



Universidad de Valladolid



Trabajo de fin de máster:

Producción y caracterización de un biopolímero tipo elastina con propiedades mucoadhesivas para aplicaciones biomédicas.

Autor: Jonathan Vásquez Calero.

Tutores: Dr. Francisco Javier Arias; Dra. Alessandra Girotti.

Valladolid, Julio 2022

Agradecimientos

Mi más profunda gratitud a mi madre, Martha, a quien dedico este trabajo.

Agradezco a mi familia, en especial a mi padre y mi hermana por apoyarme y darme fuerzas.

Estoy muy agradecido con las personas que contribuyeron generosamente con su tiempo y sus conocimientos para el desarrollo de esta obra.

A mis tutores Javier y Alessandra, quienes pacientemente me orientaron en este increíble campo en la investigación biomédica.

A Sara, por toda su ayuda y compañerismo en el laboratorio.

“Excelsior”



Contenido

Resumen	2
I. Introducción	3
1.1. Administración de agentes terapéuticos por vía oftálmica.....	3
1.2. Elastina y los polímeros tipo elastina.....	4
II. Objetivos	6
III. Materiales y métodos	7
3.1. Materiales	7
3.2. Métodos.....	7
3.2.1. Transformación de la cepa bacteriana BLR para la producción del polímero (KI) ₂	7
3.2.2. Screening de la cepa bacteriana BLR transformada.....	7
3.2.3. Producción en flask de la cepa bacteriana BLR transformada productora del polímero (KI) ₂	8
3.2.4. Extracción y purificación del polímero (KI) ₂	10
3.2.5. Caracterización de ELP (KI) ₂	11
3.2.6. Caracterización de la partícula formada por (KI) ₂	12
3.3. Tamaño de partícula y ensayo de mucoadhesión.	13
IV. Resultados y discusión.....	14
4.1. Producción del polímero del ELP (KI) ₂	14
4.2. Purificación del ELP (KI) ₂	15
4.3. Caracterización del ELP (KI) ₂	15
4.3.1. SDS-PAGE.....	15
4.3.2. RMN.....	16
4.3.3. Análisis por RMN-H del nivel de protonación del ELP (KI) ₂ según el pH.....	17
4.3.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF.	18
4.3.5. Análisis de Temperatura de transición por DLS.	19
4.4. Caracterización de la partícula formada por (KI) ₂	20
4.4.1. Distribución de tamaño de la partícula de (KI) ₂ por DLS y potencial Z por LD.	20
4.4.2. Distribución de tamaño de la partícula de (KI) ₂ a 0 °C por DLS	21
4.4.3. Tratamiento de la partícula de ELP (KI) ₂ con detergentes	22
4.4.4. Determinación del tamaño de partícula mediante AFM.....	23
4.4.5. Distribución del tamaño de suspensión de mucina mediante DLS.....	23
4.5. Tamaño de partícula y ensayo de mucoadhesión.	24
V. Conclusiones.....	27
VI. Bibliografía.....	28
VII. Anexos	30

Resumen

El presente trabajo de fin máster se enfoca en la producción y caracterización de un polímero polipeptídico tipo elastina (ELP) para aplicaciones biomédicas. Los polímeros basados en la elastina natural se han popularizado en investigación biomédica debido a sus características de biocompatibilidad, propiedades mecánicas, facilidad de producción, y funcionalización. El polímero aquí estudiado (KI)₂ tiene una estructura de copolímero en bloque formado por una parte hidrofílica debido al bloque elastomérico basado en lisina y una parte hidrofóbica debido al bloque que contiene isoleucina. El bloque elastomérico basado en lisina le confiere propiedades mucoadhesivas a través de interacciones electrostáticas con las mucinas. Los dispositivos mucoadhesivos presentan gran interés en la administración dirigida de fármacos, tanto por la amplia representación en el organismo de sus dianas, las mucosas, cuanto por sus propiedades de adsorción. ELP (KI)₂ fue bioproducido en *E. coli* y purificado aplicando métodos fisicoquímicos con su extracción desde los cuerpos de inclusión, y un rendimiento de 13,6 mg/L, se comprobó que la molécula obtenida tenía un peso acorde con el valor teórico de 93,762 Da y una pureza del 80,5 %. También se analizó su capacidad para producir nanopartículas autoensambladas con un tamaño de 246,3 nm y una carga superficial de +27,68 mV según las técnicas DLS y AFM. Por último, el ensayo de mucoadhesión permitió verificar que existe interacción entre las nanopartículas del polímero (KI)₂ y la mucina de cerdo tipo III, en el punto más alto de interacción de ambos compuestos formaron agregados de tamaño mayor con una carga superficial neutra, demostrando que al existir interacción las cargas tienden a anularse y el tamaño de la partícula formada es muy superior al de los compuestos individuales.

Abstract

The present work focuses on the production and characterization of an elastin-type polypeptide polymer (ELP) for biomedical applications. Natural elastin-based polymers have become popular in biomedical research due to their biocompatibility, mechanical properties, ease of production, and functionalization characteristics. The polymer studied here (KI)₂ has a block copolymer structure formed by a hydrophilic part due to the lysine-based elastomeric block and a hydrophobic part due to the isoleucine-containing block. The lysine-based elastomeric block confers mucoadhesive properties through electrostatic interactions with mucins. Mucoadhesive devices are of great interest in the targeted administration of drugs, both because of the wide representation of their targets in the body, the mucous membranes, and because of their adsorption properties. ELP (KI)₂ was bioproduced in *E. coli* and purified by applying physicochemical methods with its extraction from the inclusion bodies, and a yield of 13,6 mg/L, it was found that the molecule obtained had a weight in accordance with the theoretical value of 93,762 Da and a purity of 80.5%. Their ability to produce self-assembled nanoparticles with a size of 246,3 nm and a surface charge of +27,68 mV was also analysed according to DLS and AFM techniques. Finally, the mucoadhesion test allowed to verify that there is interaction between the polymer nanoparticles (KI)₂ and type III pig mucin, at the highest point of interaction of both compounds they formed larger aggregates with a neutral surface charge, demonstrating that when there is interaction, the charges tend to cancel each other out and the size of the formed particle is much greater than the individual compounds.

I. Introducción

1.1. Administración de agentes terapéuticos por vía oftálmica

Los medicamentos oculares son administrados en forma semisólidas pomadas o en forma líquida como colirios. Se utilizan con fines terapéuticos para prevenir la infección o la inflamación, promover el bienestar y prevenir daños en las estructuras oculares. La administración tópica de medicamentos oftálmicos es la más adecuada para el tratamiento de la córnea, la conjuntiva, las estructuras del segmento anterior y el cuerpo ciliar¹. La eficacia de las formas farmacéuticas oculares se relaciona principalmente con el volumen de la solución administrada y la capacidad del saco conjuntival para albergar un determinado volumen de medicamento, siendo igual de importantes el agente terapéutico (AT) y el vehículo que lo transporta ya que de este último dependerá en gran medida la absorción y ampliación de los efectos terapéuticos por períodos más largos que los vehículos solubles en agua².

La superficie ocular está cubierta por una película lagrimal de 3 μm de espesor la cual tienen una función vital para proteger y lubricar la córnea (Figura 1), esta película consiste en una capa de mucina asociadas a la membrana y una capa fluida compuesta por mucinas solubles, fluidos, electrolitos, una variedad de proteínas y factores solubles producidos por las glándulas lagrimales y secretada por las células caliciformes. La matriz de proteínas, glicoproteínas y lípidos de las lágrimas funciona para mantener la superficie corneal en condiciones adecuadas, lubricada, los factores lacrimógenos también promueven la eliminación de desechos o contaminantes, cicatrización de heridas y suprimen la inflamación³. El proceso de eliminación de desechos a través de la lagrime que es indispensable para mantener el epitelio ocular sano también actúa como barrera fisiológica para el correcto desempeño de agentes terapéuticos oftálmicos debido a la expulsión junto con la lagrime, por esta razón es necesario el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos que interaccionen con la superficie ocular que permitan la acción correcta del agente terapéutico y aumenten la biodisponibilidad⁴.

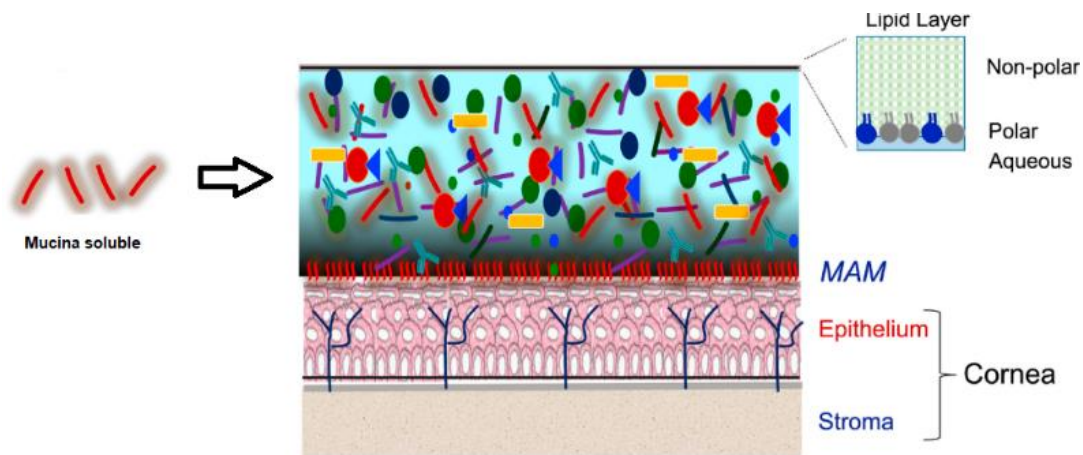


Figura 1. Estructura de la película lagrimal. MAM (Mucinas asociadas a membrana) ³.

1.2. Elastina y los polímeros tipo elastina

La elastina es una proteína de matriz extracelular con una estructura bioquímica única que proporciona elasticidad entrópica, es altamente hidrofóbica, ampliamente entrecruzada y se ensambla en fibras elásticas en un proceso dinámico que involucra células, receptores de superficie celular y numerosas proteínas asociadas a fibras como el colágeno ⁵. Debido a sus propiedades mecánicas la elastina es la proteína que proporciona la extraordinaria elasticidad duradera de las arterias y los pulmones ⁶.

Los polímeros tipo elastina (Elastin like polymer - ELP) son polipéptidos sintéticos obtenidos mediante ingeniería genética cuya estructura se basa en una secuencia que se encuentra en los dominios hidrofóbicos de la tropoelastina humana, esta secuencia contiene repeticiones del pentapéptido base formado por cinco aminoácidos, $(VPGXG)_n$, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y n equivale al número de repeticiones. La modificación aminoacídica del pentapéptido base, el número de repeticiones de este o la asociación con otras proteínas permiten controlar con precisión las propiedades físicas y funcionales de los ELP para una amplia variedad de aplicaciones ⁷.

Una propiedad importante de los ELP es su capacidad para experimentar una transición inversa con la temperatura (Inverse Temperature Transition - ITT), a temperaturas por debajo de su temperatura de transición (Transition Temperature - T_t) o temperatura de solución crítica inferior, son solubles en soluciones acuosas debido a que se produce el despliegue de la molécula impulsado por la entalpía ($\Delta H \downarrow$). Sin embargo, a medida que la temperatura se eleva por encima de la T_t , experimentan una contracción inducida entrópicamente ($\Delta S \uparrow$) causando un autoensamblaje, haciendo a los ELP insolubles y segregados del entorno ⁸.

Para entender el comportamiento soluble e insoluble de los ELP en función de la temperatura se debe tener en cuenta el cambio de plegamiento de la molécula, por debajo de su T_t las moléculas de ELP se encuentran en un estado desordenado y desplegado, la forma desplegada permite la interacción con moléculas de agua causando hidratación hidrofóbica favorecida entálpicamente, debido a que las moléculas de agua se ordenan en torno a los residuos de aminoácidos hidrofóbicos apolares formando una estructura de tipo clatrato (Figura 2. a), permitiendo su solubilización. Cuando las moléculas se calientan sobre su T_t la estructura de tipo clatrato se elimina y las moléculas de ELP adoptan una forma ordenada y plegada (Figura 2. b) debido a la formación de interacciones hidrofóbicas inter e intramoleculares, lo que lleva a la desolvatación y agregación del polipéptido ⁹.

