, F_1 es la intensidad de fluorescencia de la referencia, OD_2 es la densidad óptica de la referencia y ϕ_1 es el rendimiento cuántico de la referencia” [19] entre los estándares más utilizados está el sulfato de quinina, el cual tiene un rendimiento cuántico de 0.55.

Utilizando cambios en las propiedades fluorescentes de las sondas con el fin de explorar diversos aspectos como interacciones soluto-disolvente, la polaridad del disolvente, cambios estructurales inducidos y su uso como estándares [27]. Hay distintos factores que afectan la fluorescencia de un compuesto, entre los que están: el apagamiento de la fluorescencia “*Quenching*”, la polaridad del medio, la estructura de la molécula, la temperatura y la viscosidad.

El efecto del apagamiento de la fluorescencia sucede cuando el fluoróforo está normalmente en disolución y puede interactuar con otras moléculas. Como consecuencia de esta interacción se puede producir una pérdida de emisión fluorescente. Esta interacción puede ser dinámica o estática; cuando es de tipo dinámico a consecuencia de la colisión del fluoróforo con otras moléculas. Al disiparse la energía en forma de energía cinética de la otra molécula, o una desactivación estática, en la cual una molécula forma un complejo con el fluoróforo en equilibrio con las especies separadas. En este caso la constante de desactivación es una constante de equilibrio.

Experimentalmente se ha comprobado que la fluorescencia está particularmente favorecida por la rigidez de la molécula, ya que disminuye la velocidad de relajación no radiante. De esta forma, cuando disminuye la temperatura de la muestra, disminuye la frecuencia de colisiones, al igual que la probabilidad de relajación vibracional y por tanto aumenta la eficiencia de la fluorescencia. Un aumento en la viscosidad del disolvente conduce al mismo resultado [23].

La polarizabilidad y la polaridad del medio que rodea al fluoróforo, afectan su espectro, sobre todo si es un grupo aromático; a esta influencia del medio y el fluoróforo se le llama efecto solvatocromico [28].

El efecto hipsocrómico (desplazamiento hacia el azul), sucede cuando el momento dipolar del estado excitado S_1 polariza a las moléculas circundantes, lo que provoca en ellas dipolos inducidos, que llegan a interactuar con el momento dipolar del fluoróforo, produciendo una relajación de su estado excitado al orientarse todos los dipolos. Como resultado, este efecto aumenta y la energía del estado excitado disminuye, por lo que la emisión ocurre a longitudes de onda más corta, esto sucede en solventes acuosos [29].

El efecto batocrómico se presenta cuando el solvente no es muy polar y no permite una relajación del estado excitado S_1 , por lo que la relajación ocurre después de la emisión, y como la energía del estado excitado es mayor, la emisión ocurre a longitudes de onda mayor, lo que provoca un desplazamiento hacia el rojo. Un ejemplo, de este fenómeno es la emisión del grupo indol en el triptofano, que puede ser desplazado del azul si el grupo está dentro de la estructura de una proteína nativa (N), y su emisión puede cambiar a longitudes de onda más largas (desplazamiento al rojo) cuando la proteína es desplegada [9].

Cuando un fluoróforo se une a una proteína, su fluorescencia será dependiente de la polaridad de los aminoácidos que lo rodean. El fenómeno de relajación (reorientación del dipolo en el medio) se produce más fácilmente en un medio fluido donde el sitio de unión es flexible, y el fluoróforo puede tener más grados de libertad. En tal caso, la emisión que se producirá después de la relajación no cambiará, ya que esta emisión parte siempre del mismo estado relajado y la longitud de onda no afectara la emisión. Cuando el sitio de unión es rígido, la emisión de fluorescencia se produce antes de la relajación, y la emisión partirá del estado excitado y dependiendo de la longitud de onda de excitación se alcanzaran máximos de emisión.

En caso de que el fluoróforo se encuentre en una zona rígida ocurrirá un efecto batocrómico, su máximo de emisión será a longitudes mayores ya que el estado excitado emitirá antes de que ocurra la relajación [19].

El análisis de biomoléculas utiliza las propiedades fluorescentes de fluoróforos que se unen covalentemente a las mismas para poder monitorizar procesos biológicos complejos. En la **Tabla 1** se presentan algunos de los fluoróforos más utilizados en la investigación así como sus propiedades:

Tabla 1. Características espectroscópicas de los fluoróforos comerciales más usados en el marcaje de proteínas: (a) Longitud de onda de absorción (b) Longitud de onda de emisión, (c) coeficiente de extinción molar [30].

Fluoróforo	^a Absorbancia (nm)	^b Fluorescencia (nm)	^c Coeficiente de extinción ϵ (M⁻¹ cm⁻¹)	Eficiencia cuántica ϕ
Fluoresceína	500 en etanol básico	541 en etanol básico	9.2×10^4 en etanol básico	0.97 en etanol básico
Cy3 (Cy3.18)	550 en PBS, 560 en etanol	565 en PBS, 575 en etanol	1.5×10^5 en etanol	0.04 en PBS, 0.09 en etanol
TAMRA	554 en agua	573 en agua	$\approx 1 \times 10^5$ en metanol	0.28 en agua
Texas Red (Sulforhodamine 101)	587 en metanol, 576 en etanol	602 en metanol, 591 en etanol	9.6×10^4 en metanol, 1.4×10^5 en etanol	0.93 en etanol, 0.35 en agua
Rojo de Nilo	552 en metanol, 519 en dioxano	636 en metanol, 580 en dioxano	4.5×10^4 en metanol, $\approx 4 \times 10^4$ en dioxano	0.7 en dioxano
Cy5 (Cy5.18)	650 en PBS, 658 en etanol	667 en PBS, 677 en etanol	2.5×10^5 en etanol	0.27 en PBS, 0.4 en etanol
Atto740	740 en PBS	764 en PBS	1.2×10^5 en PBS	0.10 en PBS
Cy7	747 en agua	774 en agua	2.0×10^5 en agua	0.28 en agua
Alexa 750	749 en buffer de fosfatos	775 en buffer de fosfatos	2.4×10^5 en buffer de fosfatos	0.12 en buffer de fosfatos
IR125 (ICG)	781 en agua / metanol 75/25%, 786 en etanol	825 en metanol, 815 en agua	2.1×10^5 en agua / metanol 75/25%, 1.9×10^5 en etanol	0.02 en agua / metanol 75/25%, 0.05 en etanol, 0.01 en agua

2.4 Biotecnología aplicada a las biomoléculas

La industria de productos biotecnológicos y bioterapéuticos ha tenido un rápido crecimiento en los últimos años, con una valoración estimada de \$145 mil millones de dólares estadounidenses en el año 2014. Cada vez más, la tecnología de la ingeniería de proteínas se está utilizando para desarrollar proteínas terapéuticas con un mejor rendimiento, lo que permite nuevos enfoques terapéuticos mediante la utilización de biofármacos. Algunos ejemplos de estos son: Anticuerpos monoclonales, citosinas, factores de crecimiento, factores hematopoyéticos, vacunas [31].

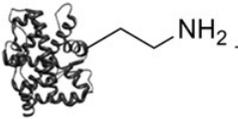
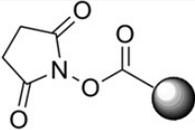
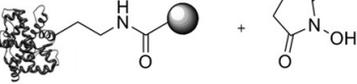
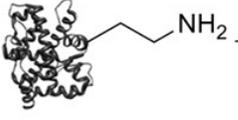
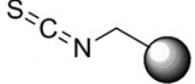
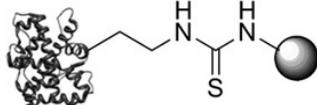
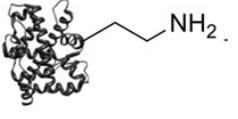
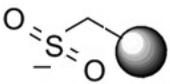
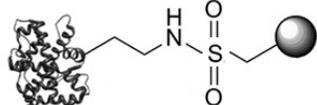
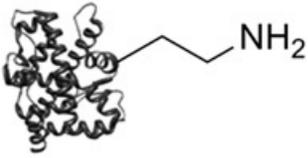
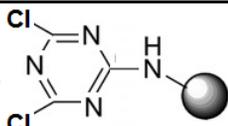
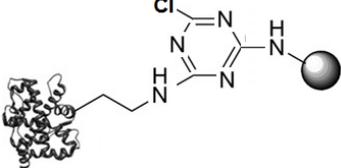
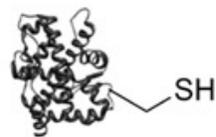
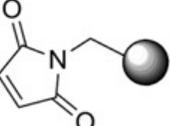
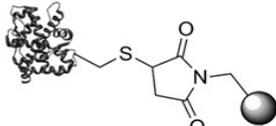
La ingeniería de proteínas se ha convertido en una técnica esencial para la modificación química, estudios funcionales y análisis biofísico. Muchas de estas técnicas se refieren colectivamente como "evolución dirigida", además de que esta rama del conocimiento ha encontrado una aplicación más generalizada en la mejora y la manipulación de la función de proteínas para usos médicos e industriales. Estos avances han sido impulsados por el entendimiento y versatilidad de las proteínas para fines comunes de investigación y desarrollo tecnológico [32].

Una de las herramientas utilizadas en el diseño de biosensores es la conjugación de moléculas fluorescentes a proteínas. Este tipo de biosensor fue descrito por primera vez con anticuerpos-S marcados fluorescentemente, en diferentes secciones de tejido [33]. Con la producción de los anticuerpos monoclonales y la citometría de flujo, el valor de las proteínas con etiquetas se ha vuelto muy evidente para la comunidad de investigación biomédica. En particular, los anticuerpos con moléculas fluorescentes [34].

