



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en física

**Estudio de segregación de microfases por transiciones
líquido-líquido en polipéptidos sensibles a estímulo**

Autor:

Martín Gómez Redondo

Tutor/es:

José Carlos Rodríguez Cabello

Ángel Carmelo Prieto Colorado

AGRADECIMIENTOS.

A mi madre Amor y a mi segunda madre Oba, porque todo lo que soy, lo soy por vosotras.

A Álex, porque desde el momento que te conocí supe que me enseñarías a ser quien soy.

A Isra y a Carlos, por haberme enseñado con tanta paciencia y haberme permitido trabajar junto a ellos en Bioforge.

Y a mis amigos: Lope, Luca, Úrsula, Esteban y a todos los demás por este viaje juntos tan divertido.

RESUMEN.

Los nuevos descubrimientos en materia de biomateriales han supuesto una auténtica revolución en la ciencia de materiales y la biomedicina. En este proyecto se trabajará con un Elastin-like recombinamer, un biopolímero con propiedades fisicoquímicas muy interesantes y con aplicaciones muy útiles y variadas. Los ELR se caracterizan por tener una transición de fase líquido-líquido reversible a una cierta temperatura, denominada temperatura de transición. Por debajo de dicha temperatura, el polímero se encuentra en su estado disuelto. Una vez se supera la temperatura de transición, el ELR comienza a formar estructuras estables y regulares en la disolución. Se estudiará dicha temperatura con técnicas de caracterización y se analizará el comportamiento de la temperatura de transición cuando el polipéptido es sometido a un proceso de fosforilación. Para la caracterización emplearemos diferentes técnicas que nos permitirán analizar el polipéptido desde diferentes puntos de vista.

ABSTRACT.

The new discovers in biomaterials have supposed a genuine revolution in science materials and biomedicine. In this project we will work with an Elastin-like recombinamer, a biopolymer with physicochemical properties really useful and varied. The ELR are characterized because they have a liquid-liquid and reversible phase transition at certain temperature, which we call transition temperature. Above this temperature, the ELR starts forming stable and regular structures in the solution. We will study this temperature with characterization techniques, and we will analyze the behavior of this temperature when the polypeptide suffers a phosphorylation process. For the characterization we will use different techniques that will allow us to study the polypeptide from different points of view.

Índice

1. Introducción.	5
1.1. Biomateriales y biopolímeros.	6
1.2. Elastin-Like Recombinamers.	7
1.2.1. Los aminoácidos.	7
1.2.2. Las proteínas.	9
1.2.3. La elastina.	10
1.2.4. Elastin-Like Polypeptids y Elastin-Like Recombinamers.	10
1.3. Fosforilación y ELRs fosforilables.	13
1.4. Objetivos.	14
2. Materiales y métodos.	15
2.1. Métodos.	15
2.1.1. Calorimetría diferencial de barrido.	15
2.1.2. Turbidimetría.	16
2.1.3. Dispersión dinámica de luz.	17
2.1.4. Dispersión de luz electroforética.	17
2.1.5. TIK y fosforilación.	18
2.1.6. Diálisis.	21
2.1.7. Liofilización.	21
2.2. Materiales.	21
2.2.1. Materiales de laboratorio.	21
2.2.2. Balanza de precisión.	23
2.2.3. Medidor de pH.	23
2.2.4. Termobloque.	26
2.2.5. Cámara frigorífica.	27
2.2.6. Centrífuga.	27

2.2.7.	Espectrofotómetro.	28
2.2.8.	Calorímetro de barrido diferencial.	29
2.2.9.	ZetaSizer.	30
3.	Resultados.	33
3.1.	TIK no fosforilado.	33
3.1.1.	Turbidimetría.	33
3.1.2.	Calorimetría diferencial de barrido.	33
3.1.3.	Tamaño de partícula.	35
3.1.4.	Potencial zeta.	37
3.2.	TIK fosforilado.	37
3.2.1.	Turbidimetría.	37
3.2.2.	Calorimetría diferencial de barrido.	38
3.2.3.	Tamaño de partícula.	38
3.2.4.	Potencial Zeta.	40
3.3.	Otros resultados de interés.	40
4.	Discusión de los resultados.	42
4.1.	Efectos de la fosforilación.	42
4.2.	Efectos de la salinidad.	43
4.3.	Efectos de pH.	44
5.	Conclusiones.	45
5.1.	Conclusiones generales.	45
5.2.	Posibles ampliaciones a este trabajo.	46
5.3.	Conclusiones personales.	46

1. Introducción.

La evolución de la tecnología y los nuevos descubrimientos del siglo XX y XXI han ido siempre muy ligados a la trayectoria de la física y sus estudios. A medida que el desarrollo tecnológico avanza, este mismo requiere nuevos conocimientos e investigaciones que la ciencia toma como suyos y que a día de hoy se han convertido en una auténtica carrera de fondo. Un claro ejemplo de esto son los nuevos materiales avanzados que aparecen como respuesta a una necesidad en el desarrollo del ser humano. Nuevos descubrimientos requieren nuevas características y propiedades cada vez más exigentes y por tanto, materiales que sean capaces de satisfacer estas exigencias. Un ejemplo de esta situación son los grandes avances en materia de medios de transportes que exigen materiales con propiedades nuevas como la superconductividad que permiten mejoras en velocidad y seguridad [1]. En el campo de la biomedicina las nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento son capaces de detectar y curar enfermedades en tiempos récord que antes eran responsable de la muerte de miles de personas [2]. Los nanomateriales y la biotecnología abren nuevas oportunidades en este campo que hasta hace pocos años eran imposibles de imaginar.

De hecho, los descubrimientos en materiales siempre han evolucionado en paralelo junto el ser humano y su historia desde sus inicios, definiendo incluso las diferentes eras por las que ha pasado el ser humano: la edad de piedra, bronce y hierro [3]. Por tanto, la física de nuevos materiales suponen un campo de conocimiento totalmente abierto y en constante evolución. Los materiales avanzados juegan un papel de vital importancia en nuestra sociedad pues suponen la base de todos los nuevos descubrimientos que sustentan la tecnología, la industria, el comercio, la medicina y muchas otras áreas importantes en nuestro actual mundo [3].



Figura 1: Flechas de sílex fabricadas durante el neolítico. De Didier Descouens.

A lo largo de la historia los nuevos materiales han evolucionado adaptándose a las necesidades y posibilidades existentes. Durante el siglo pasado la física de la materia condensada fue capaz de explorar una escala nunca abordada hasta ese momento: la escala nanométrica [4]. El conocimiento en materia de física cuántica, atómica y molecular permitió a los investigadores comprender las leyes físicas que gobiernan los sistemas nanométricos y como su comportamiento difiere mucho de los sistemas de mayor escala estudiados hasta ese momento. Además, las nuevas técnicas experimentales permitieron a los investigadores realizar

grandes avances en torno a este tema. Gracias a estos trabajos aparecieron los nanomateriales. Estos materiales se caracterizan por poseer un tamaño que se encuentra en una escala entre lo microscópico ($1 \mu m$) y lo atómico ($0.2 nm$) [5]. Los sistemas nanométricos poseen propiedades y comportamientos muy particulares que permiten encontrar aplicaciones modernas y adaptativas que revolucionan a día de hoy la tecnología y la vida del ser humano. Las posibilidades que proporcionan son muy variadas y abarcan campos muy diferentes como la medicina, la informática, la industria, la electrónica o el medio ambiente [6] [7]. Las aplicaciones en la medicina son de especial interés pues proporcionan una gran cantidad de soluciones ante problemas muy graves que afectan a nuestra sociedad de manera muy profunda. Un ejemplo de esto es la utilización de nanopartículas de oro para la detección del cáncer [8] o el uso de biopolímeros con aplicaciones biomédicas como la liberación de medicamentos o como marcadores para la detección de enfermedades [9].

1.1. Biomateriales y biopolímeros.

Los biomateriales son compuestos que interaccionan de alguna forma con un sistema biológico y que tienen aplicaciones en la medicina moderna. Su característica principal es la biocompatibilidad [10], es decir, la habilidad del biomaterial a no ser rechazado por el cuerpo humano. Cuando un agente externo se introduce en un sistema vivo, el sistema inmunológico del organismo puede tratar de rechazarlo generando una respuesta inmune o una reacción alérgica. Otra opción indeseable es que el biomaterial genere un daño o enfermedad en el cuerpo, como aquellos compuestos que son cancerígenos o genotóxicos. Los biomateriales, por tanto, son aquellos capaces de evitar estas situaciones.



Figura 2: Matriz de colágeno, un biopolímero natural utilizado en reparación de tejidos. De BMEiscoo.

Los biomateriales pueden ser de tipo cerámico, polimérico o metálico o una composición de alguno de ellos [11]. Las aplicaciones que poseen son tremendamente variadas, desde

la sustitución de tejidos vivos en ingeniería tisular [12], las prótesis [13] o la utilización de biopolímeros para detección de enfermedades o liberación de medicamentos [14]. Todas estas aplicaciones han supuesto una revolución en el mundo de la ciencia de materiales pues hemos pasado en muy pocos años de utilizar materiales tremendamente rudimentarios y no preparados para la biocompatibilidad al diseño y síntesis de compuestos especialmente preparados para la aplicación a la medicina y la mejora en la vida de las personas que ello conlleva.

En este proyecto son de especial interés los **biopolímeros**. Un polímero es una macromolécula que contiene unidades estructurales que se repiten a lo largo de su estructura química [15]. Estas unidades son conocidas como monómeros. Los polímeros poseen infinitas formas y características y su uso se ha generalizado en la vida cotidiana del ser humano a lo largo de los últimos años. Algunos ejemplos de polímeros son el polietileno, el nailon o el teflón. Por otra parte, los biopolímeros son una clase especial de polímero que se caracterizan por ser producidos a través de organismos vivos y por ser biocompatibles con la vida. Algunos biopolímeros están presentes en el cuerpo humano de forma natural, como las proteínas de los tejidos animales o vegetales [16]. En el caso de las proteínas los monómeros son aminoácidos que se unen a través del enlace peptídico [17]. Sin embargo, en los últimos años han aparecido nuevas tecnologías que nos permiten emplear organismos vivos (generalmente bacterias) capaces de producir cierto tipo de biopolímeros a partir de técnicas genéticas y moleculares. Un ejemplo de estos materiales son los Elastin-Like Recombinamers que se detallarán en las secciones sucesivas [18].

Los biopolímeros por tanto, poseen la versatilidad ofertada por los polímeros con características muy variadas y propiedades muy diferentes en función de su estructura química pero con la gran ventaja de poseer esa biocompatibilidad que permite su uso en aplicaciones biomédicas. Además, estos compuestos suelen ser biodegradables y su producción no emite contaminación por lo que su síntesis y utilización no es dañino para el medio ambiente [19].

1.2. Elastin-Like Recombinamers.

1.2.1. Los aminoácidos.

Los aminoácidos (AA) son biomoléculas de gran importancia en el funcionamiento del organismo de los seres vivos. Su nombre proviene de su estructura química, pues todos ellos se caracterizan por la presencia de un grupo amino ($-\text{NH}_2$) en un extremo de la molécula y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) en el otro extremo, ambos unidos químicamente a un carbono central llamado carbono alfa [20]. En los otros dos extremos de la molécula encontramos un hidrógeno y un radical químico variable conocido como R [21]. Estas moléculas se pueden polimerizar y formar proteínas como se explicará en la siguiente sección. Los aminoácidos que pueden formar estas biomoléculas para la mayoría de los seres vivos son 20 de los más de 500 presentes en la naturaleza y se encuentran codificados genéticamente en nuestro genoma [22]. Este grupo de 20 está formado por: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glutamato o ácido glutámico, glicina, prolina, serina y la tirosina.

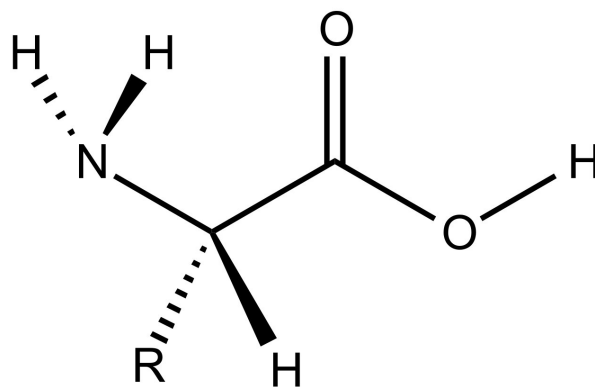


Figura 3: Estructura general de un aminoácido.

Todas estas moléculas tienen un código determinado para facilitar su nomenclatura y puede ser de una letra o de tres [23]. Este código se muestra en el cuadro 1.

Aminoácido	Código de una letra	Código de tres letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Aspartato	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Glutamato	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

Cuadro 1: Nomenclatura de los aminoácidos.

Los aminoácidos no presentan un estado de protonación similar entre ellos a pesar de que todos ellos dispongan de un grupo amino y un grupo carboxilo. Esto es debido a la naturaleza del radical R y por tanto, todos ellos presentan un comportamiento ácido-base distinto [24]. Además, los aminoácidos son moléculas anfóteras, es decir, presentan comportamientos ácidos o básicos en función del pH del medio en el que se encuentran [25].

Existen multitud de clasificaciones de estos compuestos, pero la clasificación según la carga o polaridad del radical [25] es la más interesante para este proyecto. Dentro de esta clasificación podemos encontrar:

- Aminoácidos neutros e hidrófilos: Ser, Thr, Gln, Asn, Tyr, Cys, Gly.
- Aminoácidos neutros e hidrófobos: Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp.
- Aminoácidos ácidos, con carga negativa o radical con grupo carboxilo: Asp, Glu.
- Aminoácidos básicos, con carga positiva o radical con grupo $-NH_2$: Lys, Arg, His.