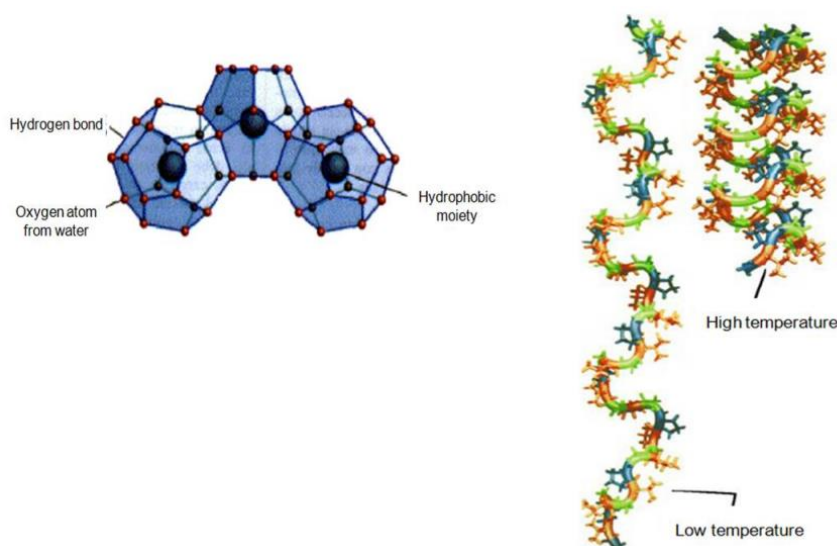


Figura 2. A) Estructura tipo clatrato formada por moléculas de agua en torno a la molécula desplegada por debajo de T_t . B) Representación de la cadena de ELP en estados plegado y desplegado ¹⁰.

El comportamiento de los ELP en función a su T_t produce cambios que son reversibles en la molécula siendo esta propiedad aprovechada en el diseño de los ELP. Los ELP se pueden expresar fácilmente a partir de un gen transmitido por un plásmido en huéspedes como *Escherichia coli* (*E. coli*) o *Pichia pastoris* y su comportamiento de transición de fase permite una rápida purificación a gran escala utilizando ciclos de temperatura inversos ⁷.

Los polímeros basados en proteínas se han popularizado en investigación biomédica debido a sus características, facilidad de producción, funcionalización y

biocompatibilidad, el uso de ingeniería genética permite el mejoramiento de los sistemas de administración de fármacos basados en proteínas con propiedades fisicoquímicas finamente ajustadas. Las proteínas basadas en elastina y sus polímeros (ELP) brindan una amplia gama de alternativas para diseñar sistemas de administración de fármacos debido a sus propiedades químicas y físicas inherentes a través de las posibilidades de ingeniería que ofrece la tecnología de ADN recombinante. En comparación con polímeros sintéticos usados en biomedicina o sistemas de reparto de medicamentos (drug delivery systems DDS), los polímeros a base de proteínas que consisten en secuencias de aminoácidos repetitivas naturales o diseñadas tienen ventajas de homogeneidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad sin productos de degradación tóxicos al degradarse producen aminoácidos los cuales son inocuos, solubilidad en agua en función de la temperatura y relativa facilidad de ampliación y procesamiento. Una de las limitaciones de la medicina moderna es la falta de transportadores de fármacos eficientes que cumplan su función principal, a saber, la liberación de un fármaco en un tejido objetivo, para conseguir dos beneficios: un aumento de la eficacia del fármaco y una reducción de los posibles efectos secundarios adversos ¹¹. A medida que los fármacos se vuelven más complejos y diversos, el control de la administración y liberación del fármaco se vuelve más exigente, la ingeniería genética permite el control de la secuencia, el tamaño de la proteína y su complejidad, lo que facilita la creación y el manejo de nuevos DDS con funciones ajustadas y controladas con precisión ¹².

II. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la obtención y posterior caracterización de un polímero tipo elastina recombinante con propiedades mucoadhesivas, obtenido por bioproducción en *E. coli*.

Objetivos secundarios:

1. Producir el polímero tipo elastina a partir de una cepa de *E. coli*.
2. Caracterizar el polímero tipo elastina y sus nanopartículas utilizando diversas técnicas instrumentales.
3. Determinar la capacidad de mucoadhesión del polímero como aplicación biomédica.

III. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Equipos. Consultar Anexo 1.

Reactivos. Consultar Anexo 4.

3.2. Métodos

3.2.1. Transformación de la cepa bacteriana BLR para la producción del polímero (KI)₂

La transformación de la cepa BLR de *E. coli* se realizó utilizando un método de choque térmico. El proceso inició con la descongelación de un vial que contenía una alícuota de 20 µL de células conservadas a -80 °C en hielo durante 5 minutos. Dentro de la cámara de flujo laminar se transfirieron 20 µL de la suspensión de bacterias en un tubo de 15 mL, se añadió 1 µL de ADN plasmídico [78.7 ng/µL] y se dejó incubando durante 20 minutos en hielo. Previamente se preparó el baño termostático a 42 °C, pasado el tiempo de incubación en frío se sometió el tubo con las células al baño termostático durante 30 segundos exactos debido a que respetar el tiempo del choque térmico es crucial para el éxito de la transformación. Se atemperó el tubo durante 2 minutos en hielo. Dentro de la cámara de flujo laminar se añadieron 80 µL de SOC a temperatura ambiente. Se dejó incubar las células en el vial a 37 °C durante 1 hora con agitación.

En dos placas con agar LB suplementadas con ampicilina se añadieron respectivamente 25 µL de medio SOC y se extendieron con un asa de vidrio triangular, se añadieron 25 µL de la transformación y se extendieron con un asa de vidrio. Se incubaron las placas durante 16 horas a 37 °C.

3.2.2. Screening de la cepa bacteriana BLR transformada

Pasadas las 16 horas de incubación se seleccionaron 8 colonias separadas y se marcaron con un rotulador por fuera de la placa con números de 1 al 8. Dentro de la cámara de flujo laminar se picaron las 8 colonias seleccionadas y se depositaron en 8 tubos que contenían 5 mL de medio LB con ampicilina cada uno. Se cultivaron los tubos 16 horas a 37 °C con agitación constante 250 rpm. Se conservó la placa con las 8 colonias originales en refrigeración a 4 °C.

Trascurrido el tiempo de cultivo, se realizaron varios lavados tomando alícuotas de 1 mL de cada uno de los 8 tubos y añadiendo en tubos de centrifuga de 1.5 mL etiquetados, los tubos se centrifugaron durante 45 segundos a 13400 revoluciones por minuto (rpm) y se descartaron los sobrenadantes por decantación, se resuspendieron los pellets añadiendo 1 mL de agua milli-Q, se agitaron los tubos con un agitador vórtex. Se repitió

el proceso de lavado 2 veces. Después de los lavados se desecharon los sobrenadantes por decantación y se resuspendieron los pellets con 200 μ L de agua milli-Q. Se tomaron alícuotas de 20 μ L de cada tubo y se añadieron en tubos de 1 mL con seguro para calentamiento, se añadió 5 μ L de buffer de carga de proteínas para electroforesis en cada uno de los 8 tubos. Se hirvieron los tubos durante 5 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 13400 rpm.

Para la electroforesis de proteínas se utilizó un gel de acrilamida SDS-PAGE resolving 10% - stacking 4%, se cargaron en el gel alícuotas de 5 μ L de las muestras y 5 μ L de marcador de peso molecular, se utilizó un amperaje constante de 25 mA durante 1 h y 10 minutos hasta que las bandas del bromofenol blue se perdieron en la parte inferior del gel ¹³. Posterior a la electroforesis se tiñó el gel con cloruro de cobre durante 3 minutos hasta que se distinguieron las bandas, se lavó el gel con agua destilada y se obtuvo la imagen con el equipo de revelado.

Posteriormente se realizó un segundo screening de las células transformadas a partir de la colonia 1 siguiendo el mismo procedimiento.

3.2.3. Producción en flask de la cepa bacteriana BLR transformada productora del polímero (KI)₂

Preparación del preinóculo

Una vez seleccionada la colonia más óptima para la producción del polímero (KI)₂ se inició el proceso de producción en flask con la preparación del preinóculo. Dentro de la cámara de flujo laminar, en un tubo de 50 mL se añadieron 5 mL de medio LB, con ampicilina 1000x (100 mg/mL de Ampicilina) y 250 μ L de glucosa al 20%. Se picó la colonia 1,4 en el tubo y se incubó a 37 °C durante toda la noche en agitación continua a 250 rpm.

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizaron dos matraces Erlenmeyer de 250 mL, se añadieron a cada uno 30 μ L de medio LB con ampicilina 1000x, 1,5 μ L de glucosa al 20% y 100 μ L del preinóculo. Se incubaron los matraces a 37 °C de temperatura con agitación constante durante 8 horas.

Inoculación

Para la inoculación se utilizaron 10 matraces Erlenmeyer de 2 litros estériles, se añadió en cada uno de los matraces 150 mL de medio LB, 250 mL de medio TB con ampicilina y 1 mL de inóculo. Se incubaron los matraces a 37 °C durante 16 horas con agitación constante. Se tomaron 2 alícuotas de 1 mL del inóculo y se conservaron a 4 °C. Se preparó el control negativo usando la misma cepa de *E. coli* sin transformar. En un tubo de centrifuga de 50 mL se añadieron 5 mL de medio, 5 µL de ampicilina y 1 mL del inóculo como control positivo, en otro tubo de centrifuga de 50 mL se añadieron 5 mL de medio y 5 µL de ampicilina como control negativo. Ambos tubos se incubaron junto con los 10 matraces.

Parado de la producción

Pasado el tiempo de incubación se midieron las absorbancias tomando muestras del cultivo en los matraces, control positivo e inóculo. Se tomaron 2 alícuotas de 1 mL de los matraces y se conservaron en dos tubos de centrifuga, el primer tubo se centrifugo durante 45 segundos a 13400 rpm y se conservó el sobrenadante que se utilizó como blanco para la medición en el fotómetro, del segundo tubo se tomaron 100 µL, se añadieron en una cubeta junto con 900 µL de agua destilada milli-Q obteniendo una dilución de 1-10 y se midió la absorbancia a 600nm.

Pasados 30 minutos de la primera medición de la absorbancia del cultivo se tomaron 2 alícuotas de 1 mL para realizar una segunda medición. El valor obtenido se comparó con el valor de la primera medición, debido a que ambos valores no variaron se detuvo la producción.

Comprobación de la presencia del polímero (KI)₂

Después de que se detuvo la producción se realizó una electroforesis de las muestras de producción, control positivo, control negativo e inóculo para comprobar la presencia del polímero. Se centrifugaron las muestras durante 45 segundos a 13400 rpm, se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron los pellets en 1 mL de agua milli-Q y se agitaron con un agitador vórtex, se centrifugaron las muestras durante 45 segundos a 13400 rpm y se descartaron los sobrenadantes. Se resuspendieron las muestras en un volumen de agua milli-Q teniendo en cuenta la absorbancia y el volumen de muestra para cargar en el gel.

De acuerdo con los valores de las absorbancias obtenidos se resuspendieron las muestras añadiendo un volumen de 100 μ L de agua milli-Q, se tomaron alícuotas de 20 μ L y se añadieron 5 μ L de buffer de carga de proteínas, se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se centrifugaron a 13400 rpm durante 45 segundos.

Para correr la electroforesis se utilizó el método para SDS-PGE descrito anteriormente en este capítulo apartado 3.2.2.