Para que la conjugación se lleve a cabo, se utilizan los residuos reactivos de los aminoácidos presentes en las proteínas, estos son capaces de reaccionar con ciertas moléculas fluorescentes para generar una unión covalente; como es el caso de las Iodoacetamidas y maleimidias, que se usan típicamente para marcar grupos sulfhidrilos mientras que los isotiocianatos, n-hidroxiciccinimida y cloruros sulfonilos (sulfonyl chlorides) se utilizan para marcar aminas (Tabla 2) [14].

Tabla 2: Reactivos y reacciones de marcaje fluorescente comúnmente utilizados.

Listado de grupos reactivos comúnmente utilizados para el etiquetado de proteínas, el grupo funcional en la proteína, el enlace formado, y las sondas disponibles para la conjugación de proteínas [34, 35].

Grupo funcional de la proteína	Grupo reactivo en el fluoróforo	Enlace formado	Fluoróforos comerciales con grupos reactivos probados
 Amina Primaria	 NHS-Ester	 Enlace amida	Fluoresceína, AMCA, carboxi fluoresceína, biotina, cianina, Alexa Dyes, Rodamina
 Amina Primaria	 Isotiocianato	 Tiourea	Floresceína, Rodamina, Verde Oregon
 Amina Primaria	 Sulfonil Halide	 Enlace sulfonamida	Rojo de Texas, Lisamina, Rodamina B
 Amina Primaria	 Clorinato Triazina	 Amino triazidas	5-DTAF
 Grupo sulfidrilo	 Maleimida	 Enlace Tioeter	Floresceína, Rodamina, Verde Oregon, Alexa Dyes, biotina, Rojo de texas

En general, las reacciones que se utilizan para la modificación de las proteínas son de sustitución nucleófila (**Figura 5**). Para que esta reacción se lleve a cabo, se necesita de un átomo llamado nucleófilo (con un par de electrones libres), el cual ataca a un átomo que es deficiente de carga (electrófilo); posteriormente un

sustituyente del electrófilo es desplazado como grupo saliente (X). En el caso de las proteínas, el nucleófilo es un átomo perteneciente al grupo amino o sulfhidrilo, que son grupos reactivos de la cadena lateral de algunos aminoácidos. Por su parte, el electrófilo es un átomo de carbono dentro de la estructura del fluoróforo. Para la modificación de proteínas con fluorocromos, hay dos clases generales de agentes que se utilizan con mayor frecuencia: los agentes acilantes y los alquilantes [34] (**Figura 6**).

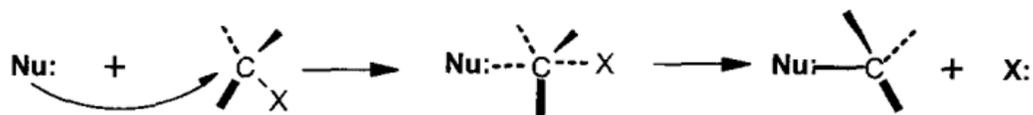


Figura 5: Representación esquemática de una reacción de sustitución nucleófila. En este tipo de reacción, un nucleófilo (Nu) con un par solitario de electrones ataca a un electrófilo centro, deficiente en electrones que resulta en un acoplamiento covalente del nucleófilo y el electrófilo junto con el desplazamiento de un grupo saliente (X) [34].

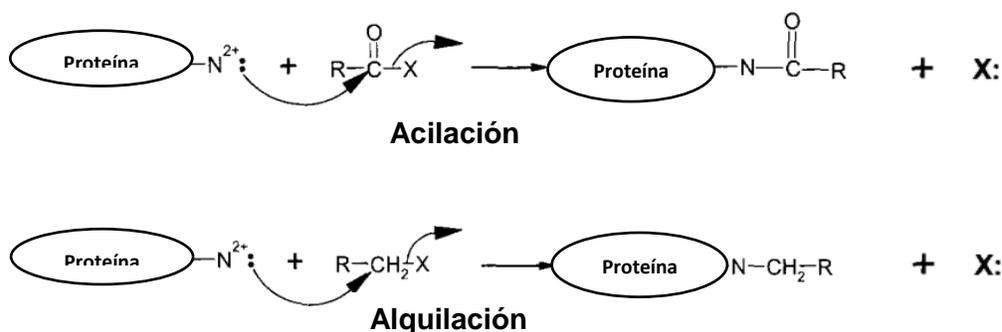


Figura 6: Representación esquemática de las reacciones de alquilación y acilación. En la acilación, un grupo carbonilo activo se une a la cadena lateral de un aminoácido, y en la alquilación, un grupo alquilo reacciona con el nucleófilo. Que es un grupo reactivo de algunos aminoácidos. Ambas reacciones resultan en el desplazamiento de un grupo saliente (X) [34].

El pH es de gran importancia para que ocurra el ataque nucleofílico de una reacción. Mediante el análisis del pKa, del grupo reactivo de la cadena lateral (**Tabla 3**), es posible saber a qué pH la especie reactiva permanecerá protonada o desprotonada, por ejemplo el grupo amina en un medio de pH por debajo de su pKa, estará protonada y tendrá una carga positiva; lo que disminuirá su propiedad de nucleófilo. En un medio con pH mayor a su pKa, la amina estará desprotonada y con carga neutra, lo que la hará un mejor nucleófilo.

Tabla 3. pKa de los grupos funcionales de los aminoácidos

Grupo funcional	pKa como aminoácido libre	pKa en proteínas
ε- Amino	10.5 – 10.8	9.11 – 10.7
α- Amino	8.8 – 10.8	6.72- 8.14
Sulfhidrilo	8.3 – 8.4	8.5 – 8.8
α- Carboxilo	1.8 – 2.6	3.1 – 3.7

Cuando se controla el pH del medio, se puede dirigir la reacción para que sea más específica y tenga un mayor rendimiento, por ejemplo: a pH neutro N etilmaleimida reacciona más fácilmente con el grupo sulfhidrilo de la cisteína, que tiene un pKa de 8.5 a 8.8, en comparación con el grupo ε- amino de la lisina, cuyo pKa oscila de 9.11 a 10.07 [34].

Otra herramienta en el diseño de biosensores, con marcadores fluorescentes, es la mutación sitio dirigida de las proteínas. Si bien es cierto que es posible modificar ciertos aminoácidos de la secuencia proteica, el hecho de realizar mutaciones en regiones del DNA codificante, nos ayuda a realizar marcas en regiones de interés para fines específicos.

Muchos blancos terapéuticos son biomoléculas como las proteínas, las cuales median diversos procesos biológicos, entre ellas la proteína motivo de nuestro estudio. Esta proteína es la Calmodulina (CaM), la cual está implicada en procesos biológicos como el cáncer, analgesia y varias afecciones psiquiátricas. construir biosensores de esta proteína será de gran ayuda para desarrollar herramientas analíticas de investigación y con ellos podemos buscar moléculas bioactivas a ser consideradas opciones terapéuticas para las patologías relacionadas con la CaM.

2.5 Calmodulina

La Calmodulina (CaM) es una proteína de bajo peso molecular (16,706 Da), conformada de 148 aminoácidos [36], además de ser una proteína altamente conservada entre especies que se ha encontrado en todas las células eucariontes estudiadas y cuya función es la de ser un receptor de calcio intracelular multipropósitos, responsable de mediar la mayoría de los efectos relacionados con el calcio” [37], contiene aproximadamente 4 sitios de unión a Ca^{2+} con una K_d de $10^{-6} M$ [38].

La proteína CaM posee dos pares de motivos llamados *EF-hand* que forman lóbulos N y C terminal y se conectan por una larga hélice, lo que genera una estructura que asemeja la forma de una pesa. Los lóbulos constituidos por los dominios *EF-hand* presentan una identidad en secuencia del 48% y una

homología del 75%. Estas diferencias se ven reflejadas en las afinidades de unión por calcio, el lóbulo C terminal presenta una afinidad 10 veces mayor (K_d aprox. 0.2 M) que el N terminal (K_d aprox. 2 M), que actúa uniéndose a otras proteínas y la mayoría de las veces funciona como una subunidad reguladora de complejos enzimáticos. La proteína pasa de un estado inactivo a un intermediario $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ para ser una proteína activa al unirse con su blanco molecular (**Figura 7**) [39].

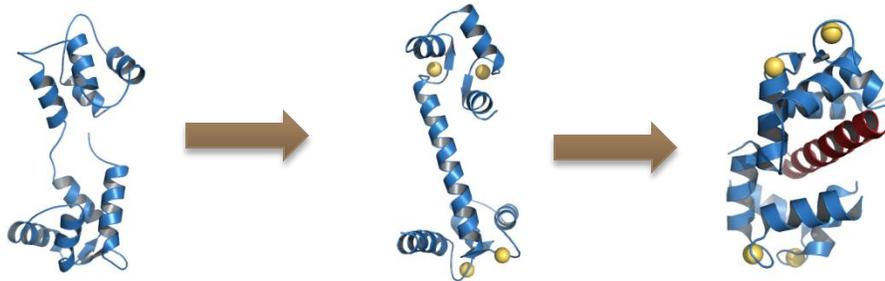


Figura 7: Conformaciones de la CaM. Se muestra La proteína CaM en su estado inactivo (apo- CaM), en su estado intermediario unida a calcio ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) y en su forma activa unida a otro blanco molecular (CaM/CaMKII α) [39].

Esta proteína es muy versátil, está implicada en diversas rutas de señalización, siendo así una proteína clave en varios procesos bioquímicos, por ejemplo: el funcionamiento cardíaco, pues se encarga de censar las concentraciones de calcio intracelular y “estando acoplada a la calcineurina, la CaM dependiente de *proteín cinasa II*, los canales de calcio de tipo L (14-15) y los receptores de rianodina tipo 2 (R y R2)” [40] que se encuentra en el retículo sarcoplásmico de los miositos.

La calmodulina también se encuentra asociada a receptores de rianodina tipo 1 (R y R1) que se localizan en el músculo liso. La CaM dependiente de *proteín cinasa II* es altamente expresada en las células secretoras de insulina y se asocia con los gránulos secretores de insulina, se ha propuesto para desempeñar un papel importante en la exocitosis o en el transporte de gránulos de insulina [41].