1.2.2. Las proteínas.

Las proteínas son macromoléculas formadas por la unión consecutiva de un gran número de aminoácidos (normalmente más de 300) a través de un enlace amida que se conoce como enlace peptídico [26]. Este enlace se caracteriza por la unión de el grupo amino y el grupo carboxilo de dos aminoácidos consecutivos y la pérdida de una molécula de agua [17]. La diferente composición de aminoácidos y el orden en el que van unidos en la cadena lineal configura las propiedades y características de la proteína. Son moléculas presentes en todos los organismos vivos y sus variadas funciones son de vital importancia en el funcionamiento de estos. Algunas de estas funciones son: función estructural, enzimática, reguladora de genes, homeostática, defensiva, transporte, contráctil y de reserva [27]. Así pues, las proteínas son macromoléculas de vital importancia en el desarrollo de un ser vivo. La síntesis de la proteína se produce en el interior de las células del organismo, concretamente en el ribosoma [28]. Los aminoácidos son transportados hasta ese lugar donde el ribosoma se encarga de su unión en función del código genético. Es, por tanto, la información genética de cada individuo la que proporciona la información a la célula acerca de qué secuencia de aminoácidos formar. De esta forma, cada célula producirá la proteína necesaria para satisfacer su función vital. Ejemplos de esto son las células del estómago, que producen enzimas digestivas o las células epiteliales, que sintetizan grandes cantidades de colágeno y elastina.

La cadena lineal de aminoácidos se conoce con el nombre de cadena polipeptídica o polipéptido. Sin embargo, las proteínas no poseen una estructura simplemente lineal, sino que se pliegan para adquirir una determinada forma que le concede a la molécula unas propiedades determinadas [26]. De hecho, esa forma característica de cada proteína y que depende de la secuencia de aminoácidos le concede a la proteína su función particular en el organismo vivo. El plegamiento de la proteína se divide en cuatro niveles de organización [26]: la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria es la secuencia lineal de la cadena de aminoácidos y las demás estructuras consisten en una serie de plegamientos consecutivamente más complejos. La estructura cuaternaria no siempre aparece y consiste en la unión de más de una cadena de aminoácidos [29].

En resumen, podemos afirmar que la función y propiedades de cada proteína vienen determinadas en parte por el orden de unión de los aminoácidos pero también por el nivel de estructura de estos cuando se pliegan sobre sí mismos.

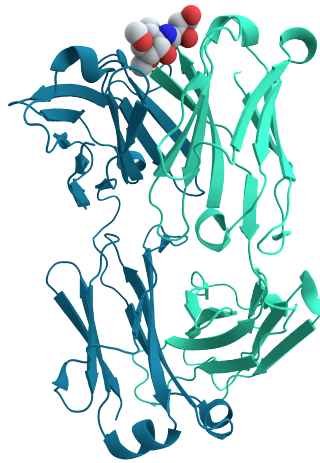


Figura 4: Diagrama de Ribbon de un anticuerpo. Los anticuerpos son moléculas proteicas con función defensiva. De Thomas Spletstoeser.

1.2.3. La elastina.

La elastina es una proteína presente en los tejidos de los organismos vivos y que posee funciones estructurales. Es responsable de la elasticidad de los tejidos, característica de la que procede su nombre [30]. Su estructura tiene una región hidrofóbica, responsable de la elasticidad de este polímero, y otra región hidrofílica. Ambas regiones se alternan consecutivamente a lo largo de la secuencia de aminoácidos. Esta proteína no posee una estructura secundaria estable y su cadena lineal posee gran cantidad de aminoácidos que se repiten en bloque, como VPG, VPGG, GVGVP [31]. El más común es el GVGVP [32] que se puede repetir hasta 11 veces en diferentes bloques y que sirve de base para el diseño de biopolímeros basados en esta proteína.

1.2.4. Elastin-Like Polypeptids y Elastin-Like Recombinamers.

Las interesantes propiedades fisicoquímicas de las proteínas han servido de inspiración en la ciencia de biomateriales para el diseño de polímeros basados en la estructura química de dichos polipéptido [33]. Los 20 aminoácidos naturales que existen se pueden combinar de innumerables maneras para poder obtener así materiales con propiedades muy especiales e interesantes, capaces de imitar químicamente las proteínas presentes en la naturaleza. Los Elastin-Like Polypeptids (ELPs) son polímeros basados en la estructura química de la elastina natural de los seres vivos [34]. La estructura química de estos polipéptidos está compuesta por una repetición de aminoácidos Val-Pro-Gly-X-Gly (VPGXG)_n [35], donde X es el aminoácido conocido como *quest residue*. Este aminoácido puede ser cualquiera excepto la prolina. Además, *n* es el número de veces que se repite la secuencia. Para garantizar un estricto control sobre la secuencia de aminoácidos presentes en el polipéptido se comenzaron a emplear técnicas de ADN recombinante (rDNA) [35] para su síntesis, dejando atrás otras técnicas de síntesis química que no permitían un control tan estricto en la formación de las

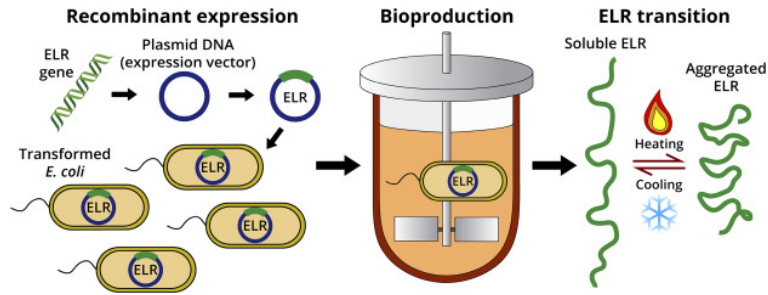


Figura 5: Representación esquemática de la vida de los ELRs. [9]

moléculas. A raíz de estas nuevas técnicas los ELPs comenzaron a llamarse **Elastin-Like Recombinamers (ELRs)**.

Por tanto, los ELRs son biopolímero o polipéptidos compuestos por la unión de aminoácidos a través del enlace peptídico e inspirados en la proteína elastina y sintetizados a través de técnicas de ADN recombinante.

El proceso para obtener estos polipéptidos es un proceso complejo. Para la síntesis de una proteína, se necesita en primer lugar la información genética que alberga la secuencia de aminoácidos que se deben unir para formar el polipéptido. En las células de los animales, esta información se encuentra en el genoma. La célula es capaz de interpretar dicha información y traducirla en proteínas a través de los ribosomas [28]. La ingeniería genética ha conseguido imitar este proceso natural y emplear el ADN para producir masivamente proteínas de forma artificial. Esta tecnología fue creada por Paul Berg [36] en los años 70 y se conoce como **tecnología del ADN recombinante**. Este proceso consiste en la selección de un gen de un organismo, introducirlo en otro (generalmente una bacteria o un virus) permitiéndole producir la proteína deseada. Al aislar el gen también es posible su modificación y alteración.

El primer paso para aislar el gen es cortarlo a través de enzimas de restricción, que permiten cortar las cadenas de ADN y generar pequeños trozos de material genético llamados fragmentos de restricción [37]. En segundo lugar, para introducir el material genético en la bacteria responsable de su síntesis empleamos plásmidos, que son moléculas de ADN que las bacterias son capaces de leer y traducir para la síntesis de la proteína determinada. A través de diferentes enzimas, es posible introducir los fragmentos de restricción en los plásmidos [38]. Una vez disponemos del plásmido modificado, podemos introducirlo en una colonia de bacterias y así comenzar su síntesis [39]. Este último proceso se suele realizar en biorreactores que permiten tener un control en el proceso de producción de la colonia de bacterias.

Los ELRs son realmente interesantes desde el punto de vista fisicoquímico pues presentan características que los diferencian de otros materiales empleados en la industria y la medicina hasta ahora. Estos polímeros presentan un aspecto algodonoso y un color blanquecino. Su principal característica es la presencia de una transición de fase reversible a una cierta temperatura llamada **temperatura de transición, T_t** , cuando el polímero se encuentra en disolución [9]. Por debajo de esta temperatura, las moléculas de los ELRs permanecen extendidas y libres. Además, los radicales de los aminoácidos del polipéptido se encuentran hidratados. Por todo esto, por debajo de la temperatura T_t los ELRs se encuentran en su

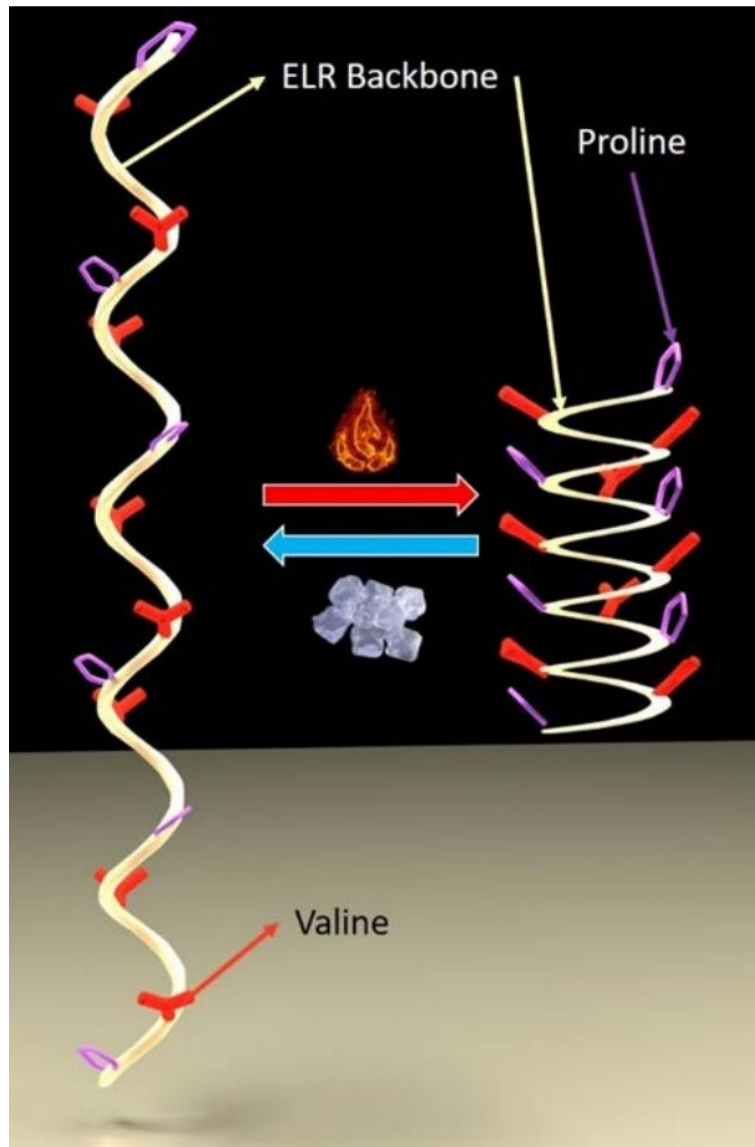


Figura 6: Representación esquemática de la transición reversible de un ELR. [35]

forma disuelta. Una vez se supera la temperatura de transición, las cadenas de aminoácidos pierden las moléculas de agua y se produce una formación de estructuras mediante el plegamiento de las cadenas lineales y el contacto de las zonas hidrófobas del polímero [40]. Cuando esto ocurre, aparecen agregados, nanopartículas u otras estructuras que dependen de la composición química del ELR particular y se observa una transición en la disolución. La transición es reversible, es decir, cuando la temperatura vuelve a descender por debajo de la temperatura de transición, el polipéptido absorbe otra vez moléculas de agua, impidiendo el contacto de las zonas hidrófobas y a su vez evitando el plegamiento de la molécula [40].

El valor de esta temperatura de transición depende de la estructura química del material (masa molecular y composición química), de la concentración del polipéptido en la disolución y de la presencia de iones u otras moléculas [41]. La versatilidad en la composición química de los ELRs permite por tanto modular dicha temperatura de transición y es esta propiedad

la que confiere a estos materiales avanzados un especial interés en cuanto a su aplicación [18]. Las estructuras que se forman en la disolución presentan una gran variabilidad. Estas estructuras pueden ser, en general, micelas, nanopartículas, hidrogéles, films o nanofibras [35]. Estos materiales pueden ser diseñados para formar una estructura determinada y que transicione a una determinada temperatura. Además, existen numerosos estudios que muestran la gran biocompatibilidad que presentan estos materiales, confiriéndoles así el título de biomateriales que pueden servir de aplicación en el campo de la biomedicina [35].

Las principales aplicaciones de estos biomateriales actualmente son [35], [9], [18]:

- Liberación de genes (ADN, ARN) en células diana y liberación de medicamentos a través del acoplamiento de las moléculas a liberar con el ELR. Una vez ensambladas ambas moléculas, es posible hacerlas circular a través del organismo y que mediante un cambio de fase del ELR, ambas moléculas se separen y el medicamento o el fragmento de material genético quede liberado en la célula diana.
- Hidrogéles para aplicaciones en ingeniería tisular. La ingeniería de tejidos consiste en la utilización de células vivas y biomateriales para restaurar, mantener o regenerar tejidos dañados del cuerpo humano. Los hidrogeles formados por los ELR son de especial interés para formar estructuras tipo andamio para que las células formen órganos y tejidos artificiales.
- Utilización de ELRs para superficies biofuncionales. Estos materiales son capaces de formar sistemas híbridos con otros materiales de diversas naturalezas para formar morfologías y estructuras funcionales para un diverso rango de aplicaciones.

1.3. Fosforilación y ELRs fosforilables.

La fosforilación consiste en la adición de un grupo fosfato (PO_4^{3-}) a cualquier otra molécula [42]. Es un proceso de vital importancia en el sistema metabólico de los organismos vivos pues constituye un proceso fundamental para almacenar y transportar energía que utilizan las células para realizar sus procesos vitales. Mediante una fosforilación de adenosín difosfato (ADP) podemos obtener adenosín trifosfato (ATP), molécula que sirve para que las células obtengan energía y así poder llevar a cabo otros procesos energéticamente desfavorables [43]. Este proceso se conoce como fosforilación oxidativa y el ATP obtenido se considera como una *moneda de cambio* de energía en los procesos metabólicos.

Otras biomoléculas también se pueden fosforilar. Para este proyecto es especialmente interesante la fosforilación de proteínas [44]. En este caso se trata de la adición de uno o varios grupos fosfato a la cadena de aminoácidos a través de sus radicales. Esta modificación genera cambios importantes en su conformación y, por tanto, en su función biológica [44]. De esta forma, mediante la fosforilación y desfosforilación (proceso inverso), se pueden alterar la conformación y propiedades de las proteínas. Este proceso es muy común en las enzimas, proteínas que actúan como catalizadores de reacciones químicas [21]. La molécula responsable de llevar a cabo este proceso de fosforilación en proteínas es la quinasa. La quinasa [45] es

capaz de romper una molécula de ATP, obteniendo un grupo fosfato y una molécula de ADP y posteriormente añadirle químicamente el fosfato a la proteína.