3.2.4. Extracción y purificación del polímero (KI)₂

El proceso de extracción que se ilustra en la Figura 3, inició con el lavado de la biomasa para eliminar el medio de cultivo que no haya sido aprovechado durante el crecimiento de la célula, después de someter a varios lavados hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente y claro se conservó el pellet de bacterias. El pellet obtenido se resuspendió en el tampón de sonicación 1x, se sometió a un proceso de sonicación con sonda para romper la célula bacteriana y liberar el ELP, debido a que al momento de romperse la célula también se liberan proteínas endógenas y enzimas fue necesario utilizar enzimas inhibitoras de proteasas PSMF e Hidrato de clorhidrato de benzamidina para impedir la degradación del ELP. El producto de la sonicación fue centrifugado y se conservó el pellet y el sobrenadante cuyo contenido proteico fue analizado en una electroforesis de proteínas, el contenido proteico de todas las fracciones de la purificación fue verificado mediante electroforesis. El pellet obtenido que contenía el ELP junto con residuos propios de la célula bacteriana fue disuelto en detergente catiónico para solubilizarlo, posteriormente se centrifugó y se conservó el sobrenadante. El sobrenadante fue dializado con una membrana (DTV12000.10.15 14064) de 14 KDa de cut-off en 60 litros de agua a temperatura ambiente para facilitar la remoción del detergente, posterior a la diálisis, el contenido de la membrana se centrifugó y se conservó el sobrenadante. El sobrenadante se llevó a pH 10 con el propósito de alcanzar el punto isoeléctrico del residuo de lisina y lograr la precipitación del polímero, se sometió a baño termostático a 42°C, se centrifugó y se conservó el pellet. El pellet se resuspendido en buffer (Tris pH 6.8 10 mM) over night y se centrifugó a 4°C conservando el sobrenadante. Previo al proceso de liofilización el sobrenadante fue sometido a diálisis para eliminar restos de impurezas posteriormente se congeló a -20°C para finalmente ser liofilizado durante toda la noche para retirar el agua y conservar el ELP. Durante cada uno de los pasos de centrifugación en los que se conservó el pellet o sobrenadante se realizó electroforesis SDS-PAGE utilizando el método descrito en el apartado 3.2.2, para determinar la presencia del ELP basándose en el tamaño teórico de 93.762 Da.

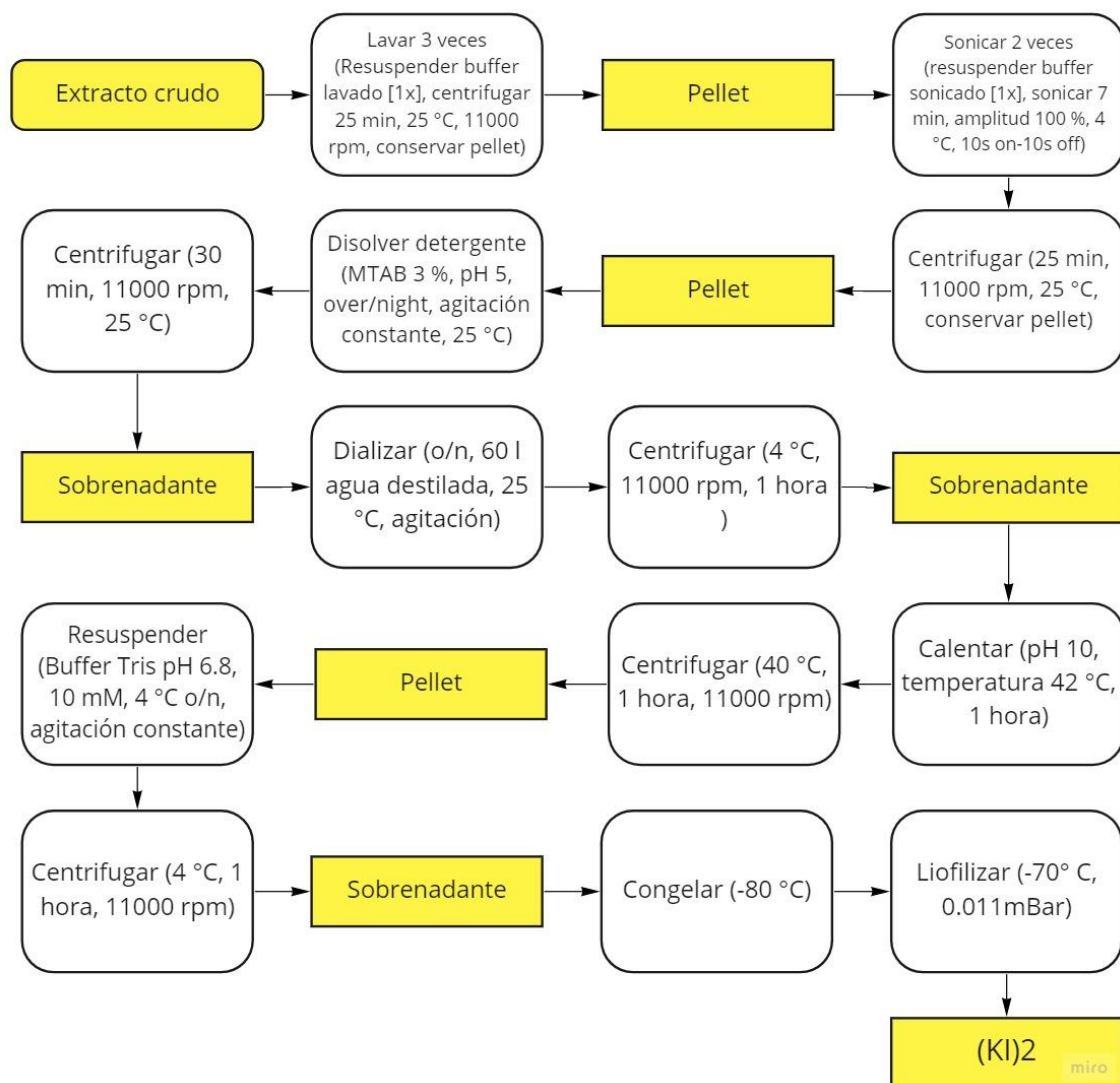


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de extracción y purificación de ELP.

3.2.5. Caracterización de ELP (KI)₂

Posterior a la purificación del polímero este se utilizó cuatro técnicas para su caracterización con el objetivo de comprobar que la molécula obtenida concordaba con la información teórica.

SDS-PAGE del ELP (KI)₂

Después de la extracción y purificación del polímero se separó en una electroforesis utilizando el método descrito en el apartado 3.2.2.

Para preparar la muestra para la electroforesis se disolvió 1 mg del ELP (KI)₂ en 1 mL de agua destilada milli-Q a una temperatura de 4°C durante la noche con agitación constante.

Resonancia Magnética nuclear.

Se hizo un ensayo de resonancia magnética nuclear (RMN) con un equipo 400 Agilent Technologies del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid (LTI), se preparó una muestra de $(KI)_2$ de 600 μ l con una concentración de 5mg/mL disuelto en agua deuterada D_2O . Se prepararon también muestras de detergente MTAB disueltas en agua deuterada en concentraciones de 0,12 M y una dilución de 1/10 de la misma. Se analizaron además muestras de 500 μ l del proceso de purificación del polímero antes de diálisis y durante la diálisis utilizando capilar con agua deuterada. Se analizaron además muestras del polímero $(KI)_2$ disuelto en agua deuterada 5mg/mL con un pH 3 y pH 8 para determinar el nivel de protonación.

Espectrometría de masas MALDI-TOF.

Se utilizó el análisis de espectrometría MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) acoplado a la detección del tiempo de vuelo TOF (Time-Of-Flight), para determinar la masa molecular del ELP $(KI)_2$, se escogió esta técnica ya que permite la determinación de masa a través de una ionización suave conservando intactas aquellas moléculas que podrían ser termolábiles.

Para preparar la muestra para análisis MALDI-TOF se disolvieron 2 mg del ELP $(KI)_2$ en 1 mL de agua destilada milli-Q a una temperatura de 4°C por la noche. La medición la realizó un técnico encargado del LTI en un equipo Bruker RMN Auto Flex Speed.

Análisis de la Temperatura de transición por DLS.

Para determinar la temperatura de transición del ELP $(KI)_2$ se utilizó la técnica DLS en un equipo Malvern Panalytical ZetaSizer Pro del LTI. Para medir el tamaño en función de la temperatura se elaboró una rampa de temperatura de 4 a 40 °C, se utilizó una cubeta DTS0012 y 1 ml de muestra en concentración 1mg/mL.¹⁴

3.2.6. Caracterización de la partícula formada por $(KI)_2$

Tamaño de partícula y potencial Z.

Para determinar el tamaño de las partículas formadas por el ELP $(KI)_2$ en el rango nanométrico se utilizó la técnica DLS. Para determinar el potencial z de las partículas se utilizó velocimetría Láser-Doppler (LD), ambas mediciones se realizaron en el LTI.

Para preparar la muestra para los análisis se disolvieron 2 mg del ELP $(KI)_2$ en 1 mL de agua destilada milli-Q a una temperatura de 4°C o/n con agitación constante de 36 rpm. Se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en una cubeta plástica DTS0012, se estableció el tiempo de equilibrio en 60 segundos y el rango de temperaturas. Para medir

el potencial Z se tomó una alícuota de 1 mL y se cargó en una cubeta DTS 1070, se estableció el tiempo de equilibrio en 60 segundos y la temperatura.

Determinación del tamaño de partícula mediante AFM.

Se utilizó la microscopía de fuerza atómica con el equipo 3D Infinity bio Asylum Research AFM para analizar la partícula formada por $(KI)_2$, se tomó una alícuota de 50 μ L del polímero disuelto en concentración 1mg/mL, se colocó sobre una placa de mica y se dejó secar a 37°C, se lavó la placa con 1mL de agua milli-Q, se secó con flujo de aire y se colocó al microscopio, el análisis y procesamiento de la imagen lo realizó personal del LTI.

Preparación de suspensión de mucina

Para realizar ensayos de mucoadhesión del ELP se preparó una suspensión de mucina con una concentración de 1mg/mL. En un vaso de precipitación se pesaron 30 mg de mucina de cerdo tipo III y se añadieron 30 mL de agua milli-Q, se tapó con parafilm, se dejó en agitación constante durante 16 horas a una temperatura de 37 °C para facilitar la formación de la suspensión coloidal.

Después del periodo de agitación una alícuota de la suspensión de mucina se sometió a un baño de sonicación durante 15 minutos en un vaso de precipitación. Posteriormente se trasvaso el contenido del vaso de precipitación a un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 revoluciones por minuto y se conservó el sobrenadante. Otra alícuota de la suspensión se sometió a sonicación con sonda con refrigeración a 4 °C durante 15 minutos con periodos de 10 s on – 10 s off para evitar el sobrecalentamiento y con una amplitud de 100 %. Posteriormente se trasvaso el contenido del vaso de precipitación a un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 revoluciones por minuto y se conservó el sobrenadante. Los sobrenadantes de ambos tratamientos se analizaron para determinar el tamaño de las partículas de mucina disueltas utilizando la técnica DLS y el potencial Z con la técnica LD.

3.3. Tamaño de partícula y ensayo de mucoadhesión.

Para el ensayo de mucoadhesión se utilizaron las técnicas de DLS y LD, se prepararon varias mezclas de mucina con una concentración 1mg/mL y polímero $(KI)_2$ con una concentración de 1mg/mL con distintas proporciones de mucina y manteniendo la cantidad de polímero constante. También se utilizó la técnica de LD para medir la interacción de cada una de las relaciones polímero-mucina.

IV. Resultados y discusión

4.1. Producción del ELP (KI)₂

Se valoró la producción bacteria producía del ELP (KI)₂ utilizando electroforesis SDS-PAGE¹⁶. Basándose en la secuencia de aminoácidos del ELP se determinó el peso molecular teórico utilizando el software Gene Runner, siendo este de 93.762 Da. El peso molecular calculado teóricamente permitió identificar en el gel la banda correspondiente al ELP (Figura 4) con el marcador de peso molecular se determinó por cálculo un valor aparente de 93 KDa, similar al teórico, de esta forma se confirmó que la bacteria se había transformado correctamente y producía tras la inducción una proteína del tamaño esperado. Mediante la electroforesis también se seleccionaron las colonias más productoras de acuerdo con la intensidad de la banda en comparación con las bandas correspondientes a las proteínas propias de las células, se escogieron a las colonias 1 y 5 para ser cultivadas en un segundo screening.

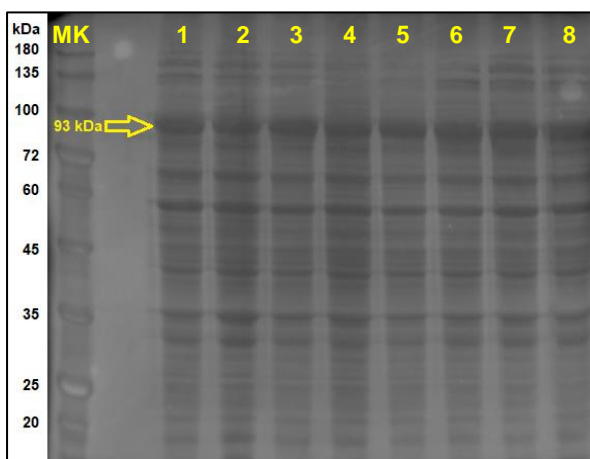


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE del primer screening. En la imagen se observa en la calle MK las bandas que corresponde al marcador de peso, las calles 1-8 corresponden a 8 colonias seleccionadas en el primer screening, la flecha amarilla señala la banda correspondiente al polímero (KI)₂.