De igual manera regula a la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina tipo 1 (PDE1), esta familia de fosfodiesterasas tiene varias isoformas, las cuales están distribuidas en diferentes órganos, entre los que se pueden mencionar el cerebro, los pulmones y el corazón. Todos los procesos biológicos en los que participa son de gran importancia, por lo que la CaM es un blanco molecular atractivo para diversos tratamientos analgésicos, anticancerosos, psicotrópicos, etc.

La proteína CaM, se caracteriza por encontrarse involucrada en varios procesos biológicos de gran importancia, lo que la ha hecho ser un blanco farmacéutico atractivo para diversos tratamientos analgésicos, anticancerosos, psicotrópicos, etc.

Esta proteína y su utilización en el diseño de biosensores son el objeto de estudio de la presente investigación, algunos de los estudios realizados con calmodulina en el diseño de biosensores fluorescentes son los siguientes:[40, 42-45]

El diseño y construcción de un biosensor basado en esta proteína, puede ser aplicado para hacer eficiente la búsqueda y diseño de fármacos, por ejemplo el “*High Throughput Screening*”, y con esto se podrían reducir el tiempo y los costos de los ensayos *in vitro* y un análisis más sencillo mediante una respuesta binaria que nos proporcionaría un bioensayo con fluorescencia.

Si bien ya se ha patentado un biosensor basado en la proteína CaM, que tuvo como fluoróforo al monobromobimano (mBBBr) y está reportado por González Andrade. y colaboradores [38]. En este trabajo se construyen nuevos biosensores de CaM con otras propiedades espectroscópicas para moléculas que intervengan espectroscópicamente con los biosensores ya reportados, permitiendo un rango más amplio para el análisis de este tipo de compuestos.

Los biosensores son sistemas que presentan un mecanismo híbrido para transformar la información de las interacciones químicas en señales medibles por medio de mecanismos bioquímicos. Estos sistemas están integrados por una componente receptor que generalmente es una biomolécula (proteínas, canales iónicos, células, etc.). La cual tiene una alta selectividad por el analito de interés, está por medio de un componente transductor como los fluoróforos empleados, transforma la respuesta biológica de la biomolécula en una señal cuantificable la cual es enviada a un sistema detector, siendo este último de tipo espectroscópico, eléctrico, mecánico, etc. El interés en el desarrollo de biosensores ha sido particularmente impulsado por las necesidades de contar con técnicas analíticas automatizadas que procesan un gran número de muestras, con mayor selectividad, sensibilidad y reproducibilidad.

La CaM participa en un número importante de eventos biológicos, relacionados con el mecanismo de acción de diferentes grupos de fármacos, tales como anticancerígenos, antipsicóticos, relajantes musculares, agentes bloqueadores α -adrenérgicos entre los más importantes. En particular se ha demostrado la interacción directa de la proteína CaM con los antipsicóticos de tipo fenotiazínicos. La importancia médica de este tipo de fármacos y la constante introducción de nuevos compuestos terapéuticos de diferentes tipos (sintéticos, biotecnológicos o derivados de productos naturales), ha generado la necesidad de desarrollar nuevos métodos para la selección y cuantificación de estos.

De manera general, la investigación incluye: a) la obtención del gen correspondiente; b) la construcción del sistema de sobreexpresión mediante el empleo de diversas técnicas de biología molecular (clonación, subclonación, etc.) y c) la modificación química con grupos reporteros fluorescentes.

En la Figura 8 se presenta la estrategia general de la construcción de estos biosensores, la cual consta de dos etapas. La primera es la mutagénesis sitio-dirigida en la cual reemplazamos un aminoácido en particular por un residuo de cisteína y con el grupo tiol altamente reactivo procedemos a la segunda etapa, un marcaje sito-específico con compuestos reactivos a los tioles de las cisteínas (ALEXAS). Lo que hace que estos sistemas puedan ser muy versátiles para diferentes metodologías bioanalíticas.

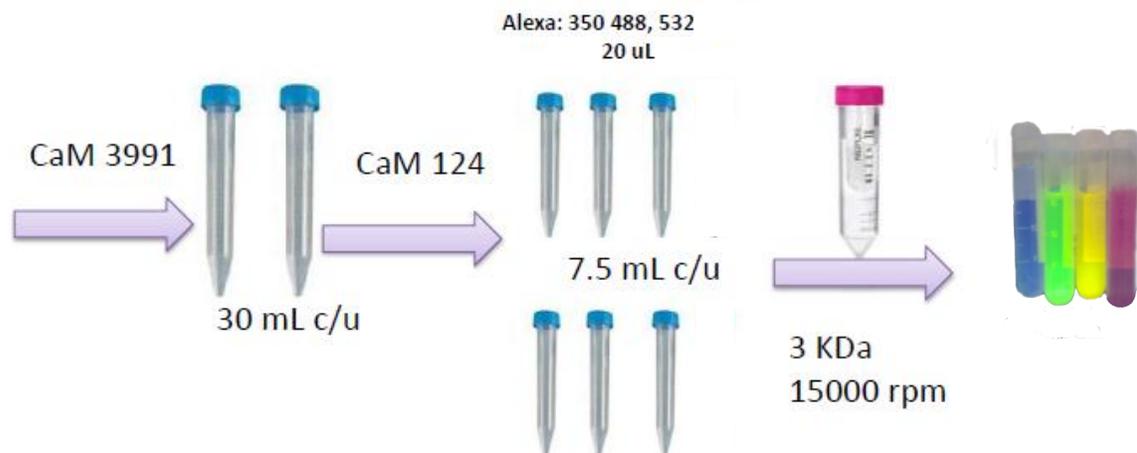


Figura 8. Estrategia general en la construcción de biosensores, usando mutagénesis sitio-dirigida y marcaje sito-específico.

Con la proteína CaM, se han desarrollado una serie de biosensores de tipo fluorescente, basándose en el marcaje sito-específico con el fluoróforo monobromobimano (mBBr), este compuesto es altamente sensible a los cambios de polaridad en el ambiente molecular cercano a su posición en particular y con los cambios conformacionales que surgen de la interacción proteína-proteína o proteína-ligando los cuales proporciona una respuesta física cuantificable. Por lo que ahora en este proyecto la propuesta es construir nuevos biosensores de CaM con otros fluoróforos con propiedades diferentes tales como la gama de Alexa Fluor® maleimida con rangos de emisión de fluorescencia desde 350 a 532 nm. Ya que muchos compuestos que se han querido analizar con la serie de

biosensores CaM-mBBr tienen longitudes cercanas a dicho sistema lo que interfieren en la señal, y con un rango mayor de longitudes de onda se podrá seleccionar el biosensor más indicado para ciertas determinaciones.

3. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del proyecto consiste en el desarrollo de nuevos biosensores de la proteína CaM como herramientas de investigación bioquímica y su aplicación en la búsqueda de nuevas entidades moleculares con propiedades bioactivas a partir de fuentes naturales y sintéticas.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comprobar que el gen amplificado he inducido corresponda a la proteína CaM, y las mutantes CaM L39C-V91 y CaM M124C.
2. Sobreexpresión de las proteínas CaM L39C-V91 y CaM M124C.
3. Purificación de las proteínas mutantes mediante técnicas de cromatografía.
- 4.- Realizar la modificación química con tres diferentes fluoróforos (Alexa 350, Alexa 448 y Alexa 532).
5. Realizar un ensayo de unión con el inhibidor clorpromazina (CPZ) y un ensayo de eficiencia cuántica para probar la funcionalidad de los biosensores obtenidos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Optimización geométrica de las estructuras *in silico*

Se construyeron las estructuras de los fluoróforos utilizados (Alexa 350, 488 y 532) en el programa HyperChem. Los cuales fueron adquiridos de la compañía Life Technologies. Adicionalmente, se obtuvieron las estructuras de la proteína a partir del Protein Data Bank (PDB) en 2 conformaciones, unida con el ion Ca^{2+} (conformación “abierta”; 1CLL.pdb) y unida al fármaco trifluoroperazina

(conformación “cerrada”1A29.pdb). Se construyeron “in silico” seis biosensores de CaM, llamados: CaM-M124C-Alexa350, CaM-M124C-Alexa488, CaM-M124C-Alexa532, CaM-L39C/V91C-Alexa350, CaM-L39C/V91C-Alexa488 y CaM-L39C/V91C-Alexa532.

5.2 Expresión y purificación de CaM L39C-V91 y CaM M124C

Las cepas comerciales de *E. coli* DH5 α fueron inoculadas en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB), con 100 μ g/mL de ampicilina. Las células fueron crecidas durante toda la noche a 37°C a una velocidad de agitación de 250 rpm. Los 10 mL de este medio fueron inoculados en 500 mL de medio LB, cuando la DO₆₀₀ fue de entre 0.8 y 1.0, induciendo con 1 g de L-Arabinosa (0.2%) y 0.06 g de IPTG (0.5 mM). El cultivo fue crecido durante 8 horas a 37°C a una velocidad de agitación de 250 rpm. Se centrifugó a 4,500 rpm por 15 minutos, el paquete celular se resuspendió en 200 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 y se centrifugó a 4,500 RCF por 15 minutos. El paquete celular fue resuspendido en 50 mL de buffer de lisis, el cual contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 2 mM, y DTT 1 mM. Al final se le adicionó lisozima a partir de huevo a una concentración final de 200 μ g/mL, seguido de una incubación en hielo durante 40 minutos. Las bacterias fueron sonicadas con un sonicador (Ultrasonic Homogenizer), con pulsos de 5 minutos a una amplitud de 35 %, durante 3 veces con intervalos de descanso. Los restos celulares fueron sedimentados a 14,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante es removido y se le adicionó CaCl₂ y NaCl a una concentración final de 5 mM y 500 mM respectivamente. El sobrenadante del paso anterior se pasó por una columna de intercambio hidrofóbico (Phenyl-Sepharose CL-4B), equilibrada previamente con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, DTT 0.5 mM, CaCl₂ 0.1 mM y NaCl 500 mM. La proteína CaM es eluida con buffer de elusión, el cual contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM.