De igual forma que para el diseño y creación de los ELRs, este proceso natural ha servido de inspiración para la creación de polipéptidos de tipo ELR que se fosforilan. Estos ELRs poseen aminoácidos susceptibles de fosforilación repetidos a lo largo de su estructura, de tal forma que una vez se le ha incorporado el grupo fosfato mediante las quinasas [46], el polipéptido cambia de estructura química y se produce un **cambio en la temperatura de transición** propia de dicho polipéptido [35]. Los grupos fosfato incorporados a la cadena lineal de aminoácidos dificultan el contacto de las zonas hidrófobas de la cadena, obstaculizando así la formación de las nanoestructuras.

Las posibles aplicaciones de este ELR son muy interesantes, pues proporcionan una nueva dimensión a estos biomateriales [35]. Hasta ahora mediante la temperatura era posible controlar el estado conformacional del polipéptido, pudiendo pasar de un estado disuelto a la formación de estructuras en la disolución. Con esta clase de ELR, es posible transicionar del estado disuelto a la formación de estructuras a temperatura constante mediante una fosforilación. El especial interés de este proceso reside en que las células del cuerpo humano son capaces de realizar esta fosforilación [47] sin dificultades adicionales ya que se trata de un proceso idéntico al que se produce con las proteínas naturales.

1.4. Objetivos.

El principal objetivo de este trabajo consiste en la caracterización de un polímero del tipo ELR fosforilable. Concretamente estudiaremos su temperatura de transición, el tamaño de las estructuras que forma por encima de T_t y su potencial zeta. Para el estudio se realizará un análisis a través de diferentes técnicas de caracterización antes y después de la fosforilación para comprobar los efectos del proceso sobre las propiedades fisicoquímicas del polipéptido. El estudio se completará con un análisis en los cambios físicos ocurridos a raíz de la fosforilación.

Las técnicas que se van a emplear en el análisis son:

- Para el estudio de la temperatura de transición se empleará turbidimetría, gracias a un espectrofotómetro, y calorimetría diferencial de barrido (DSC) a través de un calorímetro de barrido diferencial.
- Para el estudio del tamaño de las estructuras se analizará la polidispersidad y el tamaño de partícula gracias a la técnica dispersión dinámica de la luz (DLS) y para el potencial Z se empleará la dispersión de luz electroforética (ELS). Ambas técnicas se realizan a través de un equipo llamado ZetaSizer.

Para el proyecto se empleará un polipéptido de tipo ELR conocido como TIK que presenta en su estructura química 10 secuencias susceptibles de sufrir una fosforilación [35]. Por esto, es esperable que una vez fosforilado completamente el polipéptido aumente notablemente

la temperatura de transición. Esto se debe a que, una vez añadidos los grupos fosfato, se dificultará el contacto entre zonas hidrófobas de las cadenas lineales dificultando así la formación de estructuras.

Por último, como se ha mencionado en anteriores secciones, la temperatura de transición también depende de la concentración de polímero en la disolución, de la presencia de otras moléculas y del pH de la disolución [48]. Por ello, se tratará de observar esta dependencia a través del estudio de diferentes disoluciones. Por una parte se empleará como disolvente agua milliQ para observar el comportamiento del material en este medio y en ausencia de otras sustancias salinas. En segundo lugar se utilizará buffer fosfato-salino (PBS), una disolución salina muy útil en el área de la investigación biomédica. Para poder trabajar en condiciones iguales de pH, se ajustará esta magnitud con sustancias ácidas o básicas para trabajar siempre en un mismo rango de pH.

2. Materiales y métodos.

En esta sección se detallarán en primer lugar los métodos empleados en este proyecto. Se explicarán los fundamentos físicos detrás de cada técnica de caracterización así como otros procedimientos propios de la biología molecular que se utilizaron en este trabajo. Por último, se hará una breve descripción de los materiales utilizados en los experimentos de este proyecto.

2.1. Métodos.

2.1.1. Calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido o DSC (Differential Scanning Calorimetry) es una técnica fundamental en la física de materiales y en muchas otras áreas de la ciencia. Su versatilidad y su alta sensibilidad lo convierten en una técnica fundamental para estudiar procesos térmicos. La técnica consiste en el estudio del cambio de la capacidad calorífica (c_p) de un material como consecuencia de un cambio en la temperatura [49]. Esta técnica se puede emplear para [50]:

- Medir temperaturas de transición o transformación, como por ejemplo, temperatura de transición vítrea, temperaturas de ebullición o la temperatura de transición de un ELR.
- Estabilidad térmica de materiales.
- Medidas de capacidad calorífica de materiales.
- Cinética de transformación de materiales, como en el caso de la cristalización.

Un equipo para realizar una DSC contiene dos crisoles o celdas que están diseñadas para estar siempre a la misma temperatura. En una de ellas se encuentra la muestra a analizar (S, sample) y en la otra una sustancia de referencia (R, reference). Ambas muestras se calientan a una velocidad constante. Cuando ocurre un cambio en la capacidad calorífica del material, en nuestro caso cuando se produce una transición del ELR, aparece una diferencia de temperatura entre ambos crisoles. El equipo contiene una célula de Peltier, que es responsable de transferir el calor entre ambas células por medio de una corriente eléctrica y como consecuencia de la aparición de una diferencia de voltaje [51]. El instrumento realiza este proceso hasta que la diferencia de temperatura entre ambas muestras vuelve a ser cero. Esta potencia eléctrica empleada es proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre los dos crisoles [52]. Las curvas que se emplearán para el análisis de la temperatura de transición del ELR serán una representación del flujo de calor proporcionado en función de la temperatura. En estas curvas deberá aparecer un pico en aquellas temperaturas en las que el polipéptido transiciona, ya que es en ese momento en el que aparece un cambio en la capacidad calorífica de la disolución.

La DSC proporciona muchísima información termodinámica sobre las transiciones del material, como por ejemplo los cambios en entalpía, entropía o capacidad calorífica [49] pero en este caso se empleará para observar simplemente a qué temperatura aparece la transición. La orientación del pico (hacia arriba o hacia abajo) proporciona información sobre el carácter endotérmico o exotérmico de la transición.

2.1.2. Turbidimetría.

La turbidez se define como la reducción de transparencia de un líquido como consecuencia de la aparición de sustancias en suspensión diferentes a las del propio líquido [53].

Al hacer pasar un haz de luz a través de una disolución con cierta turbidez, es posible medir la pérdida de intensidad lumínica cuando el haz de luz llega al otro lado de la disolución. Esta pérdida de luz es consecuencia de la dispersión de los rayos de luz al impactar contra las partículas en suspensión en la disolución. También es posible que se produzca un proceso de absorción a través de dichas partículas. En el caso de las disoluciones de los ELRs, podemos aprovechar estos procesos para medir la diferencia de turbidez entre dos muestras. En uno de las celdas se colocará la disolución con el ELR y en la otra se colocará una muestra de referencia que contenga solamente el disolvente empleado en ausencia de ELRs. Por debajo de T_t , la disolución es completamente transparente pues los ELRs se encuentran en su estado disuelto. Una vez superada dicha temperatura, la disolución comienza a enturbiarse debido a la aparición de nanoestructuras en suspensión. En este caso, la diferencia de turbidez entre ambas muestras es notable y medible. Gracias a un barrido de temperatura es posible medir la temperatura de transición, pues esta temperatura es a la cual aparece una diferencia entre las intensidades lumínicas que atraviesan las dos muestras.

2.1.3. Dispersión dinámica de luz.

La dispersión dinámica de luz o DLS (Dynamic Light Scattering) es una técnica que se emplea para medir el tamaño de partículas en suspensión en una disolución. También puede proporcionar información sobre la distribución de tamaño de las partículas. El principio fundamental de esta técnica se basa en los movimientos brownianos de las partículas cuando estas se encuentran suspendidas en una disolución. Para el análisis, se hace pasar un haz de luz a través de una disolución muestra [54]. Cuando la luz atraviesa la disolución, el movimiento browniano de las partículas provoca una fluctuación importante en la luz que ha sufrido un proceso de scattering. Por este motivo se conoce como dispersión dinámica, pues no analiza el scattering desde el punto de vista angular, sino la dinámica de las fluctuaciones de la luz que ha sido dispersada. El análisis de estas fluctuaciones proporciona información sobre la movilidad de las partículas, μ . La ecuación de Einstein-Smoluchowski [55]:

$$D = \mu \kappa_b T$$

donde κ_b es la constante de Boltzmann, T la temperatura y D la constante de difusión de la disolución, permite obtener una relación entre la movilidad medida y la constante de difusión de la disolución a estudiar. Con esta constante, se puede obtener el radio circular de las partículas (suponiéndolas esféricas en todo momento) gracias a:

$$D = \frac{\kappa_b T}{6\eta\nu r}$$

donde η corresponde a la viscosidad y r al radio circular de las partículas.

2.1.4. Dispersión de luz electroforética.

La dispersión de luz electroforética (ELS, Electrophoretic Light Scattering) es una técnica empleada para medir el potencial zeta de partículas de una disolución.

En ocasiones es interesante analizar las propiedades electroquímicas de las partículas en un medio pues este comportamiento determina como se comportan los materiales en dicho medio, y por tanto, que propiedades mecánicas tendrá. Este comportamiento es especialmente interesante en disoluciones coloidales. En el caso de los ELRs, es también interesante puesto que este comportamiento eléctrico determina parcialmente qué estructuras forman una vez superada la temperatura de transición, como pueden ser nanopartículas, micelas o agregados de mayor tamaño. Esto se debe a que estas estructuras dependen de las fuerzas eléctricas que aparecen entre ellas una vez las moléculas de agua que hidrataban las cadenas lineales del polipéptido han desaparecido.

Para comprender cómo se comporta una partícula en una disolución en la que hay presentes otras sustancias iónicas se utiliza un modelo de partícula esférica conocido como modelo de doble capa [56]. Esta partícula posee una determinada carga eléctrica. La partícula atrae

fuertemente iones cuya carga es opuesta, generando una capa superficial de iones pegados a la partícula que se denomina capa de Stern. Posterior a esta capa se encuentra una nube de iones que también son atraídos por la partícula pero que sufren cierta repulsión debida a la capa de Stern. Esta capa posterior se conoce como capa difusa. La concentración de iones de carga opuesta a la de la partícula disminuye gradualmente con la distancia hasta alcanzar el equilibrio de iones presente en la disolución. Esta partícula y su entorno cargado generan un potencial eléctrico relativo a la disolución. El punto de unión entre la capa de Stern y la capa difusa se conoce como potencial zeta y es de gran utilidad puesto que su medida es relativamente sencilla.

Para medir el potencial zeta se utiliza la dispersión de luz electroforética. Para medirlo, se emplea una cubeta que posee dos electrodos laterales. El equipo, genera un campo eléctrico entre esos dos electrodos. El campo eléctrico es responsable de mover las partículas presentes en la disolución de un lado a otro de la cubeta. La velocidad a la que se mueven estas partículas en su conjunto se conoce como movilidad y es fácilmente transformable a potencial zeta mediante el software del sistema y gracias a valores de viscosidad tabulados para diferentes disoluciones. La movilidad se mide mediante medidas de dispersión de luz.

Los valores del potencial zeta en este proyecto son de especial interés puesto que proporcionan información sobre la capacidad del ELR a estudiar para formar agregados o, por el contrario, mantenerse formando nanopartículas estables.

2.1.5. TIK y fosforilación.

Para este proyecto se empleará un polipéptido del tipo ELR conocido como TIK. El polipéptido dispone de diez secuencias para que la enzima quinasa lo fosforile. Para que hubiese una mejor exposición de la enzima a las secuencias de fosforilación, estas se rodearon de bloques hidrofílicos [57]. El bloque hidrófobo se basa en la secuencia característica de los ELR con el aminoácido guest residue isoleucina, quedando el bloque como VGIPG [35]. Al final de la cadena lineal el polipéptido presenta tres lisinas en bloque. La cadena lineal de aminoácidos es la siguiente:



La fosforilación ocurre en la serina (S) de cada bloque hidrófilo. La estructura secuencial de aminoácidos se muestra en la figura 7.

Finalmente, el polipéptido lleva acoplado un anión azida $-N_3^-$ a cada una de las lisinas finales. La presencia de este grupo azida-lisina está preparada para que en el caso de necesitar que el polipéptido presente propiedades ópticas de fluorescencia, le podamos añadir un fluoróforo.

La fosforilación del polipéptido se lleva a cabo mediante una incubación. Los ELR se disolvieron con una concentración de 1 mg/ml. El buffer para la fosforilación contenía:

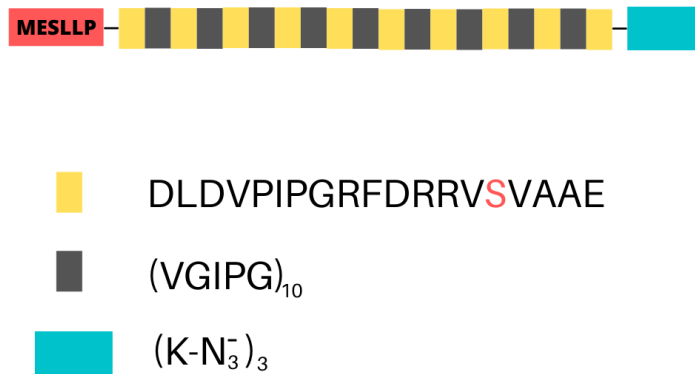


Figura 7: Representación esquemática de la estructura química del polipéptido TIK. El bloque rojo representa la secuencia de aminoácidos necesaria para que la quinasa comience la fosforilación. El bloque amarillo representa la secuencia hidrófila que contiene los aminoácidos que se fosforilan. La fosforilación ocurre en la serina marcada en rojo. El bloque negro corresponde a la secuencia hidrófoba característica de los ELR. Finalmente, el bloque azul corresponde al grupo lisinas-azidas que permiten la unión a un fluoróforo.