En el segundo screening se seleccionó la colonia 1.4 (Figura 5) para el proceso de producción, esta colonia fue escogida por presentar una banda intensa y muy marcada siendo esto un indicativo de una mayor estabilidad y producción del polímero en comparación con las proteínas endógenas de la bacteria.

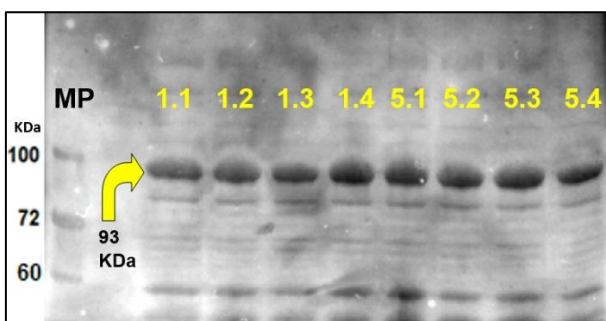


Figura 5. SDS-PAGE del segundo screening. En la imagen se observa en la primera calle el marcador de peso, las calles 1.1-1.4 corresponden a 4 colonias provenientes de la colonia 1 del primer screening, las calles 5.1-5.4 corresponden a 4 colonias provenientes de la colonia 5 del primer screening, la flecha amarilla señala la banda correspondiente al polímero (KI)₂.

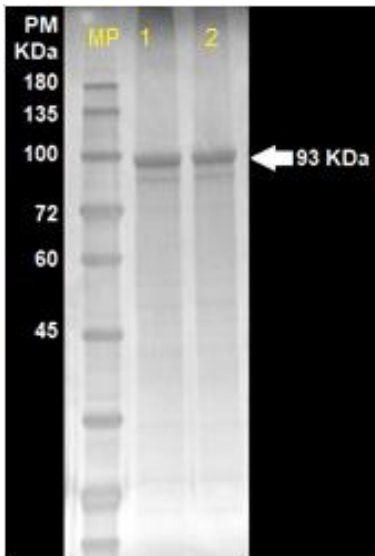
4.2. Purificación del ELP (KI)₂

Se eligió un proceso que combinaba ciclos de centrifugación a distintas temperaturas debido a que el proceso para la purificación de (KI)₂ no estaba establecido y el método más práctico para purificar polímeros basados en elastina es aprovechando su potencial de transición inversa con la temperatura. La purificación inició con ciclos del lavado y centrifugado para obtener un pellet compuesto por las células bacterianas, seguido el pellet se sometió a un proceso de sonicación y centrifugación para romper las células y liberar el ELP al medio, en este punto se utilizó PSMF e hidrato de clorhidrato de benzamidina para evitar la degradación del polímero a causa de las proteasas propias de la célula. El pellet obtenido se resuspendió utilizando el detergente catiónico MTAB para solubilizar la proteína y separar cuerpos de inclusión ¹⁷, se usó detergente catiónico para minimizar su interacción con el ELP por la naturaleza también catiónica del polímero. Se eliminó el detergente junto con otros compuestos a través de una membrana de 14 KDa utilizando diálisis. El producto de la diálisis se sometió a ciclos de transición inversa de temperatura modificando el pH de 10 para alcanzar el punto isoeléctrico del residuo de lisina del ELP y precipitar el polímero debido a que este es grupo dominante en carga en comparación con el resto de los residuos ¹⁸. El producto de los ciclos de purificación se liofilizó para eliminar el agua y mantener el polímero en forma sólida (Figura 3).

4.3. Caracterización del ELP (KI)₂

4.3.1. SDS-PAGE

El ELP obtenido se caracterizó mediante SDS-PAGE, MALDI-TOF, RMN y DLS, una electroforesis permitió verificar en primera instancia la presencia del (KI)₂ de acuerdo con su peso molecular (Figura 6). La electroforesis mostró que se habían eliminado casi en su totalidad las proteínas endógenas de la célula, sin embargo, también se observó la presencia de un componente de aproximadamente 80 KDa, que podría corresponder a un fragmento del ELP resultado de la degradación por acción de proteasas propias de *E. coli* ¹⁰, durante el proceso de purificación se utilizó enzimas inhibidoras de proteasas sin embargo un pequeño porcentaje del ELP pudo haberse degradado mientras se albergaba aun dentro de la célula bacteriana, la expresión de la proteína recombinante en *Escherichia coli* impulsada por una alta concentración de inductores resultan en la expresión de la proteína deseada a una tasa de traducción alta pero esto agota el sistema de control de calidad de las proteínas ¹⁹, pese a la presencia



de otras proteínas de menor peso molecular el porcentaje de pureza del ELP $(KI)_2$ recuperado después de la purificación final fue aproximadamente del 80,5% (Anexo 1).

Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE teñida con Azul de Coomassie. En la calle 1 se observa el marcador de peso (MP), las calles 2 y 3 corresponden a muestras del producto final del proceso de purificación del ELP $(KI)_2$.

4.3.2. RMN

Se utilizó el análisis RMN-H para comprobar la purificación del polímero respecto a la posible presencia del detergente MTAB utilizado durante la purificación y que podría interferir con los siguientes experimentos. La figura 7 muestra la integración de la señal de grupo $N-(CH_3)_3$ que forma parte de la molécula de detergente MTAB (Anexo 2) el cual fue utilizado en el proceso de purificación (apartado 1.3.4.), este grupo presentó una señal específica a 2,806 ppm que puede desplazarse hasta 2,7 cuando se diluye el detergente. Al comparar la señal del detergente con la de la muestra sin diálisis (verde) se observa la presencia de este grupo con una señal de 2,77 ppm, en contraste no hay una señal detectable en las muestras dializada (azul) o de polímero purificado (magenta) lo que indica que el proceso de purificación fue adecuado.

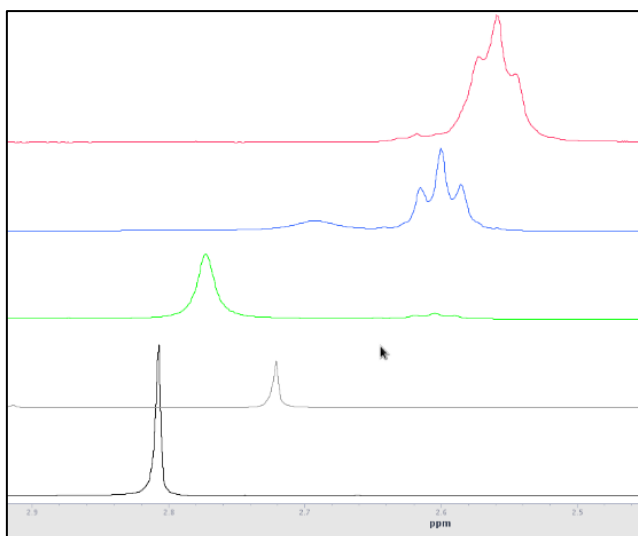


Figura 7. Análisis RMN grupo $N-(CH_3)_3$. Señales colocadas en sentido ascendente según el siguiente orden: - (línea negra) MTAB 0,012 M; - (gris) MTAB diluido 1/10; - (verde) Muestra de $(KI)_2$ sin diálisis; - (azul) Muestra de $(KI)_2$ diálisis; - (magenta) Muestra de $(KI)_2$ purificado (pH 8)

Se tomó en cuenta también los grupos metileno $-CH_2-$ del detergente (figura 8), este grupo presentó una señal característica a 0,934 ppm en la integración de la señal de detergente concentrado (negro) que puede desplazarse hasta 0,9 cuando se diluye

(gris), al comparar la señal del grupo metileno con la de la muestra sin diálisis se observa la presencia de este grupo con un valor menor de 0,889 ppm (verde), de igual forma que el grupo $N-(CH_3)_3$ tampoco se evidencia una señal detectable en las muestras dializada (azul) o de polímero purificado (magenta).

Por tanto, puede concluirse que en la purificación del polímero se ha podido eliminar adecuadamente todo el detergente MTAB utilizado en el proceso y no podrá interferir en las siguientes etapas.

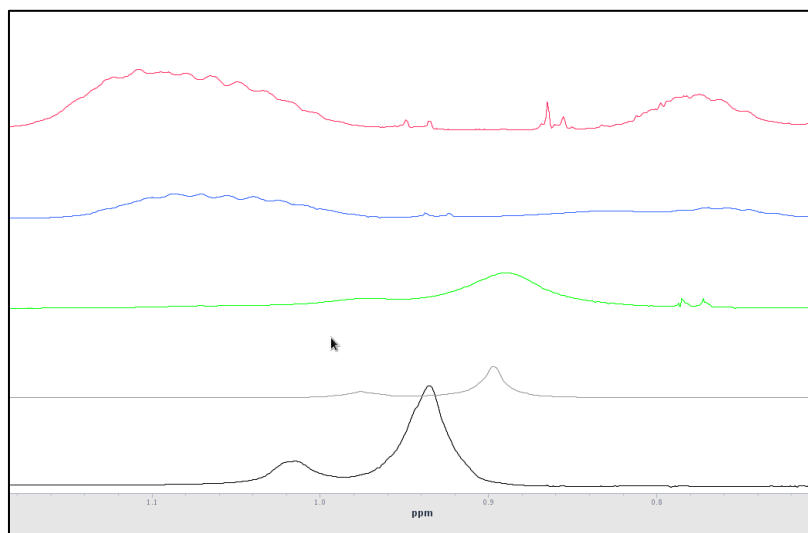


Figura 8. Análisis RMN del grupo $-CH_2-$. Señales colocadas en sentido ascendente según el siguiente orden: – (línea negra) MTAB 0,012 M; - (gris) MTAB diluido 1/10; - (verde) Muestra de $(KI)_2$ sin diálisis; - (azul) Muestra de $(KI)_2$ diálisis; - (magenta) Muestra de $(KI)_2$ purificado (pH 8).

4.3.3. Análisis por RMN-H del nivel de protonación del ELP $(KI)_2$ según el pH.

Los espectros de H-RMN de la figura 9 se obtuvieron de disoluciones del ELP $(KI)_2$ en concentración de 5 mg/mL en pH 3 y pH 7. La señal de integración de los grupos metilo muestra el espectro característico del grupo amina. El espectro azul esta disminuido y presenta un valor de 2,56 ppm pese a que ese nivel de pH debería estar protonado ya que teóricamente el grupo amino permanece en su forma NH_3^+ en un pH entre 2,06 y 8,95, presenta una protonación de solo 6%, en contraste en la señal de integración a pH 3 (espectro rojo) es notable el incremento en la señal correspondientes a los grupos amina protonados y alcanza un valor de 2,62 ppm con una protonación del 100%.

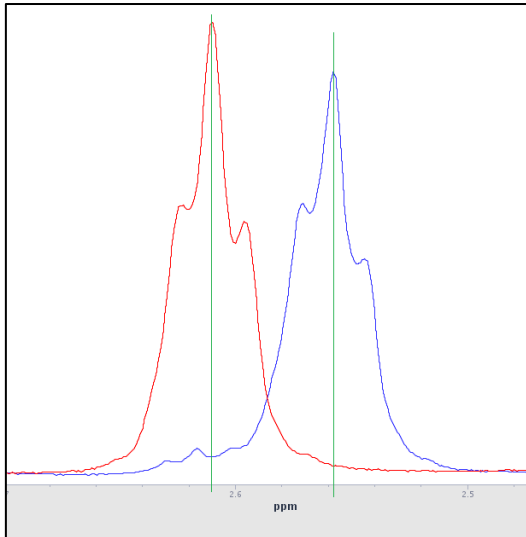


Figura 9. Análisis RMN-H del grupo amino de la cadena lateral de la Lisina del polímero (KI)₂. (Rojo) Polímero disuelto en agua deuterada a pH 3. (Azul) polímero disuelto en agua deuterada a pH 8.

4.3.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF.