Las cepas que contienen los plásmidos correspondientes a las mutantes CaM L39C-V91 y CaM M124C fueron inoculadas en 10 ml de medio 2xYT con 100 μ g/mL de ampicilina (incubación de 12 h 37°C y 150 rpm). Los 10 mL se transfirieron a matraces de 1 L con 500 mL de medio 2xYT y cuando se obtuvo una DO de 0.6, se indujeron con L-Arabinosa 0.2% (incubación de 12 h 37°C y 150 rpm). Las cepas fueron centrifugadas a 4,500 rpm durante 15 minutos y posteriormente fueron resuspendidas en Tris-HCl 50 mM. Se repitió el paso de centrifugación a 4,500 RCF por 15 minutos y se resuspendió en 50 mL (tris-HCl 50 mM, EDTA 3mM, DTT 1 mM pH=7.5, lisozima 200 μ g/mL y 5 mM de 2-mercapto-etanol).

Las cepas se sonicaron con *Ultrasonic Homogenizer* con tres repeticiones de pulsos de 5 minutos a 35% de amplitud. Los restos celulares se sedimentaron a través de centrifugación a 15,000 RCF por 15 minutos, al sobrenadante se le

agregó 5 mM de CaCl_2 y NaCl 500 mM. La purificación de la proteína se realizó en el HPLC *Waters Alliance 2695* con un detector de UV a 280 nm, usando una columna de intercambio aniónico (*Source Q. Amersham Biosciences*), con solución amortiguadora de Bis-Tris 5mM, pH= 8.5. A la columna se le inyectaron 7 mL y se eluyó con una solución de Bis-Tris pro 50 mM NaCl 500 mM pH 8.8. Se desaló la proteína en una columna de exclusión molecular Fase móvil; Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con flujo de 1 mL/min. El seguimiento de la purificación se realizó utilizando Geles 1D SDS-PAGE 12%.

5.3 Modificación química con los fluoróforos Alexa350, Alexa -488 y Alexa-532 de las cisteínas reactivas de las proteínas mutantes de CaM L39C-V91 y CaM M124C.

Después de la purificación, a cada una de las mutantes se le adicióno 20 nM de DTT y se incubaron con protección a la luz por 12 horas a 4°C. Posteriormente se realizó una filtración mediante una columna HR-100 (Pharma-Biotech) para eliminar el exceso de DTT. La modificación química de las mutantes se realizó con un exceso de 10x con respecto a la concentración de las mutantes correspondientes (CaM L39C-V91 y CaM M124C). Esta reacción se dejó incubando por 24 horas con protección a la luz. La proteína de cada alícuota se lavó con el objetivo de eliminar el exceso de fluoróforos y se concentró utilizando amicones con un corte de 10,000 kD y se le determino la concentración con el método del ácido bicinonilico [46]

5.4 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de las proteínas mutantes CaM L39C-V91 y M124C con sus respectivos fluoróforos se determinó utilizando el método de ácido bicinonilico.

La reacción de ácido bicinonilico es un método colorimétrico que se basa en la reducción cuantitativa de Cu (II) a Cu (I). Por parte de las proteínas y de la reducción acoplada del BCA, que forma con el cobre un complejo púrpura, presenta un máximo de absorción a 562 nm[46] (**Figura 9**).

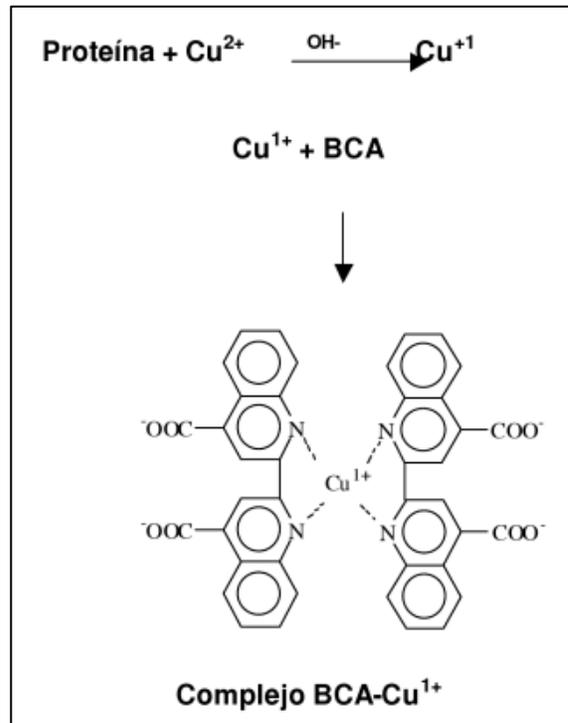


Figura 9: La formación del complejo púrpura con BCA y ión cuproso generada a partir de la reacción de Biuret.

5.5 Visualización por geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Se realizó una visualización del proceso de purificación de la proteína, mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE con un gel separador al 12% y un gel concentrador al 5%. Las proteínas se calentaron por 10 minutos a 98 °C y se dejaron reposar a -20°C por 10 minutos. Se tomó 20 µL de cada una de las muestras y 10 µL de buffer de carga colocándolas en cada carril con un tiempo de corrida de aproximadamente 2 horas y un voltaje de 20 A.

Los geles se tiñeron con azul de *Coomassie* por una hora y después se destiñeron con una solución de etanol al 50% y ácido acético al 10%.

5.6 Bioensayo de unión a la CaM utilizando como inhibidor clásico a la clorpromazina (CPZ)

Se realizaron curvas de titulación para cada uno de los ocho biosensores obtenidos, mediante la saturación del sistema con una solución de Ca^{2+} , llegando a una concentración de 10 µM para obtener la conformación abierta de la calmodulina y así poder agregar concentraciones crecientes de Clorpromazina

(CPZ). Cada titulación se realizó a 25°C con agitación constante. En la Tabla 4 se describen las condiciones experimentales para las titulaciones de cada biosensor.

Tabla 4. Condiciones experimentales para cada uno de los biosensores de CaM basados en fluoróforos Alexa

Sitio mutado de la proteína CaM	Fuoroforo empleado p / marcaje (Alexa fluor)	Concentración De proteína modificada [μM]	Λ Excitación	Rango de recolección	Λ max de emisión
M124C	350	2.007	346	360-550	438
	488	4.162	495	480-600	516
	532	2.007	531	480-650	551
L39C-V91	350	2.005	346	360-550	440
	488	5.009	495	510-600	518
	532	1.000	531	500-670	551

5.7 Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico de fluorescencia se obtuvo mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia de nuestras muestras, con otra molécula que de referencia, que en este caso se utilizó sulfato de quinina $1 \mu\text{M}$ con una $\phi = 0.55$, colectando el espectro de emisión en un rango de 370 a 700 nm con una $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, los rangos de colecta de datos y λ_{ex} de cada muestra se describen en la **Tabla 4**. El rendimiento cuántico se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\Phi_2 = \frac{OD_1 * \Sigma F_2}{OD_2 * \Sigma F_1} \Phi_1$$

Donde ϕ_2 es el rendimiento cuántico de la muestra, F_2 es la intensidad de fluorescencia de la molécula, OD_1 es la densidad óptica de la muestra, F_1 es la intensidad de fluorescencia de la referencia, OD_2 es la densidad óptica de la referencia y ϕ_1 es el rendimiento cuántico de la referencia”

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de la construcción de las mutantes de CaM 39-91 y 124

La obtención de las proteínas CaM con cisteínas reactivas, iniciaron con la amplificación de las construcciones pET12-CaM 3991 y pET12-CaM 124; las cuales contienen el vector de sobreexpresión pET12 y el gen de la CaM correspondiente a las mutaciones específicas L39C/V91C y M124C. Los vectores amplificados se sometieron a digestión con las enzimas de restricción *BAMHI* y *NdeI*, para corroborar que la construcción e contiene el gen de CaM (**Figura 10**)

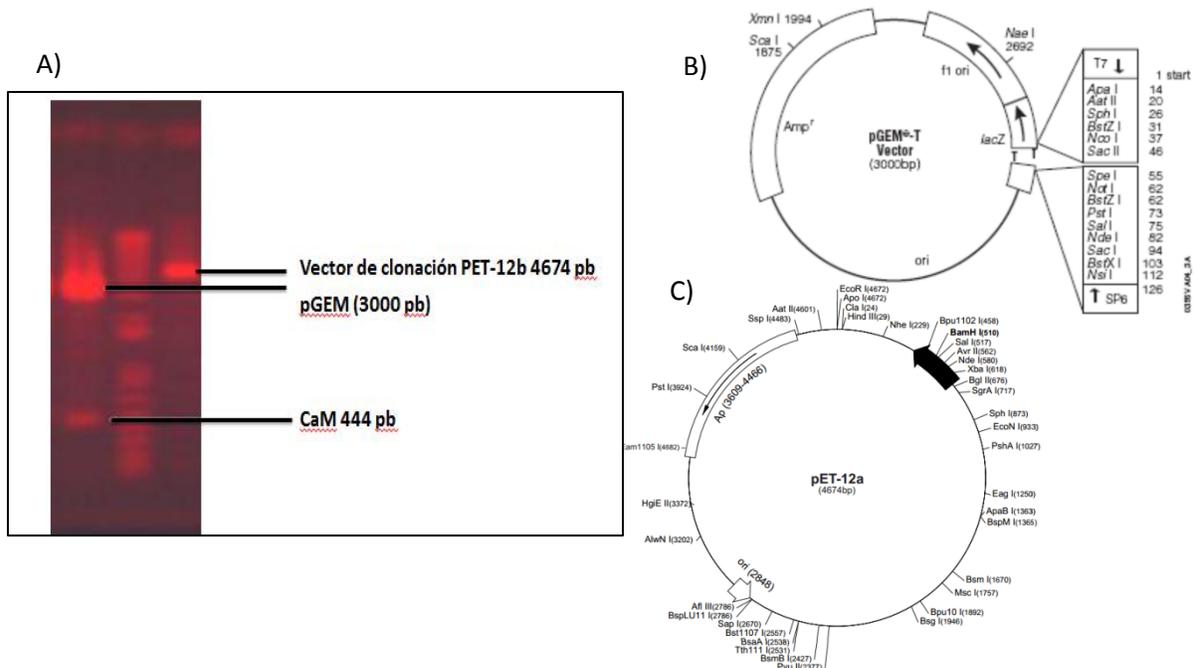


Figura 10: (A) Gel de agarosa, en el primer carril se encuentra el vector de clonación pGEM- CaML1, el segundo carril es MPM y el tercero el vector pET-12b. (B) Vector pGEM- CaML1. (C) Vector PET-12b

Con los vectores de expresión conteniendo el gen de la CaM se realizó la transformación de las cepas de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias individuales de las mutantes, de las cuales dos fueron para las posiciones L39C/V91C y tres para la posición M124C.