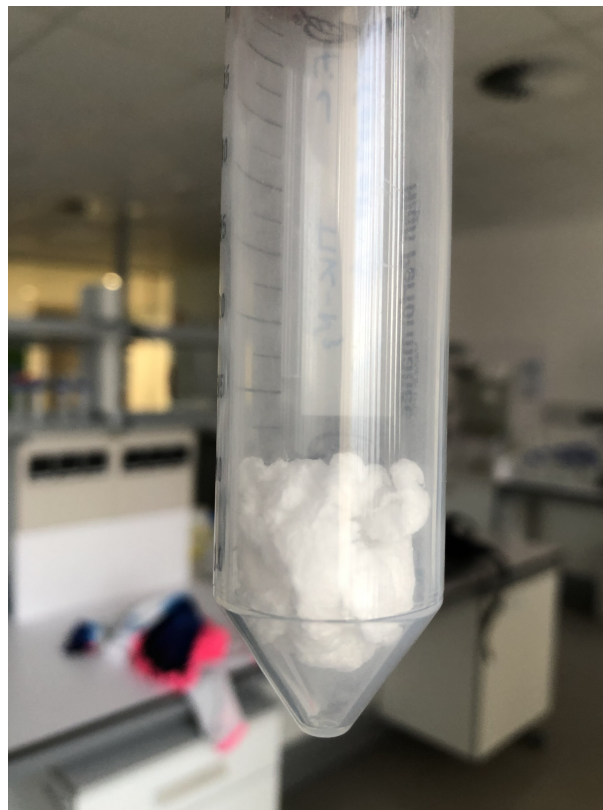


Figura 8: TIK seco. Aspecto algodonoso y de color blanco.



Figura 9: Materiales para la fosforilación. Encima PKA quinasa, buffer PK con solución salina y proteica para el correcto funcionamiento de la enzima y ATP.

- NEBuffer for protein Kinase (PK). Concentración 1X. Laboratorio New England Biolab.
- Adenosina 5'-trifosfato (ATP). Concentración 200 μM . Laboratorio New England Biolab.
- Agua milliQ.

Esta concentración de ATP se elige así de acuerdo con la estequiometría de la reacción para garantizar la presencia de suficientes grupos fosfato.

La enzima utilizada fue cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) catalytic Subunit del laboratorio New England Biolab con un ratio de 5000 unidades de la enzima por cada ml de reacción.

Una vez disponemos de la disolución, se incuba a 20°C durante 3 horas. Esta temperatura está elegida para que el polipéptido se encuentre en disolución (por debajo de T_t) y para que la enzima trabaje adecuadamente. Una vez termina la incubación, los 10 grupos fosfato se han pegado a cada molécula de TIK y se procede a desactivar la enzima calentando la disolución a 80°C durante 15 minutos. A esta temperatura, la enzima ha sufrido un proceso de desnaturalización y queda completamente desactivada. Además, el polipéptido ha transicionado y podemos proceder a la retirada del buffer. Para ello, centrifugamos el polipéptido a una temperatura superior a T_t y retiramos el sobrenadante de la disolución que contiene los restos de enzima, buffer PK y ATP. El pélet que contiene el polipéptido hidratado se retira y se redisuelve en agua milliQ a 1 mg/ml. La disolución se conserva a 4°C bajo agitación durante toda la noche. Una vez hecho esto, se centrifuga a 4°C para eliminar los restos de enzima desactivado de la disolución (pélet) y obtenemos una disolución de TIK limpia (sobrenadante). Finalmente, la disolución se lleva a diálisis para eliminar las sustancias iónicas que conserve la disolución final y a liofilización para obtener el polímero seco.

2.1.6. Diálisis.

La diálisis es un proceso para purificar una disolución que contiene impurezas de carácter iónico de menor peso molecular que el soluto. Su fundamento teórico se basa en la ósmosis y la difusión. Para realizar una diálisis se introduce la disolución en una tripa o membrana de diálisis. Esta membrana posee poros cuyo tamaño permite el paso de sustancias iónicas de pequeño peso molecular pero no el de las moléculas de soluto, que normalmente suelen ser moléculas de mayor tamaño. La membrana, una vez cerrada, se introduce en un bidón de agua ultrapura. En el bidón se coloca un agitador para mantener el agua en movimiento. Los iones que se quieren eliminar de la disolución se desplazan al exterior de la membrana a través de la ósmosis [58]. La fuerza difusora tiende a mover las sustancias a aquellos lugares donde la concentración es menor. El agua ha de ser renovada diariamente para facilitar el proceso de difusión.

2.1.7. Liofilización.

La liofilización es un proceso utilizado para eliminar el agua de una mezcla y secar completamente el resto de componentes. Se basa en la sublimación del agua. La sublimación consiste en paso de estado sólido a gaseoso sin pasar por el estado líquido. En este proyecto se emplea este proceso para obtener el ELR totalmente seco cuando se encuentra en disolución. Para ello, congelamos la disolución y lo introducimos en una liofilizadora. Este equipo dispone de una cámara de vacío donde se produce la sublimación del agua, permitiendo obtener el polímero totalmente seco.

2.2. Materiales.

En esta sección se van a detallar los materiales utilizados en este proyecto.

2.2.1. Materiales de laboratorio.

- Ependorff. Recipientes utilizados para conservar disoluciones de poco volumen. Disponibles en volúmenes de 1.5 ml y de 5 ml.
- Falcon. Recipientes utilizados para conservar disoluciones de mayor volumen. Disponibles en volúmenes de 15 ml y de 50 ml. Existe una versión especial para utilizar en la centrífuga.
- Pinzas y espátulas metálicas. Empleadas para manipular el polipéptido y otros materiales. Antes de su utilización es recomendable desinfectarlas con alcohol etílico.
- Micropipetas. Material utilizado para manipular disoluciones de un volumen determinado. Permiten la extracción de líquido del volumen deseado mediante un manipulador. Cada micropipeta succiona y extrae líquidos de un rango de volumen determinado, que van desde 1 μl hasta 1000 μl .



Figura 10: Equipo de liofilización en el edificio LUCIA, laboratorio de Bioforge.



Figura 11: ELRs liofilizando. Se someten a un proceso de sublimación del agua para el secado del polímero.

- Filtros de jeringa. Se trata de unos filtros desechables empleados para filtrar las disoluciones. En ocasiones, al mantener almacenado el polipéptido aparecen impurezas presentes en el ambiente. Con el fin de eliminarlas y que no interfieran en los resultados, se filtran las disoluciones a través de filtros de jeringa. Estos se acoplan a una jeringa y al succionar una disolución se le hace pasar por el interior del filtro. Están disponibles en diferentes tamaños de poro. En este trabajo se utilizaron los de poro de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro.
- Agua milliQ. Se trata de agua ultrapura de uso en laboratorio. Para su obtención, se filtra y se somete a procesos de ósmosis para eliminar todo tipo de impurezas e iones presentes en el agua común. Además, se trata con procesos de desinfección por medio de lámparas de rayos ultravioleta para eliminar microorganismos vivos.
- Buffer fosfato-salino (PBS). Es una disolución acuosa de uso muy común en la investigación biomédica. Contiene agua ultrapura, cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmoticidad y composición iónica permite que se trate de un ambiente lo más parecido al medio extracelular de los animales mamíferos y, por tanto, permite trabajar en condiciones parecidas a las fisiológicas de los organismos. Su pH es estable y se mantiene en torno a un valor de 7.4. En este trabajo se empleó PBS en concentración 10X de la marca Gibco 70011044 y código 12579099.
- Membranas de diálisis. Se trata de una membrana en forma de tubo en la que se introduce una disolución que se quiere dializar. La membrana posee poros de muy pequeño diámetro que permiten únicamente el paso de iones y otras moléculas de muy bajo peso molecular. Para la diálisis se emplean bidones de agua de 25 l.

2.2.2. Balanza de precisión.

Equipo con muy alta precisión capaz de medir masas de 0.01 mg. Dispone de una pantalla de vidrio que impide que la muestra sea perturbada por corrientes de aire del laboratorio, interfiriendo así en la medida de la masa. Además, se encuentra sobre una mesa antivibratoria para evitar fluctuaciones causadas por la vibración del equipo.

- Modelo: XS105.
- Fabricante: METTLER TOLEDO.

2.2.3. Medidor de pH.

Este equipo permite medir el pH de una disolución. Tiene dos modos de medida: en continuo, para medir el pH de la disolución a tiempo real y por estabilidad, que proporciona un valor de pH cuando el equipo mide el mismo pH durante 6 s. Se empleó para medir el pH de la disolución antes de todas las mediciones realizadas. Esto se debe a que el pH de la disolución de TIK influye de manera drástica en la temperatura de transición. Esta



(a) Filtro de jeringa con microporos para eliminar impurezas de pequeño tamaño en una disolución.



(b) Pipeta empleada en el laboratorio para el manejo de disoluciones. Permiten succionar un volumen determinado.

Figura 12: Material de laboratorio.



Figura 13: Equipo de obtención de agua ultrapura milliQ. Este agua carece de sustancias iónicas y otros compuestos. Se somete a procesos de ósmosis inversa, filtrados y desinfección.

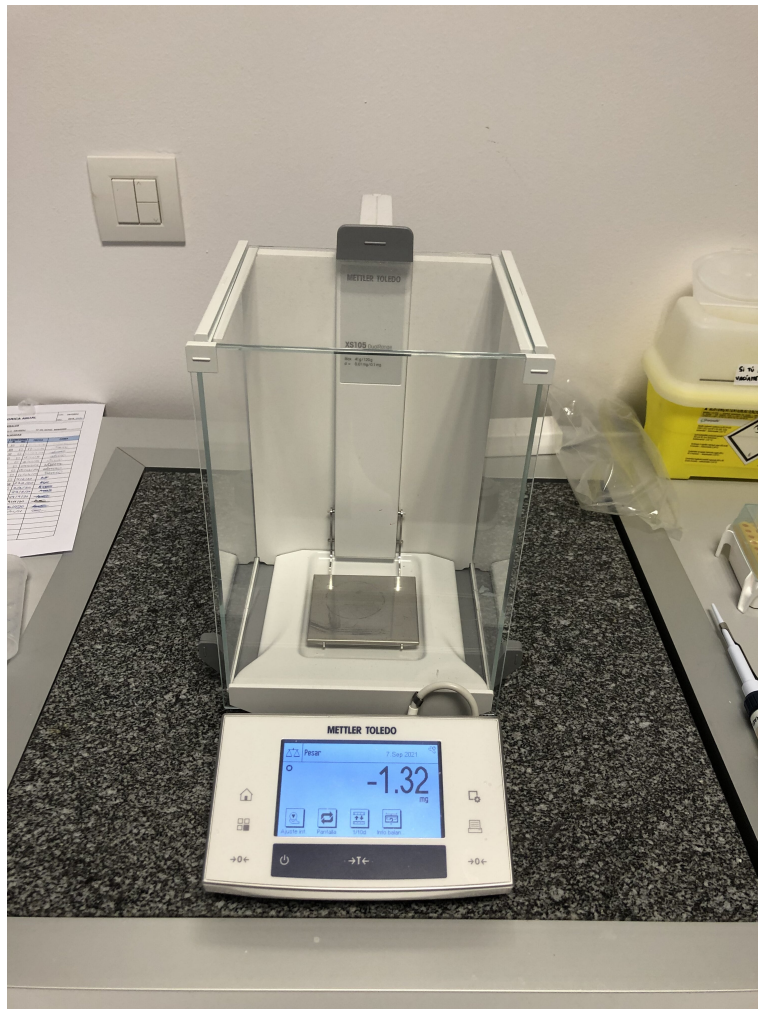


Figura 14: Balanza de precisión. Se encuentra colocada sobre una mesa antivibratoria y contiene una mampara de vidrio para evitar corrientes.



Figura 15: Medidor de pH. Dispone de un electrodo que se introduce en la disolución y mediante medidas de voltaje proporciona un valor de pH.

temperatura desciende notablemente para pH ácido. Cuando se trabaja con disoluciones en PBS, el valor de pH es constante. Sin embargo, cuando se emplea agua como disolvente, el polipéptido produce una bajada considerable de pH, con valores que rondan los 4.8. Para ajustar este valor, se emplearon disoluciones de HCl y de NaOH en diferentes concentraciones. El hidróxido de sodio permite subir el pH gracias a su carácter básico y el ácido clorhídrico bajarlo mediante su carácter ácido. Para el ajuste se emplearon volúmenes muy pequeños, de en torno a los $5 \mu\text{l}$, para que no interfirieran en la concentración de la disolución. Todos los pH se ajustaron a un valor que rondara los 7.2.

- Modelo: pH-meter BASIC 20+.
- Fabricante: CRINSON.

2.2.4. Termobloque.

Se trata de un equipo con celdas para introducir tubos eppendorf de 1.5 ml. El dispositivo permite mantener la temperatura de los tubos constante, desde los 0°C a los 40°C . Además, dispone de un sistema de agitación. Este equipo se empleó para realizar las incubaciones de las fosforilaciones.



Figura 16: Termobloque. Empleado para realizar incubaciones con agitación y a temperatura fija.

- Modelo: ThermoStat C.
- Fabricante: Eppendorf.

2.2.5. Cámara frigorífica.

Se trata de una cámara estanca cuya temperatura interior es de 4°C. Se encuentra en el interior del edificio LUCIA, en el laboratorio de BIOFORGE. Se empleó para realizar todos aquellos procesos en los que era necesaria una temperatura de 4°C, como por ejemplo las diálisis y fosforilaciones.

2.2.6. Centrífuga.

Se trata de un dispositivo capaz de centrifugar una muestra a muy alta velocidad. Este proceso permite separar sustancias de diferente masa presentes en una disolución mediante la fuerza centrífuga que aparece sobre ellas. Esta fuerza empuja al fondo del tubo las sustancias de mayor masa. La máquina dispone de celdas colocadas de forma circular en las que se introducen tubos falcon con la muestra a centrifugar. Es necesario colocar un tubo falcon



(a) Centrífuga. Muy útil para separar fases distintas de una misma disolución.



(b) Cámara donde se introducen los falcon con la disolución a centrifugar.

Figura 17: Centrífuga con control de temperatura.

enfrentado a nuestra muestra con una masa de agua en su interior idéntica a la masa de la muestra para evitar fuerzas no compensadas. En este proyecto se empleó un equipo que permite controlar la temperatura de la muestra y que permite una velocidad de hasta 11000 rpm. Un uso muy común de este aparato fue su utilización para separar el polipéptido TIK del disolvente una vez había transicionado.

- Modelo: ST16R.
- Fabricante: Thermo scientific.

2.2.7. Espectrofotómetro.

Este equipo se emplea para realizar mediciones de turbidimetría. Dispone de una cámara cerrada con una serie de celdas donde se introducen las cubetas para la medición. Cada cubeta se rellena con la muestra a analizar. La celda contiene un láser para emitir luz a través de la cubeta y un detector que permite obtener valores de intensidad lumínica al otro lado de la celda, una vez la luz ha atravesado la muestra. El láser permite emitir luz a diferentes longitudes de onda pero en los experimentos planteados en este proyecto se utilizó luz de 350 nm de longitud de onda para evitar absorciones y otros fenómenos de interferencia. El equipo contiene además un controlador térmico que permite variar la temperatura de las celdas como se desee. Además dispone de un sistema de ventilación con aire a presión para evitar condensaciones como consecuencia de los cambios de temperatura.