El resultado de esta técnica permitió corroborar el peso molecular exacto del polímero (KI)₂ y la posible presencia de otras proteínas presentes en la muestra. El valor obtenido en el análisis MALDI-TOF indica un tamaño de promedio 93.498 Da (figura 10), en comparación con el valor del peso molecular teórico de 93.726 Da, existe una pequeña diferencia de 228 Da, este valor puede deberse a la eliminación del aminoácido de un extremo del polímero, la metionina tienen un peso de 149 Da y forma parte de la secuencia del control de expresión este aminoácido puede haber sido retirado después de la traducción del polímero disminuyendo ligeramente el peso molecular ²⁰, sin embargo la diferencia de peso representa el 0,2%, tomándose como adecuado el valor obtenido por MALDI-TOF en comparación con el valor teórico. En la figura 9 también se puede observar una señal de 80.955 Da, el tamaño de esta proteína concuerda con la banda encontrada en el análisis de SDS-PAGE el cual fue de 80 KDa.

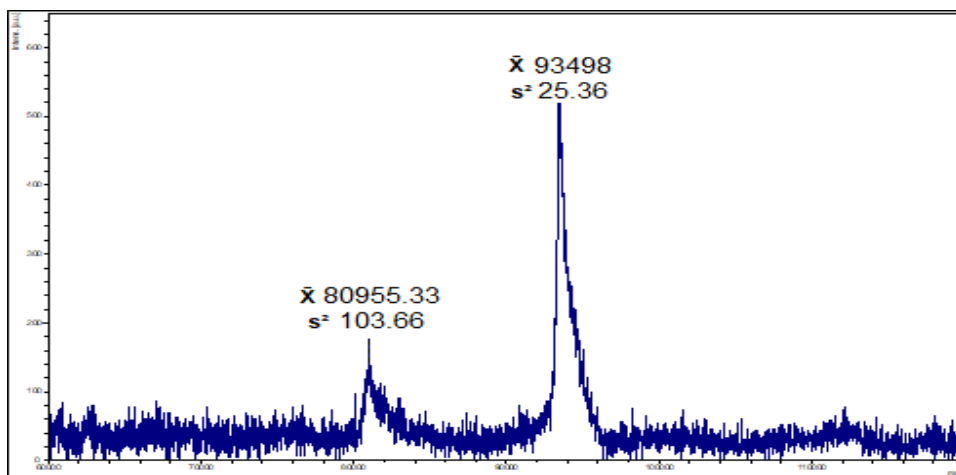


Figura 10. Valores de peso molecular obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF para el biopolímero (KI)₂.

4.3.5. Análisis de la **Temperatura de transición por DLS.**

El ensayo de determinación de Tt del ELP (KI)₂ por DLS se basó en la medición del tamaño del diámetro hidrodinámico en nm del polímero disuelto en agua con un pH de 7. Debido a que el ELP (KI)₂ está estructurado en forma de dibloque, formado por un bloque hidrofílico basado en el aminoácido huésped Lisina y un bloque hidrofóbico basado en Isoleucina se comparó con ELP (EI)₂ el cual también presenta una estructura dibloque anfipática y cuyo bloque hidrofóbico basado en Isoleucina es el mismo y tiene una temperatura de transición conocida, mientras que el bloque hidrofílico se basa en la presencia del aminoácido Glutámico.

En la figura 11 se observa el comportamiento del ELP (EI)₂ disuelto a 4°C cuando se somete a una rampa de temperatura, donde se puede apreciar que el polímero mantiene un tamaño inferior a 10 nm hasta los 18 °C punto en el cual hay un cambio notable en el tamaño el cual se incrementa hasta los 76 nm y luego se estabiliza en torno a 50 nm debido a que en esta temperatura el polímero comienza su transición formando partículas micelares, la Tt de 18°C le corresponde al bloque hidrofóbico que es el que presenta una temperatura de Tt siempre menor por causa del proceso de hidratación hidrofóbica de los residuos apolares, la Tt del bloque hidrofílico no es apreciable en este rango de temperatura probablemente debido a que supere los 40°C ya que este bloque tiene interacciones más fuertes con el agua ²¹. Este comportamiento ya se había observado en el caso del ELP dibloque EI con tamaños de agregación muy similares por lo que posiblemente la duplicidad de la cadena modifica el grado de agregación, pero mantiene las dimensiones de la nanopartícula.

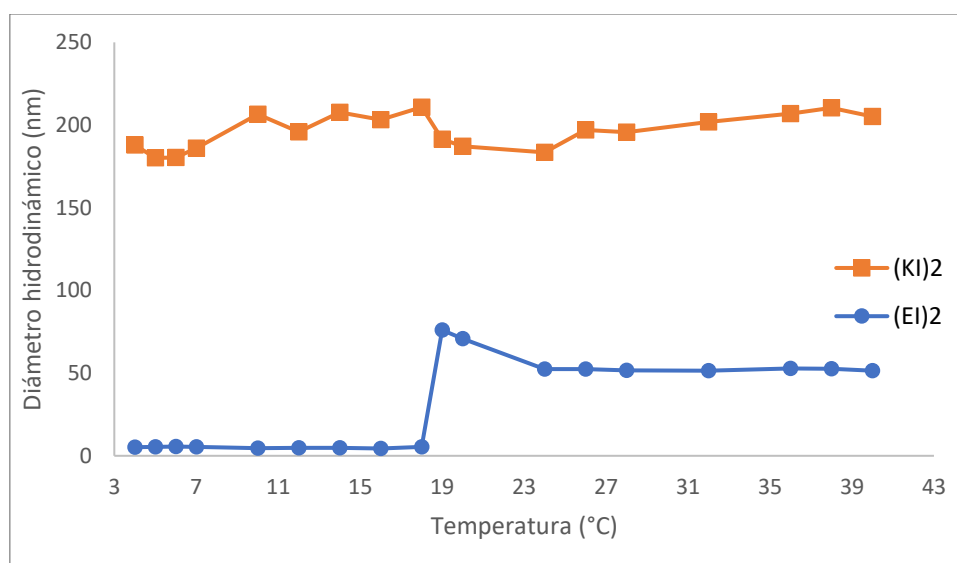


Figura 11. Análisis de la Temperatura de transición por DLS de los biopolímeros (KI)₂ y (EI)₂ disueltos a 4°C a pH 7.

El ELP (KI)₂ presentó en cambio un tamaño en torno a los 200 nm en cada uno de los puntos de medición de la rampa de temperatura, lo que indica que el polímero presentaba una estructura en una forma de partícula ensamblada sin depender de la temperatura analizada. Este comportamiento destaca claramente sobre el encontrado en el biopolímero (EI)₂ considerando además que ambos comparten el bloque hidrofóbico mientras que el hidrofílico son diferentes pero en ambos deberían mantener temperaturas de transición por encima de la temperatura fisiológica a pH 7. Este comportamiento por tanto no se ajusta al esperado según la composición y arquitectura del nuevo dibloque (KI)₂, puesto que el bloque hidrofóbico debería mostrar una Tt similar (18°C) aunque posteriormente se pudieran formar nanopartículas de dimensiones diferentes (de 50 a 200nm) que dependen del grado de compactación y número de agregación del biopolímero. Por ello se analizará las dimensiones y características de la nanopartícula resultante, así como su estabilidad en diferentes condiciones.

4.4. Caracterización de la partícula formada por (KI)₂

4.4.1. Distribución de tamaño de la partícula de (KI)₂ por DLS y potencial Z por LD.

La distribución del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) son características físicas muy importantes que deben tenerse en cuenta al crear productos para aplicaciones biomédicas ya que de estas dependerán las propiedades terapéuticas, el rendimiento del producto, la procesabilidad y la estabilidad. La tendencia de un sistema portador de un agente terapéutico a acumularse en el tejido diana depende de sus características fisicoquímicas, incluida la distribución del tamaño de las partículas, por lo tanto, la formulación exitosa de un portador de agente terapéutico seguro, estable y eficiente requiere la preparación de poblaciones homogéneas monodispersas y con un tamaño adecuado y estable en el tiempo ²³.

Las partículas formadas por agregados del ELP (KI)₂ se midieron por DLS a 37°C y pH 7, en estas condiciones el tamaño medio de la población de partículas fue de 246,3 nm (Tabla 1), esta población presentó un PDI bajo igual a 0,11 lo que indicó que la distribución de tamaño de las partículas formadas se mantenía uniforme, pues como referencia un valor de 0,1 de PDI es considerado como un sistema monodisperso (Figura 12). Así mismo puede observarse que la curva de correlación es muy regular y simétrica reforzando la monodispersidad de las nanopartículas. Se midió además el potencial Z de la partícula el cual fue de +27,68 mV, la carga positiva de la partícula es un factor que contribuye a mantenerla estable en tamaño, debido a que tiene lugar el

fenómeno de repulsión de cargas positivas entre las partículas y de esta forma no puede seguir agregándose, manteniendo un tamaño estable.

Tabla 1. Tamaño de partícula de ELP (KI)₂ y su índice de polidispersidad PDI.

Muestra	\bar{X} Tamaño de partícula (nm)	SD Tamaño de partícula	\bar{X} PDI	SD PDI	\bar{X} Potencial Z (mV)	SD Potencial Z
(KI) ₂	246,3	7,11	0,11	0,02	+27,68	0,93

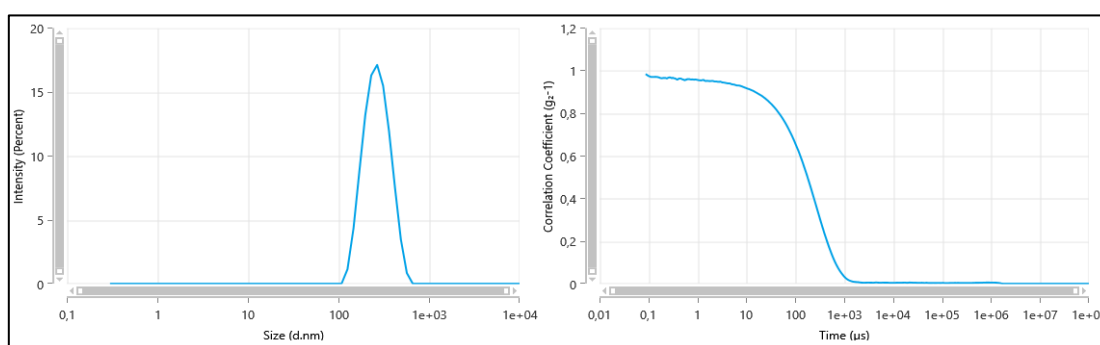


Figura 12. Análisis del tamaño por DLS: A) Distribución de tamaño por intensidad de partícula de ELP (KI)₂; B) Correlograma de partícula de ELP (KI)₂.

4.4.2. Distribución de tamaño de la partícula de (KI)₂ a 0 °C por DLS

Para estudiar el comportamiento anómalo del biopolímero (KI)₂ al no poder esclarecer su esperada temperatura de transición, pero mostrar un comportamiento como nanopartícula estable y congruente con su secuencia, se decide estudiar su índice de agregación en condiciones extremas. En el primer análisis se estudió la distribución de tamaños de partículas a 0 °C tras una incubación previa a esa temperatura durante 18h para que su grado de hidratación y transición molecular fuera completa. Como puede observarse la señal mostró dos nuevas poblaciones, la primera población en torno a los 120 nm y una segunda población con un tamaño medio de 8 nm (Figura 13). Por tanto, la medición a baja temperatura permitió verificar la disgregación parcial de las partículas de 246nm y también indicar que la Tt podría estar en torno a 0 °C o inferior. El índice de polidispersidad fue de 0,8 un valor muy elevado comparado con el PDI obtenido en la medición a temperatura fisiológica, lo que indicó que se perdió la uniformidad de las partículas al disminuir la temperatura y que en ese estado las partículas se estaban desagregando a un tamaño cercano al que le corresponde a la molécula de (KI)₂.

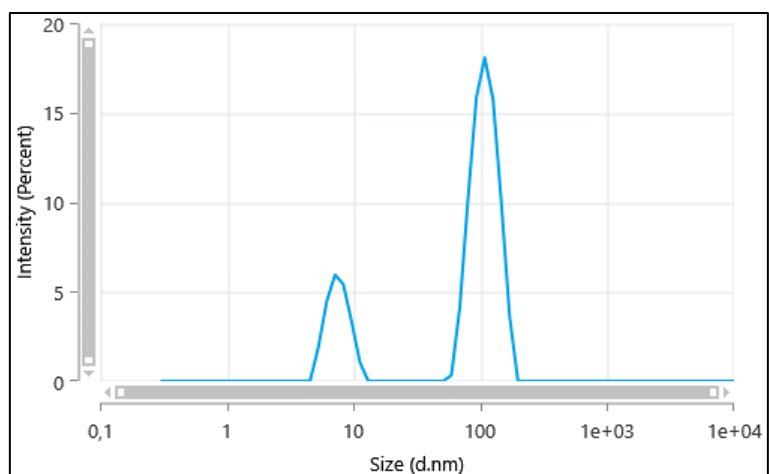


Figura 13. Distribución de tamaño por intensidad de partícula de ELP (KI)₂ medida a 0 °C.