Una vez purificada la construcción pET12-CaM de todas las colonias mutantes se secuenciaron. La **Figura 11** presenta el alineamiento múltiple de la secuencia nativa de la proteína CaM (WT CaM) y las construcciones de las posibles mutantes de las posiciones 39 y 91 (Cepa 1 3991 y Cepa 2 3991) y tres secuencias de la posición M124C.

NUMERO DE BASE	39	91	124
WT CaM	3GTCACCTGGGTCA	ATTCCGAGTCTTTGA	GATGAAATGATC
Cepa 1 3991TG.....
Cepa 2 3991TGT.....TG.....
Cepa 1 124TGT.....
Cepa 2 124TGT.....
Cepa 3 124

Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias para los plásmidos purificados después de la mutación sitio dirigida.

6.2 Purificación de las mutantes CaM M124C y CaM L39C/V91C

Después de la sobreexpresión y el lisado celular la purificación de las proteínas se realizó en tres cromatografías: intercambio hidrofóbico, intercambio iónico y exclusión molecular. La cromatografía de intercambio hidrofóbico se realizó con una columna de fenil sefarosa (**Figura 12**).

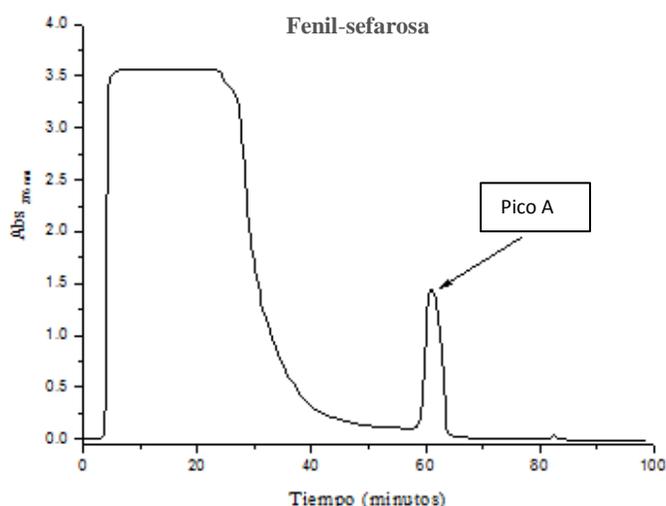
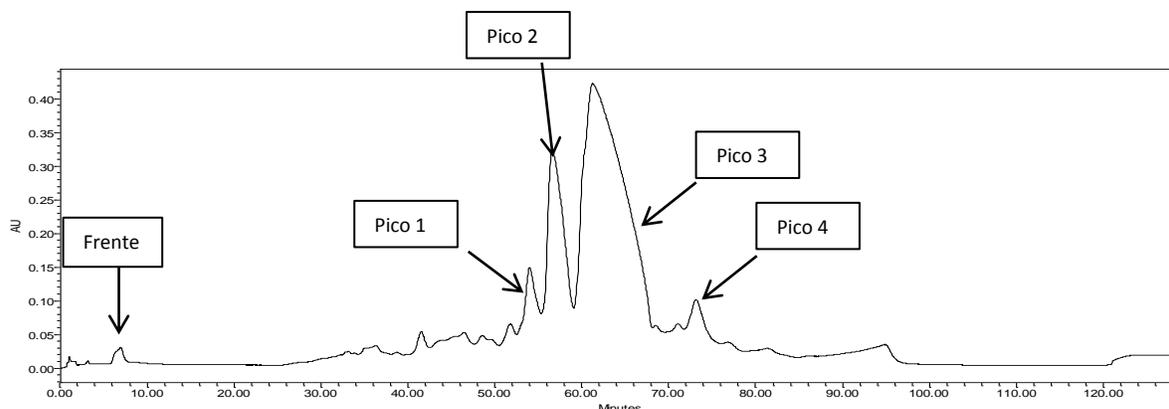


Figura 12. Cromatograma de la purificación de la proteína CaM, correspondiente a la columna Phenyl-Sepharose CL-4B. La fase móvil utilizada fue Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT 0.5 mM, CaCl₂ 0.1 mM y NaCl 500 mM a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La CaM se eluyó con Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM (Buffer de elución); detección de absorbancia a una λ_{276} . Las fracciones correspondientes a la proteína CaM fueron eluidas entre los minutos 58 y 64.

La fracción obtenida por intercambio hidrofóbico se purificó mediante una columna de intercambio aniónico, utilizando una fase móvil de bis-Tris-propanolol pH 8.8.

La CaM es eluida con un gradiente del mismo buffer conteniendo NaCl 500 mM (**Figura 13 A y B**. Se encontramos 4 picos, los cuales fueron monitoreados por SDS-PAGE. En la **Figura 15** se presenta el perfil cromatografico, seleccionando el “pico 2” de la cromatografía de intercambio aniónico ya que esta es la fracción con mayor cantidad de proteína. El rendimiento neto de la purificación es de alrededor de 60mg/L de cultivo.

A)



B)

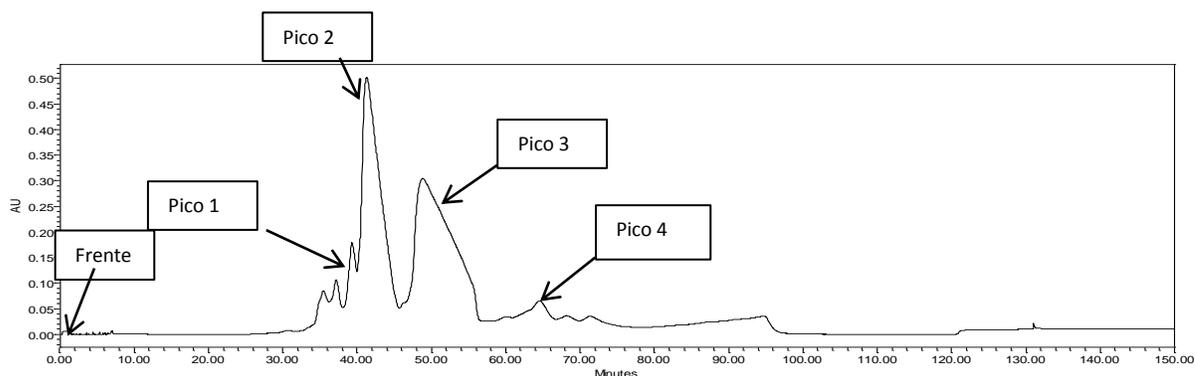


Figura 13 : Cromatograma para purificación de (A) CaM-M124C y (B) CaM L39C/V91C. Flujo de 1 mL/min con buffer Bis tris-propanol 50 mM pH=8.8, buffer de elución Bis tris-propanol 50 mM, NaCl 500 mM, pH=8.8, λ_{276} .

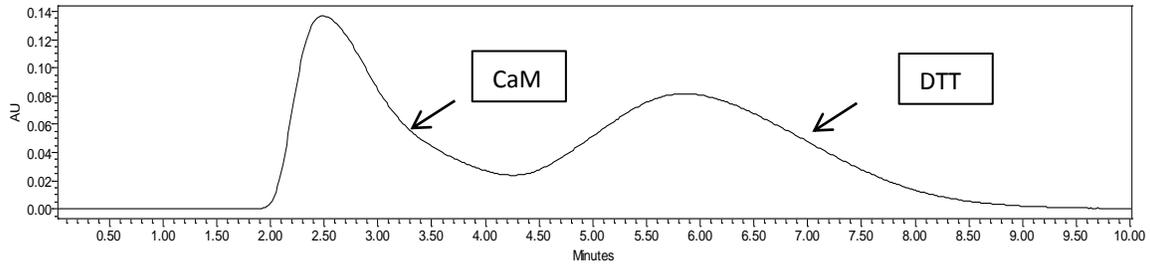


Figura 14 : Cromatograma de exclusion molecular de CaM-M124C y CaM V39C/L91C. Fase móvil de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a una velocidad de flujo de 1 mL/min, λ_{276} .

Finalmente, la fraccion colectada de la purificacion por intercambio anionico se redujo con DTT para evitar la formación de puentes disulfuro de las proteínas; y se mantuvo durante toda la noche para seguir la reducción total de esta. Posteriormente, se realizo una ultima cromatografía de exclusion molecular para eliminar el DTT (Figura 14) e inmediatamente se modifico químicamente con los fluoroforos Alexas.