(a) Espectrofotómetro empleado para realizar mediciones de turbidimetría.



(b) Cámara con temperatura controlada para introducir las muestras a analizar.

Figura 18: Espectrofotómetro.

- Modelo: Cary Series UV-Vis Spectrophotometer.
- Fabricante: Agilent technologies.

El protocolo realizado para las mediciones de la temperatura de transición fue un barrido de temperaturas. Se coloca la muestra en una de las celdas y una cubeta con la referencia en otra. La referencia ha de ser el disolvente empleado en la muestra, agua o PBS. El equipo varía la temperatura desde los 6°C hasta los 50°C de grado en grado. Para cada temperatura mide la intensidad de luz que atraviesa cada cubeta. Cuando el polipéptido transiciona, se produce una pérdida de intensidad de luz atravesada en esa muestra como consecuencia de la turbidez, algo que no ocurre en la cubeta de referencia. El software muestra una gráfica de intensidad relativa entre ambas cubetas frente a la temperatura. La temperatura de transición es aquella para la que aparece un salto en la intensidad relativa.

2.2.8. Calorímetro de barrido diferencial.

Este equipo se trata de un calorímetro preparado para realizar DSC. El instrumento utiliza nitrógeno gas para regular la temperatura de los crisoles y realizar el barrido de temperaturas. Además, dispone de una bombona de aire para evitar condensaciones como consecuencia de los cambios de temperatura. Para el análisis, se introducen dos crisoles de aluminio en el calorímetro. En uno de ellos se introducen 20 μl de la muestra a analizar. En el otro se introduce la referencia, agua o PBS. La masa de ambos crisoles ha de ser exactamente la misma. Para ello, utilizaremos la balanza de precisión. Los dos crisoles han



Figura 19: Cubeta en el que se introduce la muestra a analizar en el espectrofotómetro.

de ir perfectamente sellados con una tapa. Una vez introducidos en el calorímetro, se inicia el protocolo. Para este proyecto se ha diseñado un protocolo consistente en un barrido de temperaturas desde los 6°C a los 50°C . El software proporciona un gráfico en el que se representa la cantidad de calor suministrada frente a la temperatura. La temperatura de transición del polipéptido TIK será aquella en la que aparezca un pico.

- Modelo: DSC822.
- Fabricante: METTLER TOLEDO.

2.2.9. ZetaSizer.

El ZetaSizer es un instrumento empleado para realizar mediciones de tamaño de partícula y de potencial zeta mediante dispersión dinámica de luz y dispersión de luz electroforética respectivamente. El análisis se realiza a una cierta temperatura determinada, aunque se podría realizar un barrido de temperatura. Como en este caso solo nos interesan las propiedades morfológicas de las estructuras que forma TIK, realizaremos las mediciones antes y después de la transición.

Para el tamaño de partícula se emplea una cubeta cúbica. En ella se vierte la muestra a analizar. Se introduce la cubeta en la celda del ZetaSizer. El equipo emite luz a través



(a) Calorímetro de barrido diferencial de la marca METTLER TOLEDO.

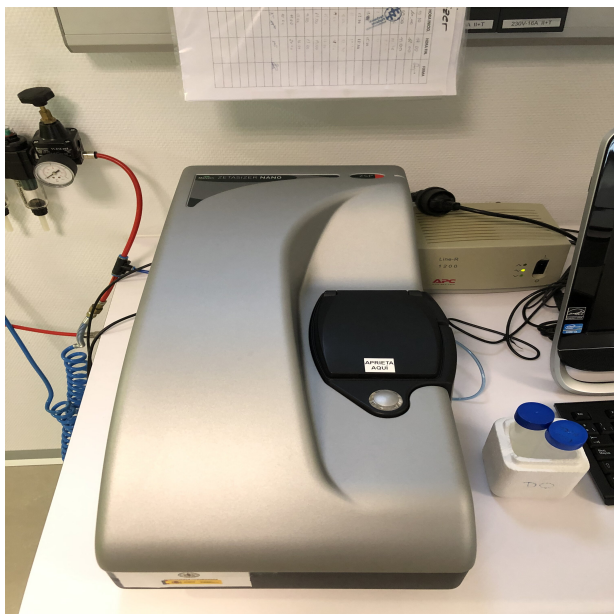


(b) Cámara en la que se introducen los crisoles con la muestra a analizar.

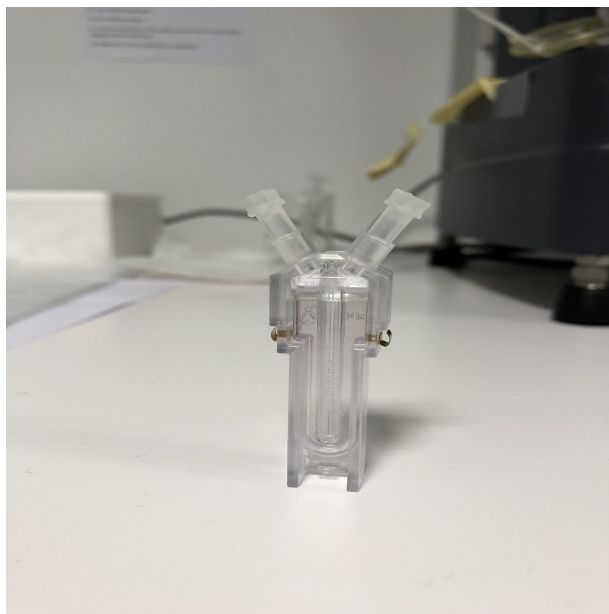
Figura 20: Set-up de calorimetría.



Figura 21: Crisol en el que se introducen $20 \mu\text{l}$ de muestra para realizar DSC. Dispone de una tapa para sellar la muestra.



(a) Equipo para realizar mediciones de tamaño de partícula mediante DLS y de potencial zeta mediante ELS.



(b) Cubeta con electrodos a los laterales para realizar ELS. También dispone de una superficie óptica para las medidas de dispersión.

Figura 22: ZetaSizer.

de la muestra y analiza las fluctuaciones de la luz dispersada para estudiar la movilidad de las estructuras de la disolución. Posteriormente mediante software, con los datos de la viscosidad y el disolvente (de los que disponemos), realiza una estimación del tamaño de partículas. También proporciona datos de la polidispersidad y de la función de correlación de los datos medidos.

Para el potencial zeta se emplean cubetas especiales que disponen de dos electrodos a los laterales y un tubo en forma de U entre los dos electrodos. Se introduce la cubeta en la celda del ZetaSizer y el instrumento genera un campo eléctrico entre ambos electrodos. Como consecuencia de este campo eléctrico, las estructuras de la disolución comienzan a moverse debido a su carga superficial. El equipo entonces hace una medida de la movilidad que mediante software es capaz de transformar en un valor de potencial zeta.

- Modelo: Zetasizer Lab.
- Fabricante: Malvern Panalytical.

3. Resultados.

El análisis realizado en este proyecto proporcionó los resultados que se van a exponer en esta sección. Como ya se ha explicado en anteriores apartados, la caracterización de la temperatura de transición se realizó a través de dos técnicas diferentes: la DSC y la turbidimetría. Una vez se obtuvo esta temperatura, se utilizó el ZetaSizer para estudiar el tamaño de partícula y el potencial zeta una vez el polipéptido había transicionado, y por tanto, había formado estructuras en la disolución. Para ello, se hicieron medidas con el ZetaSizer a dos temperaturas diferentes: a una temperatura inferior a T_t y a una temperatura superior. Toda la caracterización se hizo antes y después de la fosforilación. Para el estudio se utilizaron dos disolventes diferentes, agua milliQ y PBS en concentración 1X. Para esta última se empleó PBS 10X comercial que fue diluido hasta obtener la concentración deseada.

3.1. TIK no fosforilado.

En primer lugar se muestran los resultados obtenidos antes de la fosforilación de TIK.

3.1.1. Turbidimetría.

Se analizó la turbidicidad del polipéptido a diferentes temperaturas con el espectrofotómetro. La concentración de ambas disoluciones fue de 5 mg/ml. Ambas disoluciones fueron filtradas a una temperatura de en torno a los 4 °C para evitar impurezas que interfirieran en la medida. Se empleó esta temperatura con el fin de impedir que el polipéptido hubiese transicionado y que fuera retenido en el filtro. Además, antes de realizar la medición se midió y ajustó el pH de ambas disoluciones con el fin de trabajar en valores de pH similares. La disolución en PBS tenía un pH de 7,29 por lo que no fue necesario ajustarla. La disolución en agua milliQ marcaba un pH de 4,82 por lo que se ajustó con NaOH y HCl hasta que se obtuvo un pH de 7,45.

Se hizo variar la temperatura desde los 6 °C hasta los 50 °C. En la disolución en PBS se obtuvo una temperatura de transición de $21,11 \text{ °C} \pm 0,14 \text{ °C}$. En la disolución en agua milliQ se observó una transición a $29,28 \text{ °C} \pm 0,12 \text{ °C}$. Las figuras 23 y 24 muestran la intensidad relativa frente a la temperatura para las disoluciones en PBS y agua milliQ respectivamente.

3.1.2. Calorimetría diferencial de barrido.

Las disoluciones empleadas en este análisis tenían una concentración de 50 mg/ml. El pH de ambas disoluciones fue ajustado para trabajar en un entorno de pH neutro. El pH de la disolución en PBS marcaba un pH de 7,32. La disolución en agua milliQ marcaba un pH de 4,85, por lo que fue ajustada hasta obtener un pH de 6,92. Se diseñó un protocolo de medida que consistía en un barrido de temperatura desde los 4 °C hasta los 50 °C.

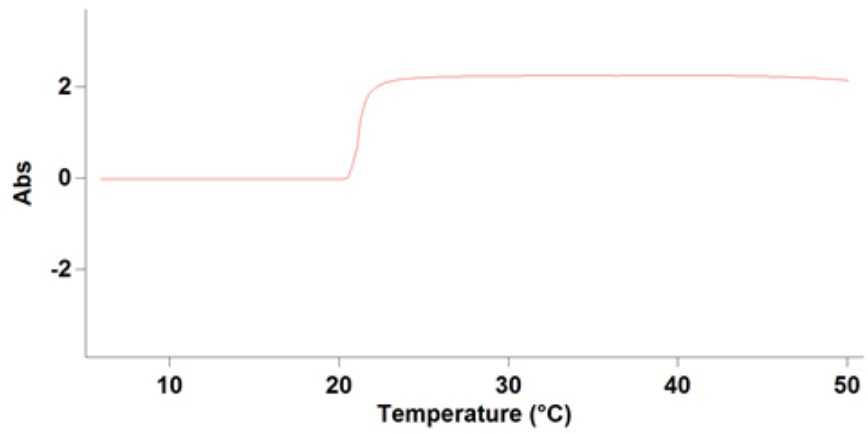


Figura 23: Análisis turbidimétrico de TIK en PBS. Se observa una temperatura de transición de 21,27 °C.

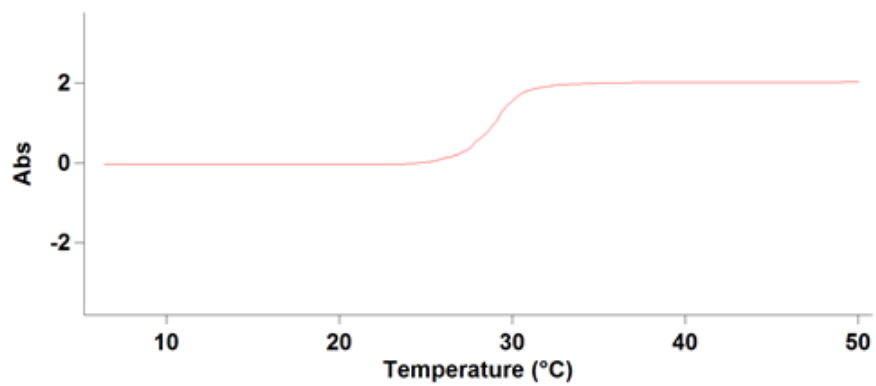


Figura 24: Análisis turbidimétrico de TIK en agua milliQ. Se observa una temperatura de transición de 29,14 °C.

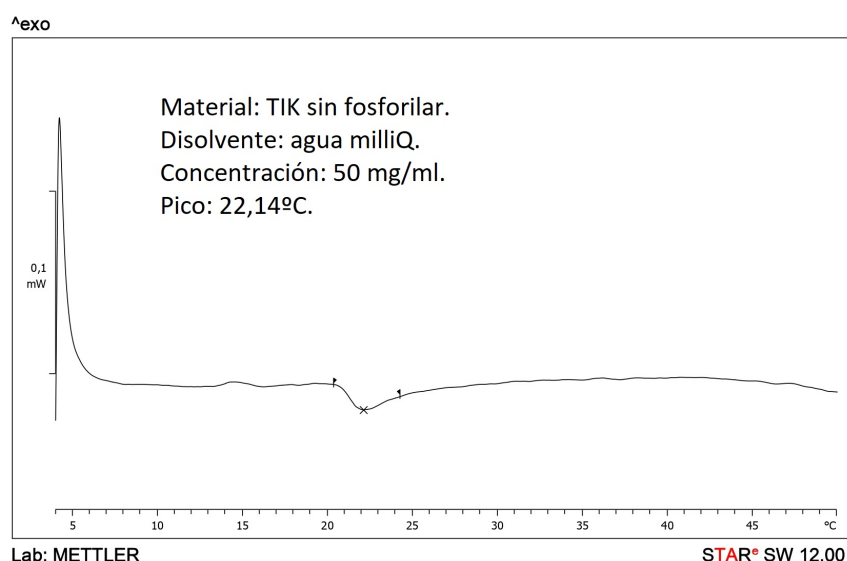


Figura 25: Análisis DSC de TIK sin fosforilar en agua milliQ. Se observa una transición de fase a 22,14 °C.

En la disolución en PBS se observó una transición de fase endotérmica en torno a los $15,82\text{ °C} \pm 0,07\text{ °C}$. En la figura 26 se muestra los resultados gráficos de un análisis DSC de TIK sin fosforilar en PBS. En la disolución en agua milliQ se observó una transición de fase similar a $22,10\text{ °C} \pm 0,16\text{ °C}$. En la figura 25 se muestra un análisis gráfico para una DSC de TIK sin fosforilar en agua milliQ. En ambos gráficos se muestra el flujo de calor frente a la temperatura.