4.4.3. Tratamiento de la partícula de ELP (KI)₂ con detergentes

El segundo análisis realizado para intentar disgregar las partículas formadas por (KI)₂ en condición de temperatura fisiológica se realizó con un tratamiento con diferentes detergentes (Tabla 2). En este caso se estudiaron los tamaños moleculares de la nanopartícula de (KI)₂ al ir añadiendo concentraciones crecientes de tres conocidos detergentes. Como se observa en la tabla, los tres detergentes lograron disgregar las partículas de unos 250nm del ELP a tamaños moleculares cercanos a 10 nm siendo valores similares al valor obtenido en la medición por DLS a 0 °C de 8 nm. Esto permitió comprobar que el tamaño observado en la medición a 0 °C corresponde probablemente a las moléculas de (KI)₂ tras la desagregación de las partículas que en las condiciones analizadas han sufrido la esperada transición inversa con la temperatura perdiendo su propiedad de reversibilidad.

En un ensayo control se analizaron también concentraciones equivalentes de los mismos detergentes en ausencia biopolímero resultando micelas de tamaño inferior al mostrado es este experimento.

Tabla 2. DLS de (KI)₂ tratado con detergente.

Detergente	SDS	Tritón X-100	Tween 20
Concentración (mg/mL)	1,0	5,35	1,1
̄ Tamaño (nm)	11,38	6,55	7,67
SD	0,28	0,57	0,17

4.4.4. Determinación del tamaño de partícula mediante AFM.

El análisis por AFM permitió corroborar el tamaño de la partícula medido por DLS en el apartado 5.3.1, si bien en el primer caso el ensayo se realiza sometiendo la muestra a un proceso de secado mientras que en el DLS la partícula se encuentra en disolución. En la Figura 14 se observa la imagen obtenida de una partícula aislada con un tamaño de 210 nm, esta medida es muy similar al valor observado por DLS el cual fue en promedio de 246 nm, considerando las diferencias de preparación de las muestras. Las figuras a-b permiten observar una forma con tendencia esférica debido a la agregación micelar de la partícula.

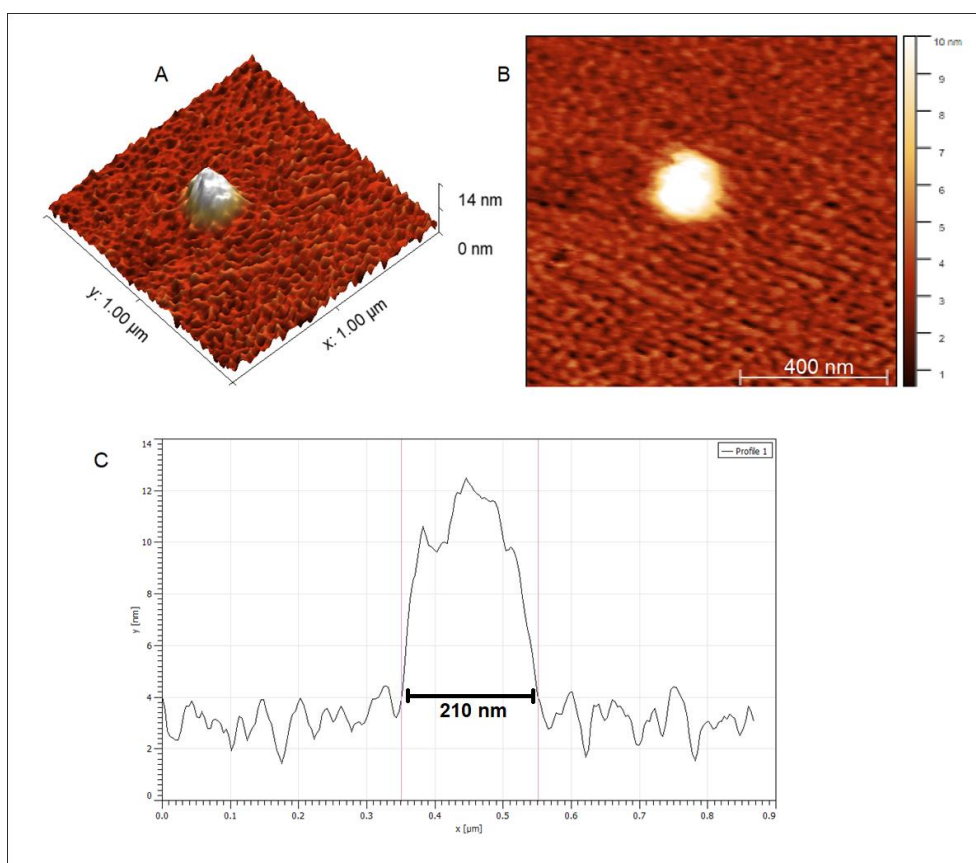


Figura 14. Imágenes de la partícula formada por el ELP (KI)₂ obtenidas por AFM. A) Reconstrucción tridimensional de la partícula B) partícula individual de (KI)₂ vista superior en dos dimensiones C) Diagrama del tamaño de la partícula de corte lateral.

4.4.5. Distribución del tamaño de suspensión de mucina mediante DLS

Una vez finalizada la caracterización de las nanopartículas formadas por el biopolímero (KI)₂ se analizó su capacidad para interactuar con mucina comercial mediante el ensayo con la técnica de DLS. Para ello previamente se homogeneizaron en tamaño las suspensiones de mucina con dos tratamientos diferentes con ultrasonidos. Como puede observarse, la suspensión de mucina tratada con sonda (o sonotrodo) presentó un

tamaño inferior, claramente diferente del presentado por las nanopartículas del biopolímero lo cual facilita el ensayo, y un menor PDI (Tabla 3) lo que indicaba más uniformidad, debido a eso eligió ese tratamiento para el ensayo de mucoadhesión con ELP (KI)₂.

Tabla 3. Distribución de tamaño de las preparaciones de mucina comercial.

Tratamiento	\bar{X} Tamaño de partícula (nm)	SD Tamaño de partícula	\bar{X} PDI	SD PDI
Mucina sonicada con baño de ultrasonido	291,80	13,21	0,58	0,09
Mucina sonicada con sonda	89,65	7,47	0,38	0,07

4.5. Tamaño de partícula y ensayo de mucoadhesión.

Mediante el ensayo de mucoadhesión se determinó la capacidad de interacción del ELP (KI)₂ con las mucinas preparadas como se acaba de describir, este ensayo se realizó en condiciones fisiológicas pH igual a 7 y 37 °C. La interacción se determinó en función de la neutralización de cargas y el tamaño de las partículas resultantes formadas por la unión del ELP a la mucina (Tabla 4). Como se ha indicado en el apartado 5.3.1, las nanopartículas del polímero (KI)₂ tienen carga neta de +27,68 mV debido al bloque basado en Lisina posee en su cadena lateral el grupo amino el cual a pH 7 está cargado positivamente ²⁴, mientras que la suspensión de mucina por lo contrario presenta una carga de -18,9 mV, debida a la presencia de ésteres de sulfato y ácido siálico en su superficie, además la carga negativa se mantiene en un medio con pH 7 ²⁵.

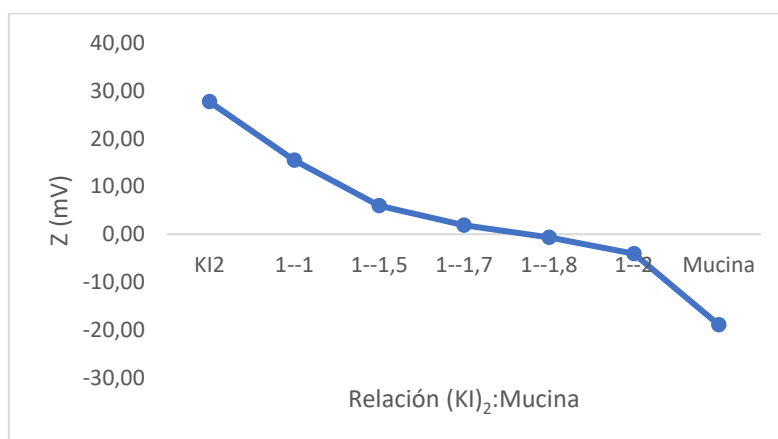


Figura 15. Diagrama de potencial Z resultante de la relación en masa polímero:mucina.

Tabla 4. Ensayo de mucoadhesión (KI)₂, tamaño de partícula y potencial Z.

Relación (KI) ₂ / Mucina	\bar{X} Tamaño partícula (nm)	SD Tamaño partícula	\bar{X} PDI	SD PDI	\bar{X} Potencial Z (mV)	SD Potencial Z
(KI) ₂ 1:0	246,27	7,11	0,11	0,02	+27,68	0,93
1:1	148,43	6,4	0,09	0,01	+15,49	0,71
1:1,5	1926,67	237,39	0,24	0,05	+5,93	0,65
1:1,7	5658,33	371,73	0,22	0,11	+1,89	0,49
1:1,8	4396,67	835,01	0,88	0,01	-0,65	0,04
1:2	4153,33	450,08	0,38	0,3	-4,05	0,38
1:4	215,5	9,6	0,12	0,02	-	-
1:50	193,73	6,64	0,25	0	-	-
0:1 (Mucina)	89,65	7,47	0,38	0,07	-18,90	0,34

En la figura 15 se observa el resultado de la interacción (KI)₂-mucina en términos de carga superficial en función de la proporción en masa de ambos compuestos, se encontró que una proporción de 1-1,8 lograba neutralizar las cargas de potencial, como resultado de que el ELP posee carga positiva y la mucina posee una carga negativa se observó una fuerte interacción específica a medida que la señal de voltaje se acercaba a 0 mV, la mayor interacción se refleja también en la formación de agregados de mayor tamaño comparados con los tamaños de las partículas de (KI)₂ y mucina individuales (tabla 4), en el punto de neutralización de carga el tamaño medio de las partículas estaba entre 5658 y 4396 nm, la formación de este microagregado está impulsado por las interacciones electrostáticas de las cargas superficiales de ambos compuestos ²⁶.

Se utilizó como ensayo de control el ELP (EI)₂ debido a que este polímero posee carga negativa en pH 7, por lo que ambos compuestos poseen carga negativa de -33 mV y -18 mV respectivamente para el ELP y mucina, el ensayo realizado con las mismas proporciones anteriores muestra que no hay interacciones electrostáticas específicas, esto también se evidencia con el tamaño de las partículas medido en cada proporción ELP-mucina comprendidos entre 62 y 89 nm se mantienen sin mayor variación (tabla 5).

Tabla 5. Ensayo de mucoadhesión (EI)₂, tamaño de partícula y potencial Z.

Relación (EI) ₂ / Mucina	\bar{X} Tamaño partícula (nm)	SD Tamaño partícula	\bar{X} PDI	SD PDI	\bar{X} Potencial Z	SD Potencial Z
(EI)₂ 1:0	62,01	2,44	0,42	0,009	-33,63	0,45
1:1	88,37	10,77	0,60	0,010	-19,82	1,74
1:1,8	121,30	33,49	0,47	0,193	-24,18	1,39
1:2	69,48	2,71	0,74	0,058	-22,45	0,30
1:4	121,00	16,50	0,58	0,130	-20,72	2,38
1:50	98,96	24,98	0,41	0,167	-20,80	2,42
0:1 (Mucina)	89,65	4,157	0,63	0,049	-18,90	0,34

El ensayo de mucoadhesión permitió verificar que existe una buena interacción del polímero con mucinas de acuerdo con el tamaño y carga de las partículas, sin embargo, se podría ampliar el estudio de mucoadhesión mediante la medida del ángulo de contacto, técnicas de mediciones reológicas o RMN ²⁷. Además, sería recomendable determinar el potencial de mucoadhesión de (KI)₂ en condiciones como DDS para un agente terapéutico.