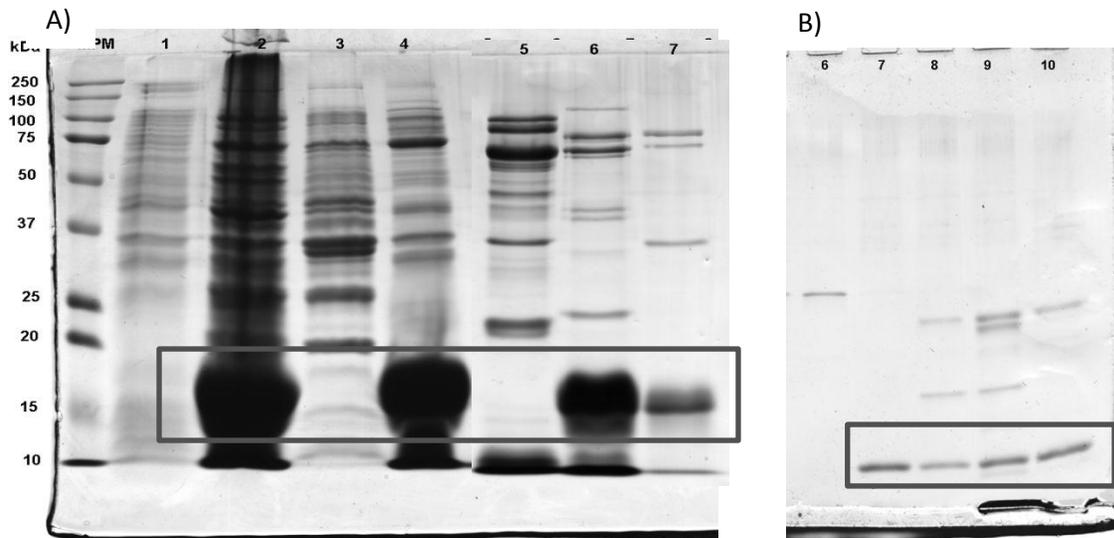


Figura 15. Seguimiento de la purificación para las proteínas mutantes CaM M124C y CaM V39C/L91C. A) Gel 1D SDS-PAGE 12% MPM: Marcador de peso molecular, Carril 1: Sobrenadante de las células DE3 antes de la lisis, Carril 2: Medio de cultivo después del sonicando las células, Carril 3: Frente de la cromatografía de intercambio hidrófobo; carril 4: pico A de la cromatografía de intercambio hidrófobo: Carriles 5, 6 y 7: correspondientes al pico 1, 2 y 3 de la cromatografía de intercambio iónico de la proteína mutante CaM V39C/L91C. B) Carriles 6, 7, 8, 9: correspondientes al pico 1, 2, 3 y 4 de la cromatografía de exclusion molecular de la proteína mutante CaM 124, carril 10: pico 2 de la cromatografía de intercambio iónico de la proteína mutante CaM V39C/L91C. El recuadro en la imagen A) y B) indica la banda de interés cercana a los 15 kDa cercanos al peso molecular de la proteína CaM (16.7 kDa)

6.3 Modificación química con los fluoróforos alexas

La proteína obtenida del proceso de purificación después de la desalación fue concentrada y cuantificada por medio del método de ácido bicinconílico (**Tabla 5**) y modificada químicamente con los fluoróforos Alexa350, Alexa488 y Alexa532.

Tabla 5: Cuantificación mediante el método del ácido bicinconílico para los seis biosensores.

Sitio mutado de la proteína CaM	Fuoroforo empleado p / marcaje (Alexa fluor)	Concentración De proteína modificada [μ M]	Sitio mutado de la proteína CaM	Fuoroforo empleado p / marcaje (Alexa fluor)	Concentración De proteína modificada [μ M]
L39C-V91C	350	222	M124C	350	392
	488	207		488	430
	532	139		532	392

Se construyeron seis bioensensores diferentes utilizando las dos mutantes (CaM M124C y CaM V39C/L39C) y tres fluoróforos (Alexa350, Alexa-488 y Alexa-532).

6.4 Ensayos de unión del inhibidor clásico CPZ y rendimiento cuántico ϕ

En la **Tabla 5** se presentan los resultados de unión de la CPZ y la eficiencia cuántica de los seis biosensores construidos. Todos los biosensores presentan K_d de la CPZ alrededor de 0.5μ M similar a otros biosensores construido con el fluoróforo monobromobimano en las mismas posiciones (CaM M124C-mBBr y CaM L39C-mBBr/V91C-mBBr) [47, 48]. Lo cual indica que la modificación química con los fluoróforos Alexas no desestabiliza la proteína y mantiene sus propiedades de unión para el inhibidor clásico CPZ. El porcentaje de apagamiento nos indica el grado de sensibilidad de la señal obtenida de cada sistema, en el caso de los biosensores con Alexa532 ambos presenta el mayor porcentaje de apagamiento con un 72.48 y 69.25 %, respectivamente. Mientras que los que presentan menor sensibilidad son los correspondientes al Alexa488 con un 9.35 y 9.58 %. La sensibilidad de los biosensores depende tanto de la posición seleccionada como del fluoróforo utilizado, siendo una propiedad intrínseca de cada sistema. El

rendimiento cuántico nos indica la eficiencia del fenómeno de fluorescencia, este parámetro está relacionado con el microambiente del fluoróforo. CaM M124C-Alexa350 es el biosensor con mayor ϕ ($\phi = 8.8$) alrededor de 17 veces más que el estándar de referencia (sulfato de quinina). El presentar una eficiencia cuántica alta de estos sistemas, se traduce en la optimización de los biosensores ya que se utiliza una menor cantidad de biosensor obteniendo la misma sensibilidad.

Tabla 6: Resultados del ensayo de unión del inhibidor CPZ y rendimiento cuántico ϕ .

Biosensor	Fluoróforo Alexa	KD	% de apagamiento	ϕ
CaM 124	350	0.632	38.73	8.885
	488	0.466	9.58	1.220
	532	0.697	69.25	1.589
CaM 3991	350	0.453	20.24	1.508
	488	0.550	9.35	0.554
	532	0.323	72.48	0.420

El bioensayo se realizó con 2 μM de cada biosensor y 10 μM de CaCl_2 , adicionando clorpromazina (CPZ) ha saturación. El Sulfato de Quinina fue utilizado como estándar para determinar la eficiencia cuántica ($\phi = 0.55$).

El cambio en la señal espectrometría de la fluorescencia de estos biosensores al adicionarle la CPZ es atribuida principalmente al cambio conformacional que presenta la CaM al unir sus ligandos, así como el cambio del microambiente de los fluoróforos y posiblemente a la unión directa de la CPZ con los fluoróforos.

En la **Figura 16**, se presentan los modelos tridimensionales del biosensor M124C-Alexa350 y los espectros de fluorescencia al titular este con la CPZ. Este biosensor presenta una eficiencia cuántica de 8.8 la cual es excelente en comparación con el estándar (sulfato de quinina 0.55), lo cual contribuye de manera significativa al aumento de la sensibilidad de esta construcción. El apagamiento en la fluorescencia se puede atribuir a los cambios conformacionales de la CaM al unir sus ligandos (CPZ), aunado a la transferencia directa de energía entre el fluoróforo y la CPZ, ya que esta posición interacciona directamente con algunos inhibidores clásicos como se muestra en el modelo tridimensional construido de este biosensor (**Figura 16**).

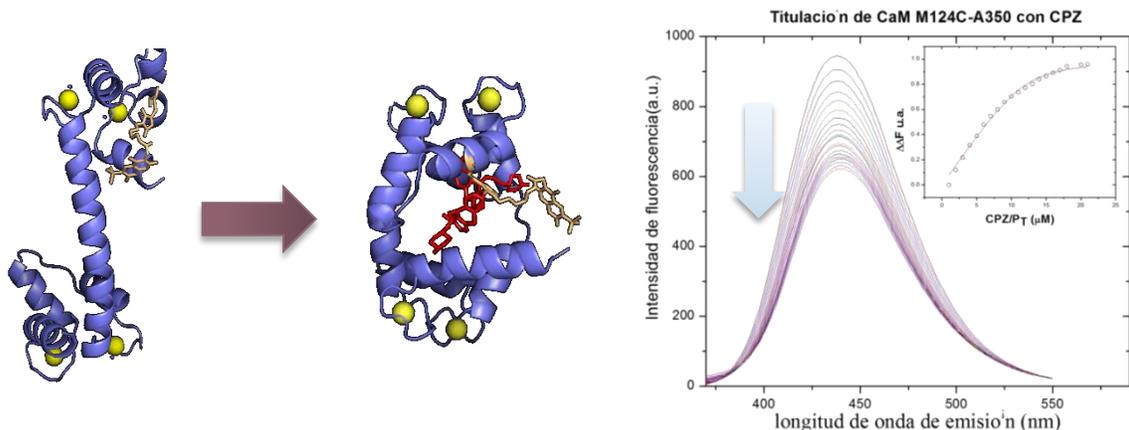


Figura 16: CaM M124C-Alexa350. Modelos tridimensionales del biosensor (izquierda). Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CPZ (derecha).

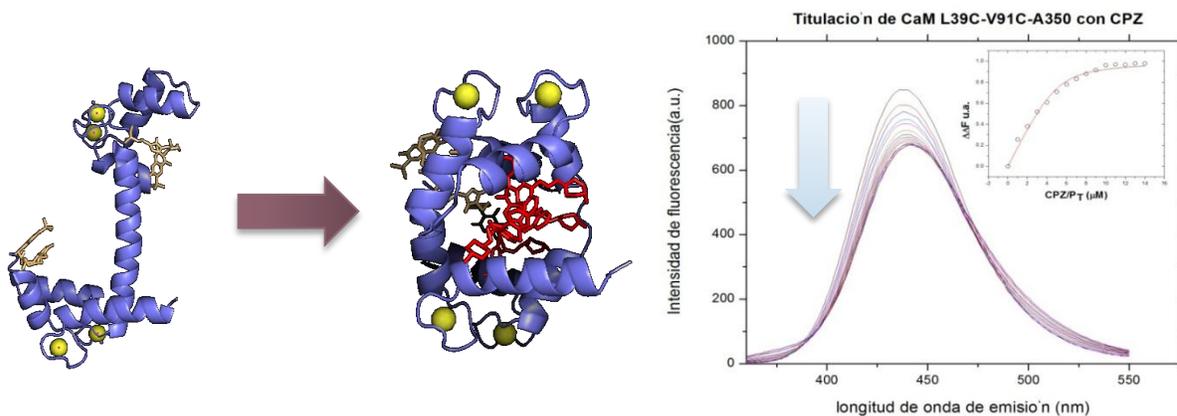


Figura 17: CaM L39C-Alexa350/V91C-Alexa350. Modelos tridimensionales del biosensor (izquierda). Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CPZ (derecha).