3.1.3. Tamaño de partícula.

Para analizar el tamaño de partícula en la disolución una vez había transicionado el polipéptido TIK se empleó la dispersión dinámica de luz. Todas las mediciones se repitieron 3 veces con el fin de obtener un resultado lo más válido posible. Las disoluciones analizadas tenían una concentración de 1 mg/ml. El pH de la disolución en PBS era 7,29 y el pH en agua milliQ 4,91 por lo que esta última fue ajustada hasta obtener un pH de 7,51.

En primer lugar se realizó el análisis a 4°C, tanto en PBS como en agua milliQ. En ambos casos, los resultados para el tamaño de partícula mostraron la ausencia de partículas en la disolución.

Posteriormente, se analizó la muestra a una temperatura de 40°C. En PBS, aparecieron estructuras en suspensión con un diámetro de $1197\text{ nm} \pm 19\text{ nm}$. En la figura 27 se muestra la distribución de tamaños para este caso. En la disolución de agua milliQ aparecieron estructuras con un diámetro de $208,3\text{ nm} \pm 1,3\text{ nm}$. La distribución de tamaños se muestra en la figura 28.

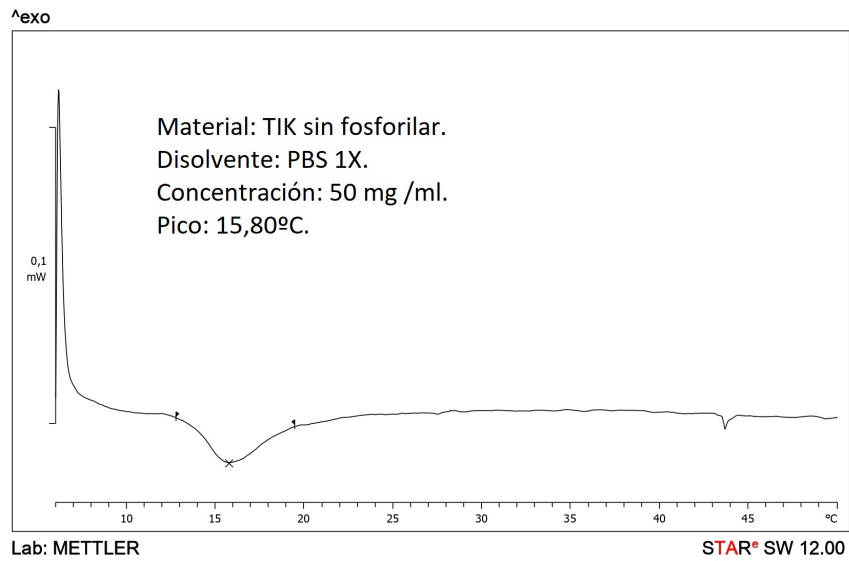


Figura 26: Análisis DSC de TIK sin fosforilar en PBS. Se observa una transición de fase a 15,80 °C.

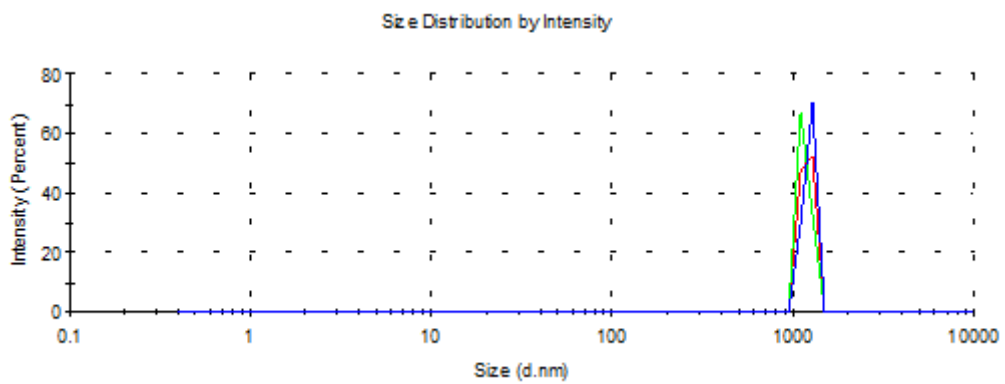


Figura 27: Distribución de tamaños de partícula para TIK sin fosforilar en PBS a 40 °C. Las tres líneas corresponden a 3 mediciones diferentes.

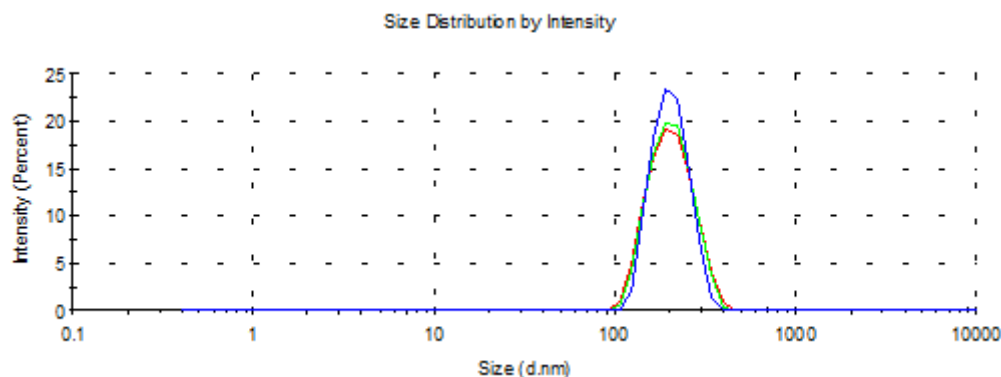


Figura 28: Distribución de tamaños de partícula para TIK sin fosforilar en agua milliQ a 40 °C. Las tres líneas corresponden a 3 mediciones diferentes.

3.1.4. Potencial zeta.

Se estudió el potencial zeta de las disoluciones de TIK sin fosforilar a 4°C y a 40°C para analizar el comportamiento antes y después de la transición del polímero a través de la dispersión de luz electroforética. La concentración en estas disoluciones fue de 1 mg/ml. Las mediciones se realizaron tres veces para cada muestra con el fin de obtener un mejor resultado. El pH de la disolución en PBS era 7,29 y el pH en agua milliQ 4,91 por lo que esta última fue ajustada hasta obtener un pH de 7,51.

A 6 °C la movilidad obtenida por el equipo fue muy baja, de en torno a los 0,1 $\mu m/Vs$, debido a la ausencia de partículas presentes a esta temperatura.

A 40 °C obtuvimos los siguientes valores de potencial zeta:

Muestra	Potencial zeta (mV)
TIK sin fosforilar PBS	$-14,4 \pm -0,3$
TIK sin fosforilar agua milliQ	$-44,3 \pm -0,3$

3.2. TIK fosforilado.

Se sometió al polipéptido a un proceso de fosforilación tal y como se detalla en la sección 2.1.5. Una vez se fosforiló, se liofilizó para su posterior análisis. El estudio de TIK fosforilado fue similar al que se le realizó antes de la fosforilación. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

3.2.1. Turbidimetría.

Las disoluciones empleadas en turbidimetría tenían una concentración de 5 mg/ml, tanto en PBS como en agua milliQ. El pH de la disolución en PBS era de 7,33 y el pH de la

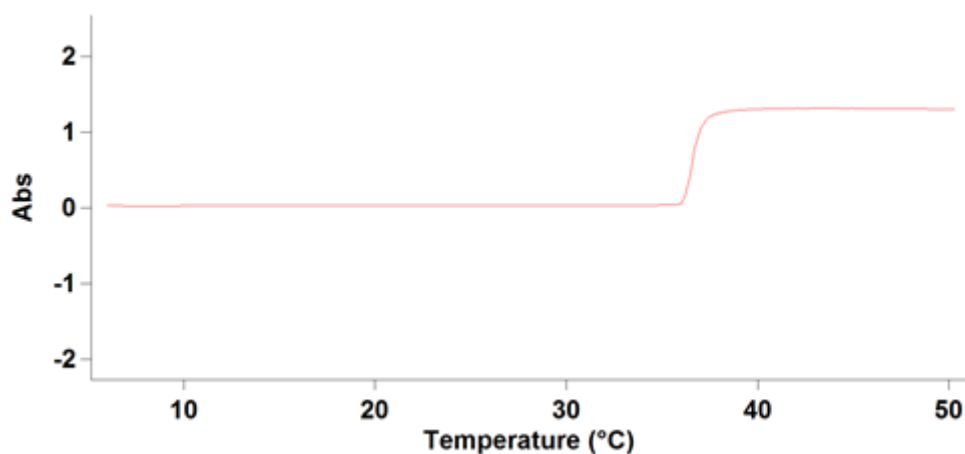


Figura 29: Análisis turbidimétrico de TIK fosforilado en PBS. Se observa una transición de fase a 37,02 °C.

disolución en agua milliQ era de 4,87. Esta última disolución fue ajustada en pH hasta obtener un valor de 7,43 para trabajar en condiciones de pH neutro.

En PBS, se realizó un barrido de temperaturas desde los 6 °C a los 50 °C y se observó una temperatura de transición de 36,94 °C \pm 0,11 °C. Para la disolución en agua milliQ se realizó un barrido de temperatura desde los 6 °C a los 70 °C y no se observó ninguna transición en la disolución. Para la correcta confirmación de la ausencia de transición de TIK fosforilado en agua milliQ y pH neutro se calentó la disolución en un horno hasta los 80 °C. La disolución permaneció completamente transparente, sin el correspondiente enturbiamiento típico de las disoluciones de cualquier ELR.

Ambos resultados se muestran en las figuras 29 y 30.

3.2.2. Calorimetría diferencial de barrido.

Al no existir una transición cuando se disuelve TIK fosforilado en agua milliQ y con un pH neutro, se decidió no aplicar la DSC a esta disolución pues no iba a proporcionar resultados adicionales. En PBS se empleó una disolución con concentración 50 mg/ml y se realizó un barrido de temperaturas desde los 5 °C hasta los 60°C. El pH medido en la disolución fue de 7,34.

Se observó una transición de fase endotérmica en torno a los 28,01 °C. El resultado se muestra en la figura 31.

3.2.3. Tamaño de partícula.

Al igual que en calorimetría, el análisis realizado para el tamaño de partícula solo se realizó para la disolución en PBS puesto que en agua milliQ, el polipéptido TIK fosforilado

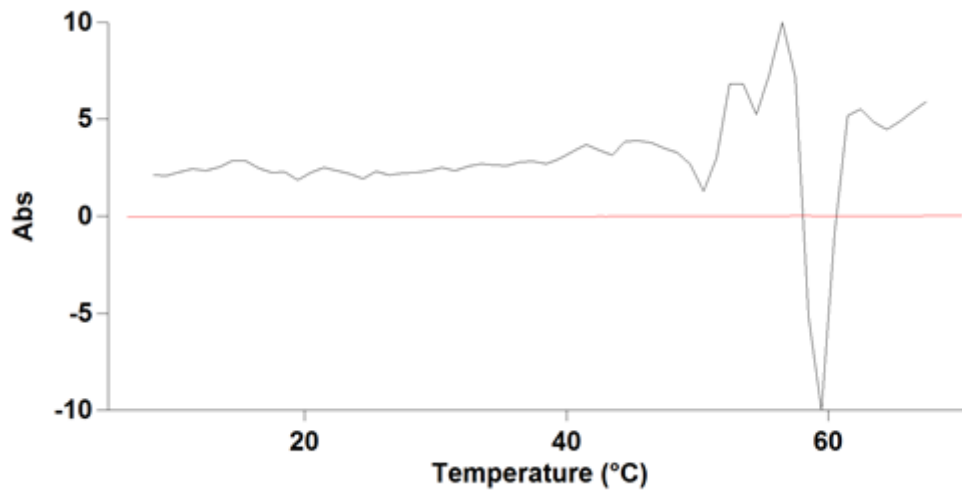


Figura 30: Análisis turbidimétrico de TIK fosforilado en agua milliQ. No se observa ninguna transición. La línea negra representa la derivada de la intensidad relativa.

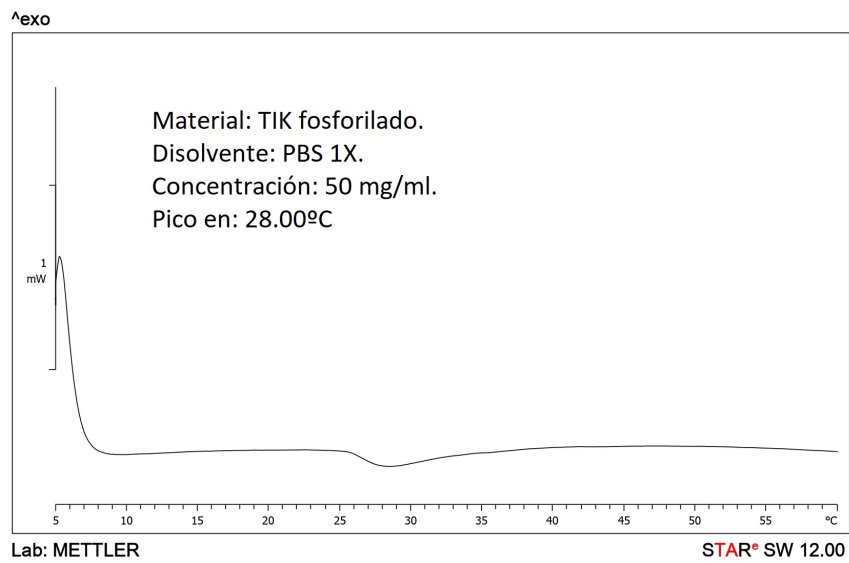


Figura 31: Análisis DSC de TIK fosforilado en PBS. Se observa una transición de fase a 28,01 °C.