El uso de ELPs como vehículos para agentes terapéuticos oftálmicos permitirá desarrollar formas más eficientes de reparto de medicamentos maximizando la biodisponibilidad, la efectividad, al mismo tiempo minimizar los efectos adversos, de ahí la importancia de expandir el estudio del ELP (KI)₂ debido a que tendría gran capacidad para formar hidrogeles biocompatibles estables aprovechando la característica de autoensamblaje y su naturaleza anfifílica ²², los resultados apuntan al potencial de este ELP como base para el desarrollo de sistemas de reparto para formulaciones oftálmicas, gracias a sus características se podría expandir el estudio y analizar su capacidad para formar parte de andamios celulares para regeneración de tejido.

V. Conclusiones

- La bioproducción y purificación del polímero tipo elastina (KI)₂ logró a través de técnicas fisicoquímicas, la obtención de 54,3 mg de polímero, un rendimiento de 13,6 mg/L de medio de cultivo y una pureza de 80,5 %, por lo que se concluye que el método utilizado deberá optimizarse aún para mejorar tanto el rendimiento como su pureza.
- Las técnicas de caracterización a las cuales fue sometido el polímero (KI)₂ permitieron, en primer lugar, comprobar la especificidad de la producción corroborando la masa molecular del ELP obtenido la cual fue acorde con su valor teórico 93.762 Da y siendo estos puntos clave para verificar que el proceso de producción fue adecuado y que el polímero polipeptídico obtenido fue el correcto. Se comprobó también que el proceso de purificación eliminaba la mayor parte del detergente utilizado y que las impurezas provienen posiblemente de otras proteínas de la bacteria co-purificadas o bien de productos de degradación del mismo polímero.
- Se determinó el tamaño y carga de las partículas que se forman al agregarse las moléculas del polímero en pH y temperatura fisiológicas siendo de 246,3 nm en promedio en la medición por DLS y con un tamaño de 210 nm medido por AFM, la carga superficial de la molécula fue de +27,68 mV proporcionada por las lisinas, estos valores permitieron observar que las partículas del polímero son capaces de mantener un tamaño estable y una carga positiva en esa temperatura y pH. La determinación del Tt a través de DLS permitió observar que la partícula ya se encontraba ensamblada y que probablemente la temperatura de transición de cada bloque esté fuera de los límites del rango de medición en estas condiciones.
- El ensayo de mucoadhesión permitió verificar que existe interacción entre las nanopartículas del polímero (KI)₂ y la mucina de cerdo tipo III, basándose en la variación del potencial Z se pudo determinar que la carga positiva del polímero se anula con las cargas negativas de la mucina, además la interacción creó un agregado de partículas que superan en tamaño por un orden de magnitud a las partículas individuales, en conclusión, el ELP (KI)₂ sería un candidato viable para estudios de sistema de reparto de agentes terapéuticos oftálmicos vía tópica ya que podrá interaccionar y mantenerse en la superficie corneal rica en mucinas.

VI. Bibliografía

1. Almonacid F, Inés C, Bravo R. Administración de medicación por vía oftálmica. Published online 2010. [https://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/hrs3/fileadmin/user_upload/area_enfermeria/enfermeria/procedimientos/procedimientos_2012/rt13_admon_medificacion_oftalmica.pdf](https://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/hrs3/fileadmin/user_upload/area_enfermeria/enfermeria/procedimientos/procedimientos_2012/rt13_admon_medificacion Oftalmica.pdf)
2. COFZ (Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza). Formas Farmacéuticas Oftálmicas. Qué son; tipos y técnicas de aplicación; preguntas frecuentes en el mostrador de la farmacia - Colegio Oficial Farmacéuticos de Zaragoza. Published 2022. Accessed June 15, 2022. <https://cofzaragoza.org/formas-farmacenticas-oftalmicas/>
3. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Experimental Eye Research*. 2020;197:108115. doi:10.1016/J.EXER.2020.108115
4. Castro-Balado A, Mondelo-García C, Zarra-Ferro I, et al. Nuevos sistemas de liberación de fármacos a nivel ocular. *Farmacia Hospitalaria*. 2020;44(4):149-157. doi:10.7399/FH.11388
5. Cociolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, Johnson EO, Murshed M, Wagenseil JE. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(2):H189-H205. doi:10.1152/AJPHEART.00087.2018
6. van Doren SR. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biology*. 2015;44-46:224-231. doi:10.1016/J.MATBIO.2015.01.005
7. Sarangthem V, Singh TD, Dinda AK. Emerging Role of Elastin-Like Polypeptides in Regenerative Medicine. *Advances in Wound Care*. 2021;10(5):257-269. doi:10.1089/WOUND.2019.1085/ASSET/IMAGES/LARGE/WOUND.2019.1085_FIGURE5.JPEG
8. Korias P, Yagi H, Kitagawa Y, et al. Self-assembling elastin-like peptides growth factor chimeric nanoparticles for the treatment of chronic wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(3):1034-1039. doi:10.1073/PNAS.1009881108/-DCSUPPLEMENTAL
9. Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nature Biotechnology* 1999 17:11. 1999;17(11):1112-1115. doi:10.1038/15100
10. García M. *Elastin-like Recombinamers for Advanced Biomedical Applications*. Universidad de Valladolid; 2012. Accessed June 29, 2022. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/2718>
11. Gonzalez-Valdivieso J, Girotti A, Muñoz R, Rodriguez-Cabello JC, Arias FJ. Self-Assembling ELR-Based Nanoparticles as Smart Drug-Delivery Systems Modulating Cellular Growth via Akt. *Biomacromolecules*. 2019;20(5):1996-2007. doi:10.1021/ACS.BIOMAC.9B00206
12. Chambre L, Martín-Moldes Z, Parker RN, Kaplan DL. Bioengineered elastin- and silk-biomaterials for drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020;160:186-198. doi:10.1016/J.ADDR.2020.10.008
13. Menor C. SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida – ChemEvol. Published 2022. Accessed June 23, 2022. <https://chemevol.web.uah.es/wp/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida/>

14. Ashizawa K. [Nanosize Particle Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS)]. *Yakugaku Zasshi*. 2019;139(2):237-248. doi:10.1248/YAKUSHI.18-00171-1
15. Cai P. Dynamic light scattering microrheology for soft and living materials. Published online 2021:1-8. Accessed June 29, 2022. 10.1039/d0sm01597k
16. Zhu C, Guo W. Detection and quantification of the giant protein titin by SDS-agarose gel electrophoresis. *MethodsX*. 2017;4:320-327. doi:10.1016/J.MEX.2017.09.007
17. Piña M. *Elr-Based Nanocomplexes with Potential Biomedical Uses - Dialnet*. Universidad de Valladolid; 2016. Accessed June 29, 2022. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=295820>
18. Whitford D. *Proteins Structure and Functions*. 1st ed. (John Wiley & Sons L, ed.); 2005.
19. Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*. 2015;14(1):1-10. doi:10.1186/S12934-015-0222-8/TABLES/3
20. Rodríguez-Cabello JC, Girotti A, Ribeiro A, Arias FJ. Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials. *Methods Mol Biol*. 2012;811:17-38. doi: 10.1007/978-1-61779-388-2_2. PMID: 22042670.
21. García-Arévalo C, Bermejo-Martín JF, Rico L, et al. Immunomodulatory nanoparticles from elastin-like recombinamers: Single-molecules for tuberculosis vaccine development. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(2):586-597. doi:10.1021/MP300325V/SUPPL_FILE/MP300325V_SI_001.PDF
22. Fernández-Colino A, Quinteros DA, Allemandi DA, Girotti A, Palma SD, Arias FJ. Self-Assembling Elastin-Like Hydrogels for Timolol Delivery: Development of an Ophthalmic Formulation Against Glaucoma. *Mol Pharm*. 2017 Dec 4;14(12):4498-4508. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00615. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29125768.
23. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2). doi:10.3390/PHARMACEUTICS10020057
24. Timberlake K. *Química. Una Introducción a La Química General, Orgánica y Biológica*. Décima edición.; 2011. Accessed June 26, 2022. https://www.academia.edu/11661991/Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica_y_Biol%C3%B3gica_Timberlake_10a_Edici%C3%B3n_Autosaved_
25. Abodinar A, Tømmerraas K, Ronander E, Smith AM, Morris GA. The physicochemical characterisation of pepsin degraded pig gastric mucin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;87:281-286. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2016.02.062
26. Collado-González M, Espinosa YG, Goycoolea FM. Interaction Between Chitosan and Mucin: Fundamentals and Applications. *Biomimetics (Basel)*. 2019;4(2). doi:10.3390/BIOMIMETICS4020032
27. Pham QD, Nöjd S, Edman M, Lindell K, Topgaard D, Wahlgren M. Mucoadhesion: mucin-polymer molecular interactions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;610:121245. doi:10.1016/J.IJPHARM.2021.121245

VII. Anexos

Anexo 1. Equipos.

Equipo	Marca
Agitador magnético	Fisher Brand (Pro Cereal)
Agitador magnético	Bibby B212
Agitador orbital	OVAN
Agitador rotatorio	Intelli miyer RM-2L
Baño termostático	Argo Lab WB 12
Cámara de flujo laminar	Heraeus Lamin Air TL 244
Centrifuga	Thermo scientific Sorval Legend XTR
Cubeta de electroforesis	miniVE Vertical electrophoresis system Cytiva
Espectrofotómetro	VWR PH UV-VIS
Fuente de alimentación	Amersham Pharmacia Biotec Electrophoresis power supply
Incubadora	Heraeus
Liofilizador	Telstar Liques
MALDI-TOF	Brunker RMN Auto Flex Speed (LTI)
Máquina de hielo	ITV Ice Makers
Microcentrifuga	RS Lab Hifuge GJ
Microscopio Fuerza Atómica	3D Infinity bio asylum Research AFM (LTI)
Nevera	Liebbber Power Cooling
Placa de calentamiento	Heidolph
Resonancia Magnética Nuclear	400 Agilent Technologies (Laboratorio de Técnicas Instrumentales)
Sistema de revelado imágenes	Gel Doc EZ System BioRad
Sistema de refrigeración de sonicación	LAUDA ALPHA RA12 (Pro Cereal)
Sistemas para mediciones de carga de partícula y tamaño de nanopartículas DLS	ZetaSizer Pro (LTI), Malvern Panalitical
Sonicador con sonda	Heisssher UP 400st (Pro Cereal)
Sonicador de baño	-
Ultracongelador	Thermo Scientific 88000 Series

Anexo 2. Cepa bacteriana y plásmido

	Origen
Cepa bacteriana	Escherichia coli cepa BLR (DE)3, NOVAGEN
Plásmido	P7, resistencia ampicilina, diseñado por la Dra. Alessandra Girotti, UVA

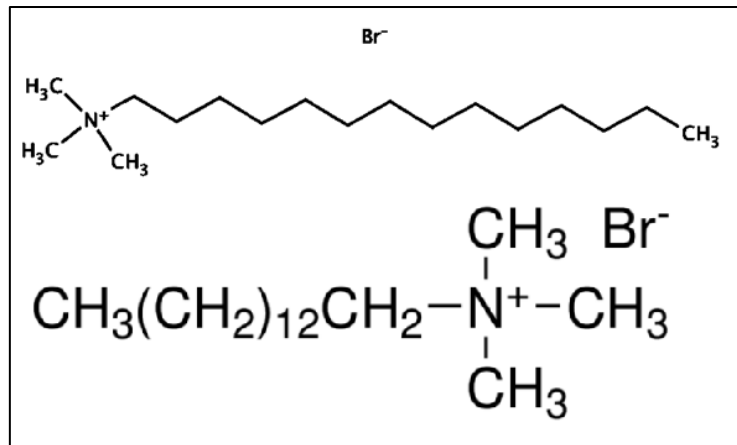
Anexo 3. Reactivos.