CaM L39C-Alexa350/V91C-Alexa350 presenta una eficiencia cuántica de 1.5, tres veces mayor que la quinina (0.55) y menor que el biosensor M124C-Alexa350. Esta característica puede explicarse observando el modelo tridimensional de la conformación cerrada (**Figura 17**), donde observamos como los dos fluoróforos ubicados en las posiciones 39 y 91, no interactúan del todo dentro del bolsillo lipofílico y tampoco tienen contacto directo con la CPZ. Lo cual hace que tanto la eficiencia cuántica como el apagamiento de la fluorescencia sean menores.

En cuanto a los biosensores construidos con el fluoróforo Alexa488 se observa el mismo comportamiento en cuanto a la eficiencia cuántica mayor para el CaM M124C-Alexa488 ($\phi=1.22$) y menor para CaM L39C-Alexa488/V91C-Alexa488 (0.55). El porcentaje de apagamiento de la fluorescencia al unir la CPZ en CaM M124C-Alexa488 es bajo (~10%) en comparación con los otros sistemas donde se utilizó el Alexa350 y Alexa532. Sin embargo, un margen del 10% de la señal total obtenida de este sistema no repercute en la calidad del biosensor, aunado a la posibilidad de monitorear una gran cantidad de compuestos que absorban a longitud de onda menor a los 450nm sin interferencia alguna (Figura 18). El biosensor CaM L39C-Alexa488/V91C-Alexa488 presenta un aumento en la señal fluorescente (Figura 19), este aumento en la señal puede ser atribuido a una conjugación entre los dos fluoróforos y la CPZ. Este biosensor presenta un efecto batocromico apreciable en el espectro de fluorescencia, entre los 570 y 600 nm.

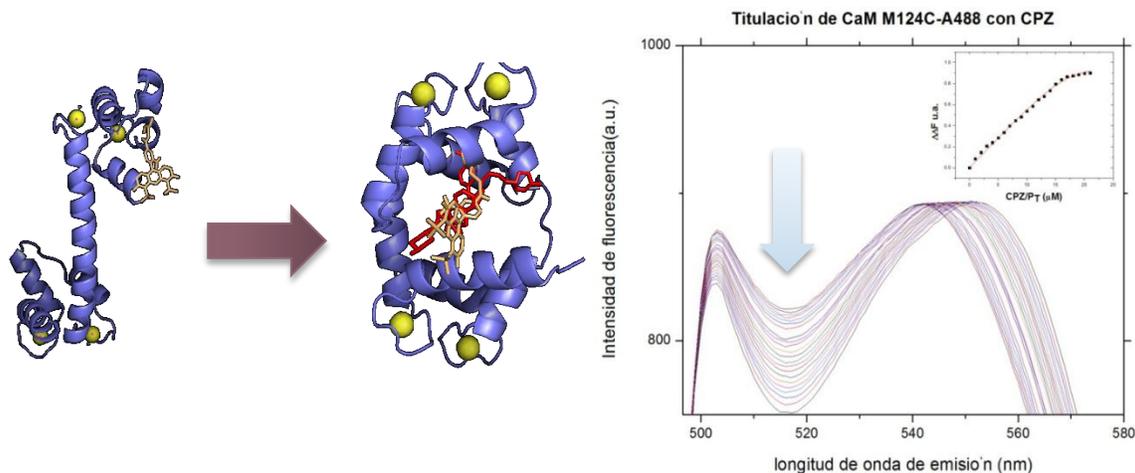


Figura 18: CaM M124C-Alexa488. Modelos tridimensionales del biosensor (izquierda). Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CPZ (derecha).

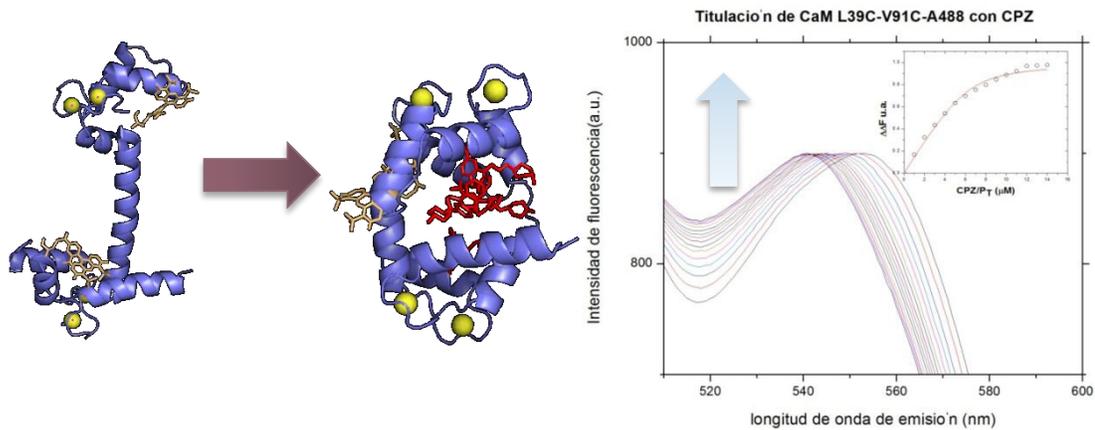


Figura 19: CaM L39C-Alexa488/V91C-Alexa488. Modelos tridimensionales del biosensor (izquierda). Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CPZ (derecha).

Por último los biosensores modificados con Alexa 532 muestran el mismo comportamiento que los construidos con Alexa488. El biosensor con un solo fluoróforo tiene un alto porcentaje de apagamiento de la fluorescencia al unir la CPZ (69 %) y CaM L39C-Alexa-532/V91C-Alexa-532 aumenta la fluorescencia y desplaza el espectro hacia longitudes de onda menores (Figura 20 y 21, respectivamente). En lo que respecta a la ϕ esta se encuentra en valores aceptable en ambos casos, para el sistema con un solo fluoróforo es tres veces mayor que el estándar y en el caso de la CaM L39C-Alexa-532/V91C-Alexa-532 es similar a la quinina.

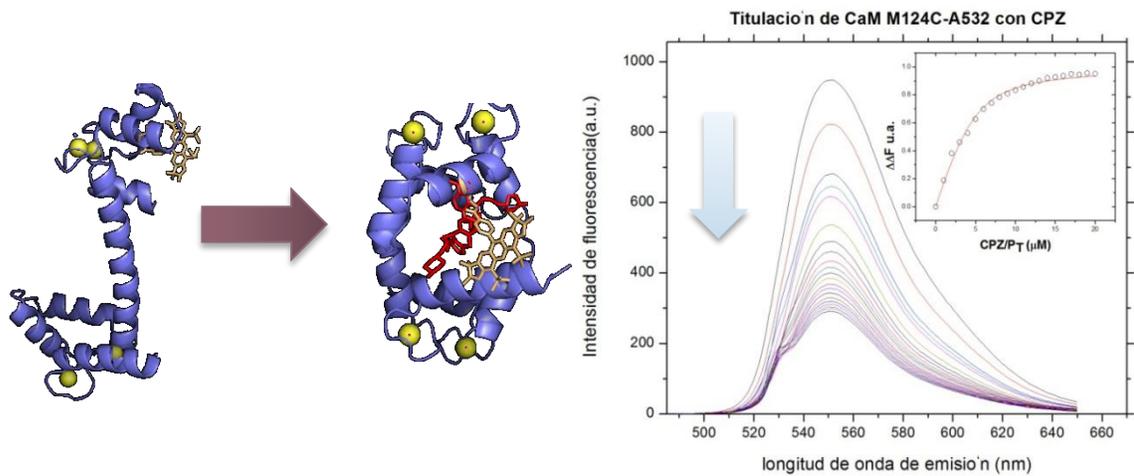


Figura 20: CaM M124C-Alexa532. Modelos tridimensionales del biosensor (izquierda). Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CPZ (derecha).

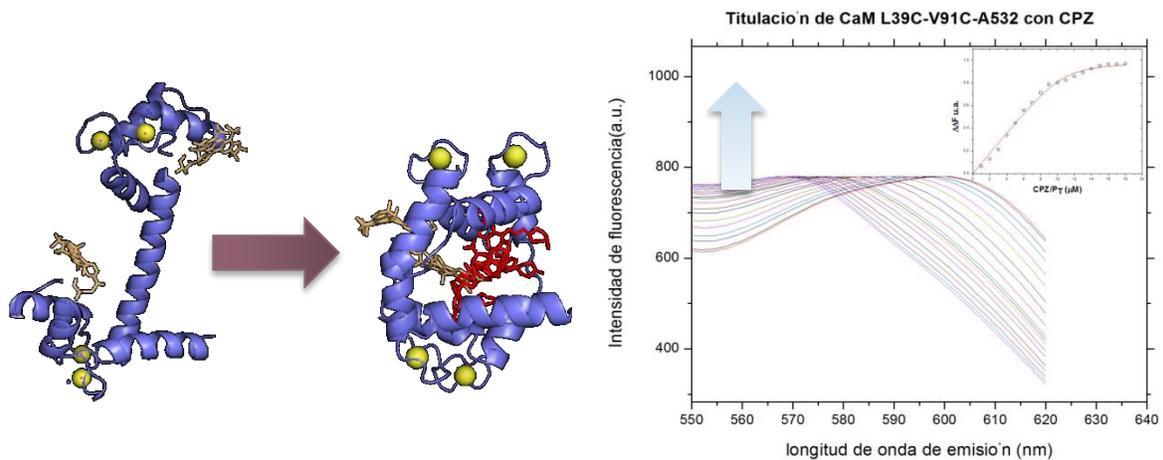


Figura 21: CaM L39C-Alexa-532/V91C-Alexa-532. Modelos tridimensionales del biosensor (izquierda). Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CPZ (derecha).