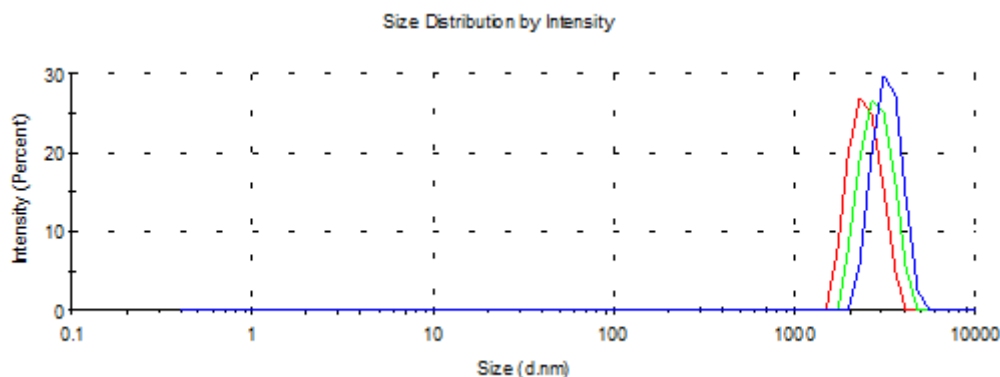


Figura 32: Distribución de tamaños de partícula para TIK fosforilado en PBS a 50 °C. Las tres líneas corresponden a 3 mediciones diferentes.

no transiciona. El análisis se realizó a 6 °C (antes de la transición) y a 50 °C (después de la transición).

Las mediciones a 6 °C mostraron la ausencia de partículas en la disolución. Las mediciones a 50 °C mostraron la presencia de partículas cuyo diámetro se estimó en $2417 \text{ nm} \pm 236 \text{ nm}$. La distribución de tamaños (en porcentaje) se muestra en la figura 32.

3.2.4. Potencial Zeta.

En este caso, de la misma forma que en los otros experimentos, solamente se trabajó con la disolución en PBS debido a la ausencia de transición cuando se trabaja con agua milliQ y pH neutro.

A 6°C no se obtuvo un valor de potencial zeta de calidad pues la movilidad medida era muy baja debido a la ausencia de estructuras en la disolución (TIK en estado disuelto). A 50°C, el valor de potencial obtenido fue de $-9,80 \text{ mV} \pm 0,21 \text{ mV}$.

3.3. Otros resultados de interés.

Se realizó un análisis turbidimétrico en el espectrofotómetro a dos disoluciones de TIK sin fosforilar, ambas en agua milliQ pero con un pH distinto para comprobar la dependencia de T_t con la concentración de iones de hidrógeno del medio. Los resultados de el análisis correspondiente a la disolución con el pH ajustado (7,45) fueron presentados en la sección 3.1.1 y se midió una temperatura de transición de $T_t = 29,14 \text{ °C}$. En segundo lugar se analizó una disolución cuyo pH no se ajustó. El pH en este caso era de 4,84. La temperatura de transición en este caso fue de $T_t = 18,12 \text{ °C}$. El resultado proporcionado por el espectrofotómetro se muestra en la figura 33.

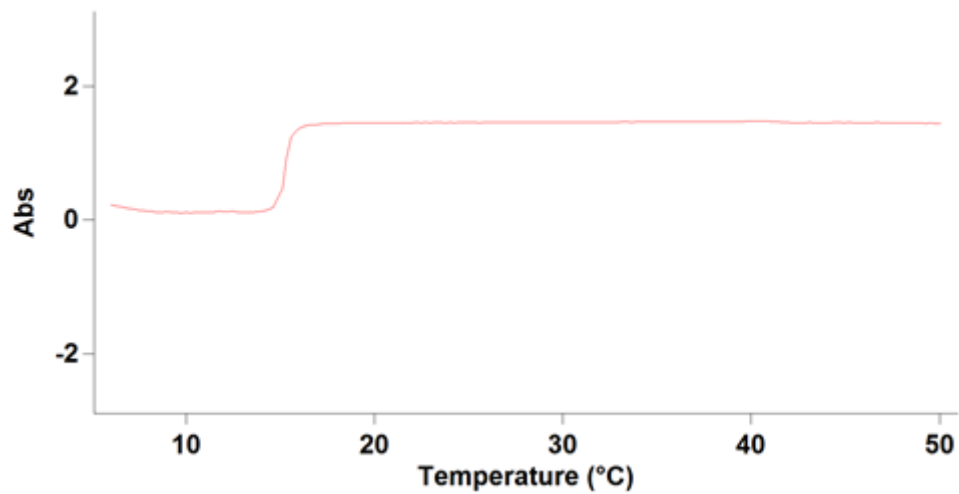


Figura 33: Resultados del análisis turbidimétrico de una disolución de TIK sin fosforilar en agua milliQ con un pH ácido de 4,84. Se observa una transición a 18,12 °C

Temperatura de transición:

CALORIMETRÍA	TIK SIN FOSFORILAR	TIK FOSFORILADO
milliQ	22,01 °C	-
PBS 1X	15,82 °C	28,01 °C

TURBIDIMETRÍA	TIK SIN FOSFORILAR	TIK FOSFORILADO
milliQ	29,28 °C	-
PBS 1X	21,11 °C	36,94 °C

Tamaño de partícula a T por encima de la temperatura de transición:

TAMAÑO	TIK SIN FOSFORILAR	TIK FOSFORILADO
milliQ	208,3 nm	-
PBS 1X	1197 nm	2417 nm

Potencial zeta:

POTENCIAL ZETA	TIK SIN FOSFORILAR	TIK FOSFORILADO
milliQ	-44,3 mV	-
PBS 1X	-14,4 mV	-9,8 mV

Figura 34: Resumen de resultados para la temperatura de transición, distribución de tamaño de partículas y potencial zeta para temperatura $T > T_t$

4. Discusión de los resultados.

El objetivo de este proyecto consistía en demostrar experimentalmente la hipótesis de que al someter a un proceso de fosforilación a un polipéptido del tipo ELR, la temperatura de transición variaba como consecuencia de un cambio químico en su cadena lineal de aminoácidos. Además, se quería observar la dependencia de esta magnitud física con otros factores fisicoquímicos muy relevantes a la hora de pensar en aplicaciones biomédicas para estos tipos de ELRs, como pueden ser la concentración, la salinidad del medio o el pH.

4.1. Efectos de la fosforilación.

La adición de los 10 grupos fosfato a la cadena lineal de aminoácidos del polipéptido TIK produce claramente un aumento en la temperatura de transición. Este cambio es tan significativo que este proceso de fosforilación puede incluso llegar a bloquear completamente la formación de estructuras del polímero en la disolución.

En medio salino (PBS) y en el caso de disoluciones con concentración 5 mg/ml la temperatura de transición cambia de los 21,11 °C a los 36,94 °C, un aumento de temperatura de unos 15,83 °C. En medio acuoso, el cambio es más extremo aún pues la fosforilación del polipéptido bloquea completamente la formación de agregados en la disolución. La presencia de estos grupos fosfato impide la deshidratación de las cadenas lineales de TIK, lo que impide a su vez que se formen enlaces con otras cadenas formando las estructuras características de los ELR.

En concentración más alta, el aumento en la temperatura de transición ocurre de forma similar. Al analizar en DSC (concentración a 50 mg/ml) las transiciones de fase ante un barrido de temperatura, se observa que para el polipéptido TIK sin fosforilar la transición en medio salino ocurre a una temperatura de 15,82 °C, mientras que para el polipéptido TIK fosforilado T_t es de 28,01 °C. En medio acuoso el polipéptido continua sin transicionar para altas temperaturas. Esto se demostró introduciendo la disolución en un horno a 80 °C y observando la ausencia de transición.

Este claro aumento de la temperatura de transición se debe a la presencia de los grupos fosfato en las cadenas lineales del polipéptido. Como se explicó en anteriores secciones, la transición ocurre por la pérdida de las moléculas de agua adheridas a las moléculas del polipéptido. Cuando la temperatura es inferior a T_t , la presencia de grupos del tipo clorato permiten la solubilidad del polímero, mientras que si la temperatura aumenta por encima de T_t , los bloques hidrófobos de la cadena lineal se deshidratan y forman enlaces con otros bloques hidrófobos permitiendo la formación de estructuras dinámicas y regulares [40]. Al fosforilar, la presencia de los grupos fosfato en los bloques hidrófobos del polipéptido impiden la deshidratación de la cadena lineal, aumentando así la temperatura de transición.

Desde el punto de vista del tamaño de las estructuras que forma el polipéptido cuando ocurre la transición, se puede observar un claro aumento en el tamaño de las estructuras que forma en la disolución. Para TIK sin fosforilar, el diámetro medido para las estructuras

es de 1197 nm, mientras que para TIK fosforilado se observa un diámetro de 2417 nm. La diferencia es por tanto de 1220 nm. Se puede por tanto afirmar que la presencia de los grupos fosfato en la cadena lineal de aminoácidos permite un aumento del diámetro de los agregados que forma TIK en la disolución una vez se supera T_t .

En cuanto al potencial zeta de los agregados que se forman una vez superada T_t , el resultado muestra la aparición de una cierta inestabilidad en la disolución. El potencial zeta es un indicador de la estabilidad de una suspensión coloidal, puesto que proporciona información de las fuerzas electrostáticas que aparecen entre las estructuras de la disolución, que en este caso son los agregados de TIK. Cuando más pequeña es la magnitud del potencial zeta obtenida, mayor es la inestabilidad de la dispersión coloidal. Esto se debe a que cuanto menor es el potencial zeta, las fuerzas atractivas entre las partículas formadas puede vencer a la fuerza repulsiva de los iones de su superficie, permitiendo así la floculación, es decir, la aglutinación de las estructuras en suspensión [59].

Los experimentos muestran un claro descenso de la magnitud del potencial zeta. Cuando TIK no se encuentra fosforilado y en disolución salina, el potencial zeta obtenido es de -14,4 mV mientras que para TIK fosforilado y en disolución salina es de -9.80 mV. Esta disminución en el potencial zeta concuerda con los resultados obtenidos para la distribución de tamaños, pues este descenso en esta magnitud muestra una disminución en las fuerzas repulsivas de las estructuras de la disolución permitiendo así que se formen agregados de mayor tamaño. A pesar de este descenso, los valores de potencial zeta se encuentran por encima de -5 mV. Si el potencial zeta fuese inferior a esta magnitud, se produciría una floculación rápida, un efecto indeseable para ciertas aplicaciones de este tipo de polímero.

4.2. Efectos de la salinidad.

La influencia de la salinidad en la temperatura de transición de TIK y en las propiedades morfológicas y fisicoquímicas de las estructuras que forma el polipéptido al transicionar es completamente evidente a través de los experimentos realizados.

Todos los análisis se realizaron en diferentes condiciones de salinidad. Se utilizó agua milliQ, un tipo de agua ultrapura que carece de cualquier tipo de ion y buffer fosfato-salino (PBS), una disolución salina de especial interés en la investigación biomédica debido a su parecido fisiológico con el medio extracelular del cuerpo humano. Para trabajar en condiciones iguales de pH, se trató de ajustar siempre el pH de todas las disoluciones a un valor en torno a 7,2, pues esta magnitud afecta también a los resultados.

Se puede constatar fácilmente que un aumento en la salinidad de la disolución produce a su vez una disminución de la temperatura de transición. Con concentraciones de 5 mg/ml, observamos en turbidimetría una diferencia en T_t de 8,17 °C. Con concentraciones de 50 mg/ml, podemos observar en calorimetría una diferencia en T_t de 6,19 °C. Este efecto ha sido altamente estudiado por Rodríguez Cabello et al. [60] y muestra que la presencia de iones en la disolución facilita la deshidratación de las cadenas lineales de aminoácidos, disminuyendo así la temperatura de transición.

En el caso de la morfología y las propiedades electrostáticas de las estructuras en la disolución, podemos observar un potencial zeta muy alto para disolución no salina (agua milliQ), de -44,3 mV, en comparación con el obtenido para disolución en PBS, de -14,4 mV. La presencia de sales por tanto disminuye la estabilidad de la dispersión coloidal de la disolución de TIK. Podemos afirmar que para un potencial zeta de -44,3 mV la disolución es fuertemente estable [59].

Además, al estudiar la distribución de tamaños en ambas disoluciones, observamos una diferencia bastante notable en los diámetros presentes en la disolución. En PBS, las estructuras formadas tienen diámetros de 1197 nm, frente a los 208,3 nm de las estructuras presentes en agua milliQ. Esto concuerda con los datos de potencial zeta obtenidos.

Por último, la concentración de las sales en la disolución es un factor importante a la hora de estudiar esta clase de efectos sobre estos polímeros. Se intentó disolver TIK en una disolución 10X de PBS pero se observó que el polipéptido no se disolvía. Esto se debe a que la alta concentración de sales hizo descender demasiado la temperatura de transición impidiendo totalmente su estado disuelto.

4.3. Efectos de pH.

La concentración de iones de hidrógeno modifica, como la salinidad, la temperatura de transición y otras magnitudes fisicoquímicas de los polipéptidos de tipo ELR. Este efecto también ha sido profundamente estudiado, llegándose incluso a hacer modelos teóricos acerca de como el pH afecta a T_t (Mackay et al.) [61].

En este trabajo simplemente se ha querido comprobar experimentalmente dicha dependencia con la temperatura a través de las técnicas de caracterización empleadas. Para ello, se estudiaron dos disoluciones idénticas de TIK sin fosforilar en agua milliQ, en la que una de ellas ajustamos el pH con HCl y NaOH (con muy poco volumen y en concentraciones altas para no variar la concentración de la disolución) y en la otra dejamos el pH ácido que presentaba la disolución en agua milliQ. Por tanto, uno de los pH fue de 7,45 y el otro de 4,84.

Se realizaron análisis de turbidicidad y observamos temperaturas de 29,14 °C para pH= 7,45 y de 18,12 °C para pH= 4,84, con una diferencia de temperatura de 11,02 °C. Destaca el importante efecto de esta magnitud en los experimentos, pues un pH básico en agua milliQ es responsable de reducir la T_t por debajo de la que presenta el mismo polipéptido en PBS (siento esta más alta para pH similares).

5. Conclusiones.

5.1. Conclusiones generales.

El interés de estos biomateriales reside en sus grandes aplicaciones en el mundo de la biomedicina moderna. En general, la presencia de esta transición de fase reversible que presentan todos los ELRs es muy útil para poder aplicarlo en dicho campo. En ocasiones, estos materiales son conocidos como smart-ELR. Esto se debe a que la posible alteración del valor de esta temperatura con elementos fisicoquímicos presentes en el propio medio en el que se encuentra el polímero permite jugar con dicho comportamiento y variarlo en función de su posible utilidad. La versatilidad en las estructuras que forma una vez se supera la temperatura de transición también juegan un papel importante en la creación de esta etiqueta, pues suponen una revolución en el mundo de los nanomateriales.