Reactivo	Composición
Acrilamida	60 g Acrilamida; 1,6 g bisacrilamida; agua destilada 200 mL
Agua destilada	Sistema milli-Q
Agua destilada ultrapura	Sistema milli-Q
Agua pesada	D ₂ O
Ampicilina	Formedium
Cloruro de cobre 98 %	Cloruro de cobre(II) dihidrato, Across organics
Fluoruro de fenilsulfonilmetano 99% (PMSF)	Apollo Scientific
Hidrato de clorhidrato de benzamidina	Acros organic
Marcador de peso molecular de proteínas	180 - 10 KDa, Nzytech
MTAB	Myristyltrimethylammonium bromide 99%, Sigma.
Mucina	Mucin from porcine stomach Type III, SIGMA
pH Indicator Roll	pH indicator Roll 1-11, ahlstrom-munksjo
SDS	SDS Micro-Pellets, (Sodium dodecyl (lauryl) sulfate), FORMEDIUM
Tris Base	Tris base ultra pure, FORMEDIUM
Triton x-100	Sigma
Tween 20	Ultrapure, Thermo Scientific

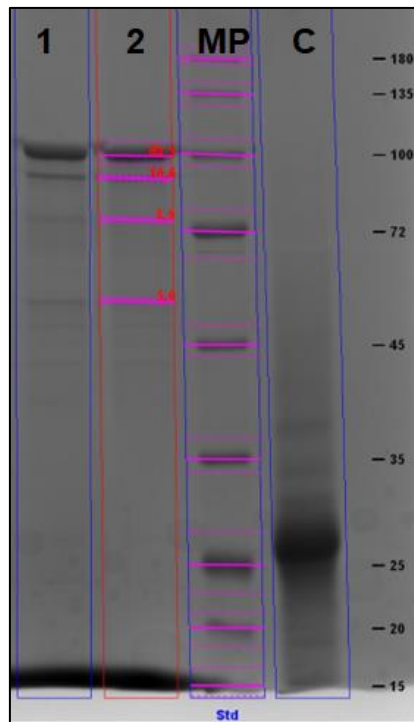
Anexo 4. Tampones y soluciones.

Tampón	Composición
Buffer de sonicación1x	Tris-base 20mM pH 8, EDTA 1 mM, PMSF 1mM
Buffer de lavado celular20x	NaCl 2,00M, Tris-base 0,200 M pH 7,5
Running Buffer 5x	Glicina 0,959 M, Tris-base 0,124 M, SDS 17,3 mM
Buffer de carga de proteínas	Composición 1x: Tris-HCl 62,5 mM pH=6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-ME 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v)
Buffer de sonicación	Tris base 24,2 g; EDTA 3,72g; 1 agua destilada 1 L, pH 8
Buffer Tris pH 6,8	Tris Base 10 mM; pH 6,8
Coomasie-Blue Solución de teñido	Coomassie Blue 0,25 g; ácido acético 25 mL; methanol 100mL; agua destilada 125 mL
Solución de desteñido Coomasie-Blue	Ácido acético 10%; metanol 40%, agua destilada 50%
Solución de desteñido de CuCl ₂	Agua destilada; EDTA
Solución de tinción de cobre	CuCl ₃ 51,144 g/L (0,3 M)

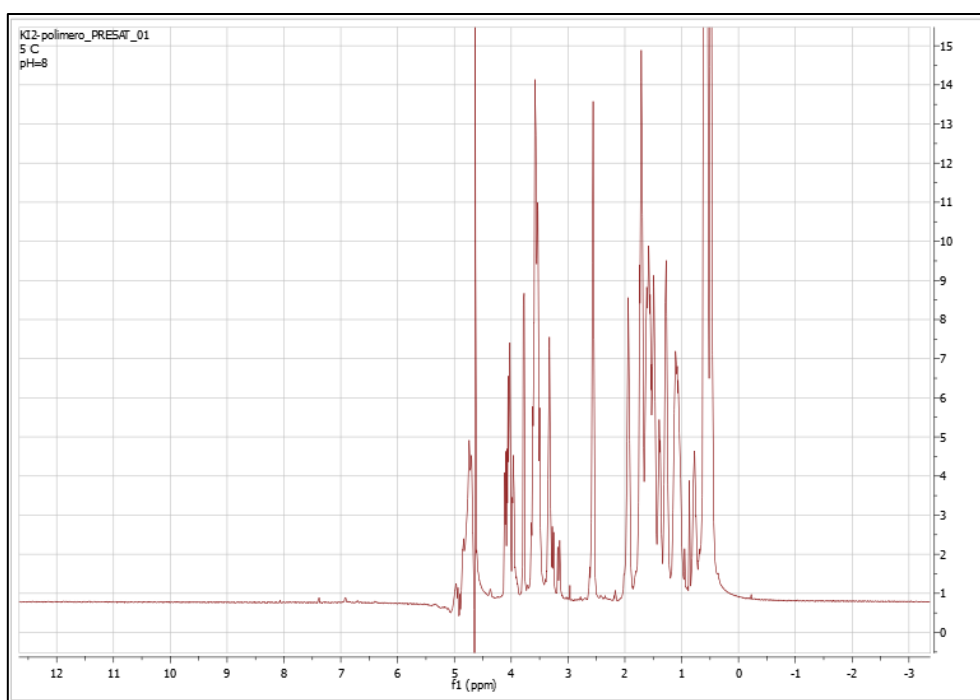
Anexo 5. Molécula de detergente catiónico MATB - Myristyltrimethylammonium bromide.



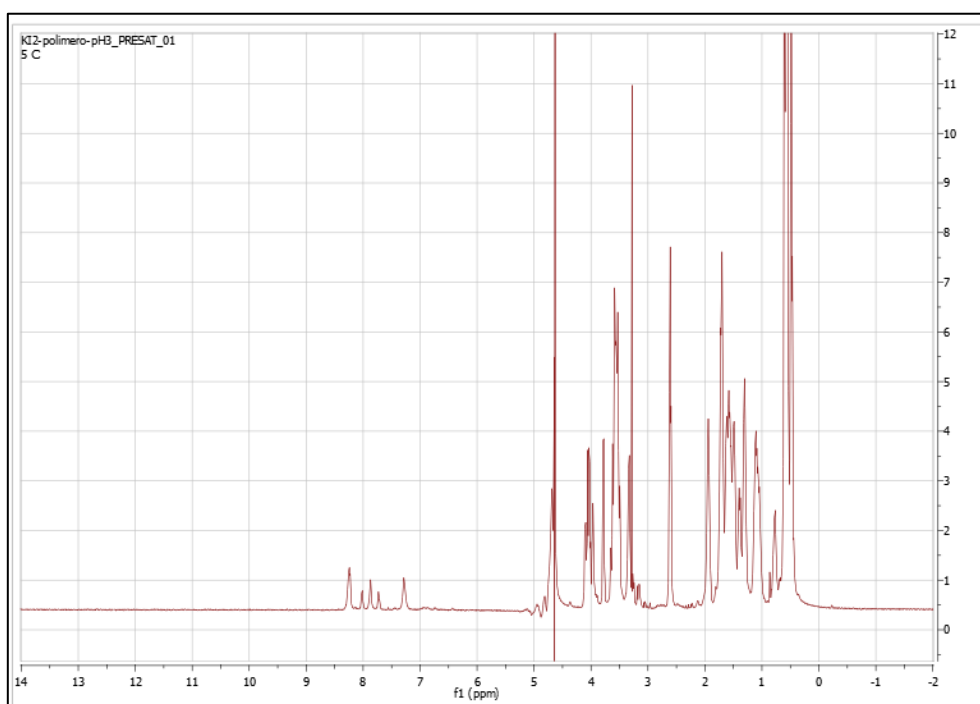
Anexo 6. Análisis de pureza en electroforesis SDS-PAGE del ELP (KI)₂ con el programa Image Lab Software - Bio-Rad. Calle 1 (KI)₂, calle 2 (KI)₂, Marcador de peso, control 25 KDa.



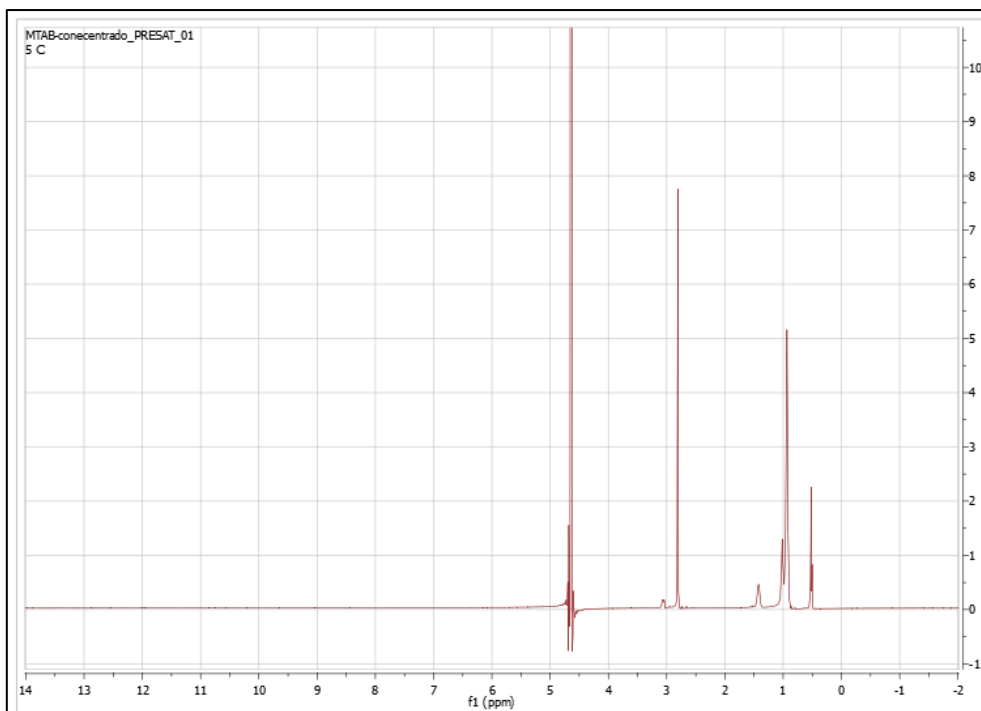
Anexo 7. RMN de muestra de polímero (KI)₂, pH 8, disuelto en agua deuterada.



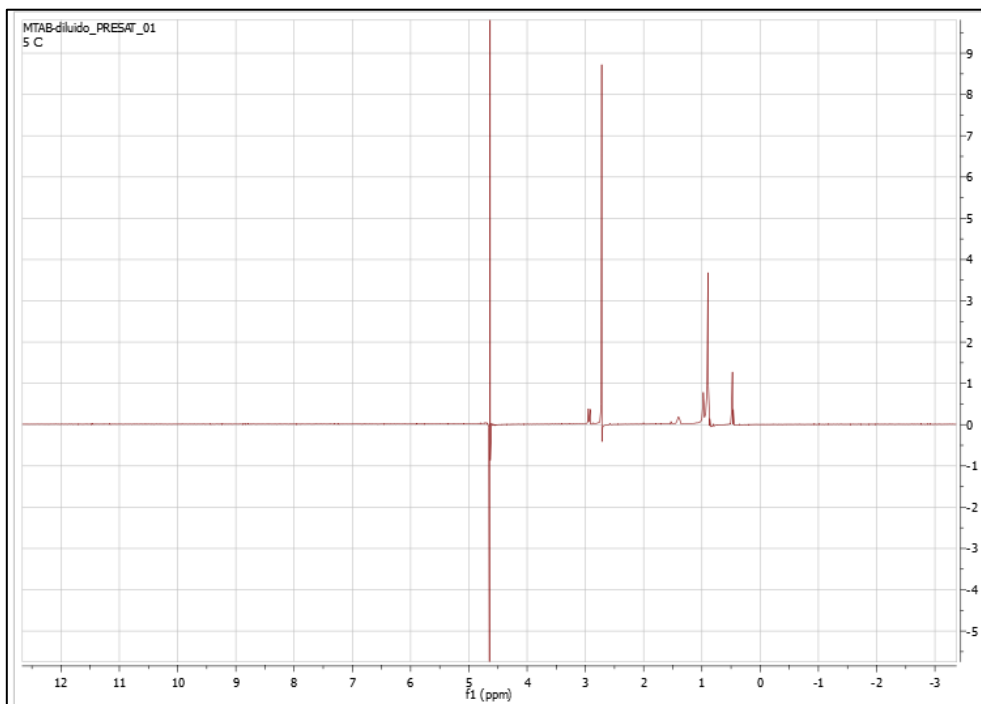
Anexo 8. RMN de muestra de polímero (KI)₂, pH 3, disuelto en agua deuterada.



Anexo 9. RMN de muestra detergente MTAB 0,12M, disuelto en agua deuterada.



Anexo 10. RMN de muestra detergente MTAB 0,012 M, disuelto en agua deuterada.



Anexo 11. RMN de muestra de producción (KI)₂ medido con capilar de agua deuterada.