7. CONCLUSIONES

Se logró reproducir de manera exitosa el proceso de expresión y purificación de dos mutantes de la proteína CaM (CaM M124C y CaM L39C-V91C) las cuales fueron diseñadas previamente para obtener biosensores eficientes [43, 48].

Se construyeron seis nuevos biosensores con estas dos mutantes y tres fluoróforo (Alexas 350, 488 y 532) a través de una modificación química. Todos los biosensores muestran funcionalidad al ser utilizados como monitores de la unión de la CPZ, con K_{ds} similares a otros biosensores reportados previamente (CaM M124C-mBBR). Por lo que se asume que las modificaciones químicas con la serie de fluoróforo Alexas no desestabilizan a la proteína de manera significativa. En lo que respecta a la sensibilidad de estos sistemas, reflejada por la eficiencia cuántica, todos los biosensores a excepción de CaM L39C-Alexa532/V91C-Alexa532 tienen una ϕ mayor a la del estándar utilizado (quinina). De manera general se observa que los biosensores con un solo fluoróforo en la posición 124 tienen una mejor sensibilidad y presentan una mejor respuesta a la unión de la CPZ. El mejor biosensor de esta serie es el CaM M124C-Alexa350, ya que este tiene la mayor eficiencia cuántica y el mejor porcentaje de apagamiento de la fluorescencia al unir el ligando CPZ, lo que se reflejara en una alta sensibilidad y un margen menor de error en la respuesta del mismo.

Estos nuevos biosensores aumentan el rango de análisis sin interferencia para una amplia variedad de compuestos que presentan cromóforos en su estructura, que absorben a diferentes longitudes de onda. Teniendo más alternativas para la búsqueda y análisis selectivo de moléculas bioactivas cuyo blanco molecular sea la proteína calmodulina.

8. Referencias

1. Martí, F.B., *Química analítica cualitativa*. 2002: Thomson.
2. Alegret, S., M. Valle, and A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores : curso teórico-práctico*. 2004: Universitat Autònoma de Barcelona.
3. Serna, A., F. Ros, and J.C. Rico, *GUÍA PRÁCTICA DE SENSORES (Ebook)*: Creaciones Copyright SL.
4. Valcárcel, M., *Automatización y miniaturización en química analítica*. 2000: Springer Verlag Ibérica.
5. Pérez, P.A.C., *Aplicaciones de la ingeniería electrónica e informática en medicina*. 2007: Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.
6. Rodríguez, F.C., *Biotecnología ambiental*. 2005: Tébar.
7. Areny, R.P., *Sensores y acondicionadores de señal*. 2004: Marcombo.
8. Heldman, D.R., *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering (Print)*. 2003: Taylor & Francis.
9. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2007: Springer.
10. Valeur, B. and M.N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2013: Wiley.
11. Demchenko, A.P., *Introduction to Fluorescence Sensing*. 2008: Springer.
12. Kobayashi, H., M. Ogawa, R. Alford, P.L. Choyke, and Y. Urano, *New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging*. *Chem Rev*, 2010. **110**(5): p. 2620-40.
13. Lakowicz, J., *Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. Lakowicz, Editor. 2006, Springer US. p. 27-61.
14. Rodríguez M, R.W., *MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGIA*. 2006, México: UNAM. 55.
15. Connors, K.A., *Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento)*. 1981: Reverté.
16. Valeur, B. and J.C. Brochon, *New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Applications to Chemical and Life Sciences : With 187 Figures and 39 Tables*. 2001: Springer.
17. Didenko, V.V., *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*. 2006: Humana Press.
18. Machan, R. and T. Wohland, *Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems*. *FEBS Lett*, 2014. **588**(19): p. 3571-84.
19. Albani, J.R., *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. 2008: Wiley.
20. Dewar, M.J.S. and R.C. Dougherty, *Teoría de las perturbaciones de los orbitales moleculares (PMO) en química orgánica*. 1980: Reverté.
21. Salvador, E.F., *Síntesis y estudio fotofísico de sondas fluorescentes: seguimiento de procesos de fotopolimerización y fotodegradación: aplicación en adhesivos*, in 2001. 2001, Universidad Complutense de Madrid: España. p. 213.
22. Rauk, A., *Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry*. 2004: Wiley.
23. Fernández, J.B., E.R. Koroutcheva, and J.M.P. Ruiz, *Temas de biofísica*. 2012: UNED.
24. Jabłoński, A., *Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren*. 1935: J. Springer.
25. Sathyanarayana, D.N., *Vibrational Spectroscopy: Theory And Applications*. 2007: New Age International (P) Limited.

26. Pathrose, B., H. Sahira, V.P. Nampoori, P. Radhakrishnan, and A. Mujeeb, *Variations in fluorescence quantum yield of basic fuchsin with silver nanoparticles prepared by femtosecond laser ablation*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2014. **128**: p. 522-6.
27. Nagaraja, D., R.M. Melavanki, N.R. Patil, and R.A. Kusanur, *Solvent effect on the relative quantum yield and fluorescence quenching of 2DAM*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. **130**(0): p. 122-128.
28. Reija Otero, B., *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*. 2007: Univ Santiago de Compostela.
29. Olsen, E.D., *Métodos ópticos de análisis*. 1990: Reverté.
30. Resch-Genger, U., M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann, *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nat Meth, 2008. **5**(9): p. 763-775.
31. Sciences, A. *Site Specific Protein Modification*. 2014; Available from: <http://www.almacgroup.com/wp-content/uploads/Site-Specific-Protein-Modification.pdf>.
32. Zhang, W.H., G. Otting, and C.J. Jackson, *Protein engineering with unnatural amino acids*. Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(4): p. 581-7.
33. Coons, A.H. and M.H. Kaplan, *LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS: II. IMPROVEMENTS IN A METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIGEN BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY*. The Journal of Experimental Medicine, 1950. **91**(1): p. 1-13.
34. Holmes, K.L. and L.M. Lantz, *Protein labeling with fluorescent probes*. Methods Cell Biol, 2001. **63**: p. 185-204.
35. Basle, E., N. Joubert, and M. Pucheault, *Protein chemical modification on endogenous amino acids*. Chem Biol, 2010. **17**(3): p. 213-27.
36. Saavedra, A.V., *Anestesia Intravenosa*. 2008: Editorial Medica Panamericana Sa de.
37. Larios, H.M., *Biología Celular Y Molecular*. 2002: Pearson Educación.
38. Gonzalez-Andrade, M., J. Rivera-Chavez, A. Sosa-Peinado, M. Figueroa, R. Rodriguez-Sotres, and R. Mata, *Development of the fluorescent biosensor hCalmodulin (hCaM)L39C-monobromobimane(mBBr)/V91C-mBBr, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium*. J Med Chem, 2011. **54**(11): p. 3875-84.
39. Alvarado Mora, M.E., *Estudio de la expresión de calmodulina y detección de posibles cambios en transducción de señales durante los procesos de diferenciación del parásito Giardia intestinalis / Study of calmodulin expression and detection of changes in signal transduction pathways during the differentiation processes of parasite Giardia intestinalis*, in *Química*. 2009, Universidad Nacional de Colombia. p. 145.
40. Guo, T., B.R. Fruen, F.R. Nitu, T.D. Nguyen, Y. Yang, R.L. Cornea, and D.M. Bers, *FRET detection of calmodulin binding to the cardiac RyR2 calcium release channel*. Biophys J, 2011. **101**(9): p. 2170-7.
41. Osterhoff, M., M. Mohlig, M. Schwanstecher, J. Seufert, J. Ortmann, H. Schatz, and A.F. Pfeiffer, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta2 regulates gene expression of insulin in INS-1 rat insulinoma cells*. Cell Calcium, 2003. **33**(3): p. 175-84.
42. Shim, J.S., J. Lee, K.N. Kim, and H.J. Kwon, *Development of a new Ca²⁺/calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(3): p. 747-51.
43. Gonzalez-Andrade, M., M. Figueroa, R. Rodriguez-Sotres, R. Mata, and A. Sosa-Peinado, *An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein*. Anal Biochem, 2009. **387**(1): p. 64-70.
44. Romoser, V.A., P.M. Hinkle, and A. Persechini, *Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent*

- protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators.* J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13270-4.
45. Yang, J.-H., M. Degawa, K.-S. Song, C. Wang, and H. Kawarada, *Fabrication of calcium ion sensitive diamond field effect transistors (FETs) based on immobilized calmodulin.* Materials Letters, 2010. **64**(21): p. 2321-2324.
 46. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
 47. Gonzalez-Andrade, M., M. Figueroa, R. Rodriguez-Sotres, R. Mata, and A. Sosa-Peinado, *An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein.* Analytical Biochemistry, 2009. **387**(1): p. 64-70.
 48. Gonzalez-Andrade, M., J. Rivera-Chavez, A. Sosa-Peinado, M. Figueroa, R. Rodriguez-Sotres, and R. Mata, *Development of the fluorescent biosensor hCalmodulin (hCaM)_{L39C}-monobromobimane(mBBr)/V91C-mBBr, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium.* Journal of medicinal chemistry, 2011. **54**(11): p. 3875-84.