La fosforilación, por otra parte, es un proceso natural fundamental en los procesos biológicos del cuerpo humano y es por esto que es un proceso muy estudiado e investigado. Las células del cuerpo humano constantemente fosforilan todo tipo de proteínas y moléculas. La propia naturaleza hermana de los polipéptidos ELR y las proteínas permite que la fosforilación de estos polímeros sea idéntica a la fosforilación realizada por las células animales. Esto, confiere al polipéptido TIK y todos los polipéptidos del tipo smart-ELR con secuencias de fosforilación un interés especial en el universo de los biomateriales.

La fosforilación altera la temperatura a la cual se produce la transición de fase de TIK. En concreto, produce un aumento considerable de dicha temperatura. Las células del ser humano fosforilan proteínas ante cambios en el medio para actuar como respuesta a ellos. Estos cambios pueden ser, por ejemplo, procesos infecciosos o enfermedades. Este mecanismo puede ser aprovechado para poder utilizar un polipéptido tipo ELR fosforilable para poder introducirlo en el organismo y que, ante la fosforilación natural de la célula, transicione y genere un cambio deseado. Esto puede ser, por ejemplo, la liberación de un medicamento adherido a la molécula del polipéptido.

Además, es posible combinar el efecto de la fosforilación con otros efectos estudiados en este proyecto. Por ejemplo, el pH es un valor interesante a la hora de estudiar las posibles aplicaciones de estos polipéptidos pues también genera un importante cambio en la temperatura de transición de los ELR. El pH del cuerpo humano no es un valor constante y en ocasiones se producen cambios de pH como consecuencia de diferentes factores. Un claro ejemplo de esto son los tumores que derivan en cánceres. El pH de las células tumorales es totalmente neutro en las zonas intracelulares frente al carácter ácido del medio extracelular [62]. Esto, podría sugerir el uso de polímeros de tipo ELR para liberar algún tipo de tratamiento frente a esta clase de enfermedades.

Esta perfecta simbiosis entre biomedicina y ciencia de materiales permite ampliar el espectro de posibles aplicaciones de estos biomateriales. Además, la alta biocompatibilidad de estos materiales con el cuerpo humano hacen más fácil sus infinitas aplicaciones en el campo de la biomedicina.

5.2. Posibles ampliaciones a este trabajo.

El aprendizaje que requiere trabajar en un laboratorio profesional y la dificultad de las técnicas empleadas en este proyecto han supuesto dejar atrás un gran número de posibles experimentos adicionales que podrían completar este trabajo de investigación.

En esta sección vamos a enumerar y detallar las posibles líneas de investigación que quedan abiertas para futuros proyectos y que pueden ser de alto interés:

- El polipéptido TIK contiene tres bloques lisina-azida al final de la cadena lineal diseñados especialmente para unirse químicamente a un fluoróforo que contenga un grupo dibenzociloactino que se une a la azida. Un fluoróforo de este tipo podría ser la Cyani-na5 DBCO. Mediante esta sonda fluorescente unida al polipéptido, podríamos obtener imágenes de las estructuras que forma en la disolución al transicionar de fase a través de técnicas de microscopía confocal. Esta técnica sería útil para observar qué tipo de estructuras forma, así como hacer medidas directas de tamaño.
- La desfosforilación es un proceso que consiste en la eliminación de un grupo fosfato de cualquier molécula que lo contenga. Es un proceso químico totalmente simétrico al proceso de fosforilación estudiado en este trabajo. De la misma forma que somos capaces de fosforilar el polipéptido TIK, podríamos ser capaces de realizar este proceso inverso y estudiar todas las propiedades analizadas después de la fosforilación. Esta línea de investigación abre preguntas muy interesantes, como por ejemplo, ¿regresa T_t a los valores previos a la fosforilación después de la desfosforilación? ¿afecta este proceso a la estructura molecular del polímero?
- Otro análisis interesante adicional es el estudio de la cinética de reacción de la fosforilación para poder comprender cómo ocurre químicamente este proceso. Este estudio permitiría obtener un análisis de qué eventos moleculares ocurren en la reacción, así como el efecto de variables como la temperatura ante esta reacción química. Este estudio podría llevarse a cabo mediante DLS o turbidimetría.

5.3. Conclusiones personales.

Este trabajo de fin de grado ha supuesto un enorme reto para mí. Trabajar en un laboratorio profesional resulta una experiencia completamente nueva para un estudiante casi graduado y los retos que supone aprender tanto las técnicas empleadas en el proyecto como el manejo y trabajo de un laboratorio han sido una motivación para sacar adelante este TFG. Además, el uso de biografía especializada también ha supuesto un gran esfuerzo y un aprendizaje muy útil en un proyecto de este estilo. Por último, el carácter *cross* de esta temática supone una dificultad añadida, pues a pesar de disponer de ciertos conocimientos en física útiles para este proyecto, han sido necesarios numerosos conocimientos en otras materias como la biología o la química. Sin embargo, este *conocimiento cross* permite a cualquier científico abrir nuevas puertas de estudio y mejores experiencias para una persona con vocación investigadora.

Referencias

- [1] Danilo Rairán y col. “Levitación magnética el sistema de transporte del futuro”. En: *Tecnura* 3.5 (1999), págs. 4-10.
- [2] Diego F Hernández Ramírez y Javier Cabiedes. “Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes”. En: *Reumatología Clínica* 6.3 (2010), págs. 173-177.
- [3] Rolf E Hummel. *Understanding materials science: history, properties, applications*. Springer, 1998.
- [4] Gabor L Hornyak y col. *Introduction to nanoscience and nanotechnology*. CRC press, 2008.
- [5] Yury Gogotsi. *Nanomaterials handbook*. CRC press, 2006.
- [6] Guohai Yang y col. “Graphene-like two-dimensional layered nanomaterials: applications in biosensors and nanomedicine”. En: *Nanoscale* 7.34 (2015), págs. 14217-14231.
- [7] Stephen J Klaine y col. “Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects”. En: *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 27.9 (2008), págs. 1825-1851.
- [8] Maëlle Perfézou, Anthony Turner y Arben Merkoçi. “Cancer detection using nanoparticle-based sensors”. En: *Chemical Society Reviews* 41.7 (2012), págs. 2606-2622.
- [9] Arturo Ibáñez-Fonseca y col. “Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials”. En: *Matrix Biology* 84 (2019), págs. 111-126.
- [10] Gustavo Duffo. “Biomateriales”. En: *de Materiales y Materias Primas, Ciudad Autónoma de Buenos Aires* (2011).
- [11] Elena P Ivanova, Kateryna Bazaka y Russell J Crawford. *New functional biomaterials for medicine and healthcare*. Vol. 67. Woodhead publishing New Delhi, India: 2014.
- [12] María Antonia Lizarbe. “Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular”. En: *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp)* 101.1 (2007), págs. 227-249.
- [13] Alejandro Echavarría. “Una perspectiva de los biomateriales vista desde un diseño específico: La prótesis total de cadera”. En: *Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia* 30 (2003), págs. 95-108.
- [14] José Antonio Sánchez Fernández. “Biopolímeros para sistemas de administración de medicamentos”. En: *Departamento de Procesos de Polimerización del Centro de Investigación en Química Aplicada, México* (2021).
- [15] Johan RC Van der Maarel. *Introduction to biopolymer physics*. World Scientific Publishing Company, 2007.
- [16] Dieter Klemm y col. “Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material”. En: *Angewandte chemie international edition* 44.22 (2005), págs. 3358-3393.
- [17] Gunter Fischer. “Chemical aspects of peptide bond isomerisation”. En: *Chemical Society Reviews* 29.2 (2000), págs. 119-127.
- [18] J Carlos Rodríguez-Cabello y col. “Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers”. En: *Nanomedicine* 6.1 (2011), págs. 111-122.

- [19] Debarun Das y col. “Bioresorption and degradation of biomaterials”. En: *Tissue engineering III: cell-surface interactions for tissue culture*. Springer, 2011, págs. 317-333.
- [20] Alton Meister. *Biochemistry of the amino acids*. Elsevier, 2012.
- [21] MM Cox, AL Lehninger y DL Nelson. “Principios de bioquímica”. En: *Sao Paulo* (2006).
- [22] Jean Paolo Zea Morales y col. “Los Aminoácidos en el cuerpo humano”. En: *RECI-MUNDO: Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento* 1.5 (2017), págs. 379-391.
- [23] H BIELKA GDR, N Sharon y EC WEBB Australia. “Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides”. En: *Pure and Applied Chemistry* 56 (1984), págs. 595-624.
- [24] Dominik Fuchs y col. “Solubility of amino acids: Influence of the pH value and the addition of alcoholic cosolvents on aqueous solubility”. En: *Industrial & engineering chemistry research* 45.19 (2006), págs. 6578-6584.
- [25] Merlette Ibeth Bello Pérez. “Química II”. Tesis doct. Universidad Centrooccidental “Lisandro Alvarado”, 2011.
- [26] Matilde Seguí. *Estructura y propiedades de las proteínas*. 2011.
- [27] Martin Karplus y John Kuriyan. “Molecular dynamics and protein function”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.19 (2005), págs. 6679-6685.
- [28] CG Carter y DF Houlihan. “Protein synthesis”. En: *Fish physiology* 20 (2001), págs. 31-75.
- [29] Irving M Klotz, NR Langebman y DW Dahnall. “Quaternary structure of proteins”. En: *Annual review of biochemistry* 39.1 (1970), págs. 25-62.
- [30] Hans Oxlund, Jan Manschot y A Viidik. “The role of elastin in the mechanical properties of skin”. En: *Journal of biomechanics* 21.3 (1988), págs. 213-218.
- [31] William R Gray, Lawrence B Sandberg y Judith A Foser. “Molecular model for elastin structure and function”. En: *Nature* 246.5434 (1973), págs. 461-466.
- [32] JC Rodríguez-Cabello y col. “Structural investigation of the poly (pentapeptide) of elastin, poly (GVGVP), in the solid state”. En: *Macromolecular Chemistry and Physics* 200.8 (1999), págs. 1831-1838.
- [33] JC Rodríguez-Cabello y col. “Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications”. En: *Biotechnology journal* 6.10 (2011), págs. 1174-1186.
- [34] Tomasz Kowalczyk y col. “Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers”. En: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30.8 (2014), págs. 2141-2152.
- [35] Filippo Cipriani. “Engineering responsive and biomimetic material based on elastin-like recombinamers for biomedical application”. Tesis doct. Universidad de Valladolid, 2019.
- [36] Paul Berg y Janet E Mertz. “Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology”. En: *Genetics* 184.1 (2010), págs. 9-17.
- [37] David A Micklos, Greg A Freyer y col. *DNA science; a first course in recombinant DNA technology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

- [38] Harvey Lodish y col. “DNA cloning with plasmid vectors”. En: *Molecular Cell Biology. 4th edition*. WH Freeman, 2000.
- [39] Miguel González Pérez y José Carlos Rodríguez Cabello. “Polímeros obtenidos mediante tecnología recombinante: Recombinómeros de tipo elastina”. En: *Revista de plásticos modernos: Ciencia y tecnología de polímeros* 115.731 (2018), pág. 3.
- [40] JC Rodríguez-Cabello, L Quintanilla-Sierra y C García-Arévalo. “Self-assembly in elastin-like recombinamers: A mechanism to mimic natural complexity”. En: *Materials Today Bio* 2 (2019), pág. 100007.
- [41] José Carlos Rodríguez-Cabello y col. “Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials”. En: *Nanotechnology in Regenerative Medicine*. Springer, 2012, págs. 17-38.
- [42] Malcolm Weller y col. *Protein phosphorylation*. Pion Ltd., 1979.
- [43] Carlos Felipe Barrera-Ramírez y col. “El otro genoma: El concepto clínico de las citopatías mitocondriales o enfermedades de la fosforilación oxidativa”. En: *Rev Invest Clin* 51 (1999), págs. 121-34.
- [44] Charles S Rubin y Ora M Rosen. “Protein phosphorylation”. En: *Annual review of biochemistry* 44.1 (1975), págs. 831-887.
- [45] Gerard Manning y col. “The protein kinase complement of the human genome”. En: *Science* 298.5600 (2002), págs. 1912-1934.
- [46] John B Shabb. “Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase”. En: *Chemical reviews* 101.8 (2001), págs. 2381-2412.
- [47] Erich Gnaiger. “Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology”. En: *The international journal of biochemistry & cell biology* 41.10 (2009), págs. 1837-1845.
- [48] JC Rodríguez-Cabello y col. “Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas”. En: *Biomecánica* 19.1 (2011), págs. 8-16.
- [49] Diego Venegas Vásconez. *Calorimetría diferencial de barrido*. 2017.
- [50] Santiago Suriñach Cornet Suriñach y col. “La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales”. En: *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 1992, vol. 31, num. 1, p. 11-17* (1992).
- [51] G Patterson y M Sobral. “Efecto Peltier”. En: *Departamento de Física FCEyN, Universidad de Buenos Aires. Dic* (2007).
- [52] Alejandro Beldarraín. “Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas”. En: *Biotecnología Aplicada* 18.1 (2001), págs. 10-16.
- [53] Dayana Acebo-González y Armando T Hernández-García. “Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida”. En: *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 44.1 (2013).
- [54] A Cuadros-Moreno y col. “Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas.” En: *Latin-American Journal of Physics Education* 8.4 (2014), pág. 14.

- [55] Carlos Luis Alarcón-Robledo y Jonathan Estévez-Fernández. *Modelo de Einstein para el movimiento browniano*.
- [56] Luciano Sandoval Yoval y col. “Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer”. En: *Instituto Mexicano de tecnología del Agua*. (2013).
- [57] John B Shabb. “Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase”. En: *Chemical reviews* 101.8 (2001), págs. 2381-2412.
- [58] A Hernández. *Microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa*. Vol. 4. Editum, 1990.
- [59] Ajeet Kumar y Chandra Kumar Dixit. “Methods for characterization of nanoparticles”. En: *Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids*. Elsevier, 2017, págs. 43-58.
- [60] J Carlos Rodríguez-Cabello y col. “Effect of NaCl on the exothermic and endothermic components of the inverse temperature transition of a model elastin-like polymer”. En: *Biomacromolecules* 8.2 (2007), págs. 354-358.
- [61] J Andrew MacKay y col. “Quantitative model of the phase behavior of recombinant pH-responsive elastin-like polypeptides”. En: *Biomacromolecules* 11.11 (2010), págs. 2873-2879.
- [62] Xiaomeng Zhang, Yuxiang Lin y Robert J Gillies. “Tumor pH and its measurement”. En: *Journal of Nuclear Medicine* 51.8 (2010), págs. 1167-1170.