



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Física

Curso 2021-2022

**Estudio de transiciones líquido-líquido
en disoluciones acuosas de polipéptidos
sensibles a estímulos**

Autor: Pablo Gila Herranz

Tutores: José Carlos Rodríguez Cabello,

A. Carmelo Prieto Colorado

Como decía mi abuelo,
“El que hace un cesto, hace cientos”

A mi familia y a mis panas, que tanto me han hecho crecer como persona, y sin quienes simplemente no habría llegado hasta aquí. A mis profesores y al personal de BIOFORGE, por darme esta oportunidad, y en especial a Julio, Roci y Desiré, por aguantarme en el laboratorio. Ah, y a Alexandra Elbakyan, a quien le debo tres cuartas partes de la bibliografía.

Gracias.

Índice

Abstract	1
1. Introducción	2
1.1. Biomateriales y nanotecnología.....	2
1.2. Polímeros recombinantes de tipo elastina (ELRs).....	3
1.3. Coacervación	6
1.4. Objetivos	7
2. Métodos experimentales y materiales.....	8
2.1. Polímero estudiado y medios empleados	8
2.2. Electroforesis SDS-PAGE.....	9
2.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	10
2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	10
2.5. Turbidimetría.....	11
2.6. Seguimiento visual de la coacervación	12
2.7. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)	12
2.8. Modificación Química	15
3. Discusión de resultados.....	16
3.1. Peso molecular	16
3.2. Espectroscopía Infrarroja	16
3.3. Temperatura de Transición Inversa	18
3.4. Evolución de la coacervación	19
3.5. Modificación Química	23
4. Conclusiones y futuras líneas de investigación	24
Referencias.....	25
Anexo	31
A1. Tabla de Aminoácidos	31
A2. Recipientes más utilizados	31
A3. Marker de electroforesis.....	32
A4. Gráficas de DSC	32
A5. Gráficas de Turbidimetría.....	35
A6. Equipos empleados	36

Abstract

Los nuevos biomateriales, como los polímeros recombinantes de tipo elastina, prometen multitud de aplicaciones médicas, desde el transporte de fármacos a la regeneración de tejidos dañados. Si bien la separación en dos fases líquidas de la elastina es un proceso conocido, poco se sabe sobre su efecto en la migración celular. Se ha teorizado que los agregados poliméricos podrían arrastrar a las células presentes en el medio, al producirse la coacervación y separación en dos fases líquidas. Para estudiar la viabilidad de este proceso, se ha propuesto realizar un estudio con un polímero recombinante de tipo elastina, el HRGD6, caracterizado por la secuencia de adhesión celular RGD. En este trabajo se ha caracterizado físicamente dicho polímero, analizado su similitud con la elastina mediante espectroscopía infrarroja. Se ha determinado, por medio de mediciones de calorimetría diferencial de barrido, que se produce la coacervación de este polímero a temperatura fisiológica, y se ha seguido este proceso mediante medidas de turbidimetría y dispersión dinámica de la luz, así como de forma visual. Se ha observado que el autoensamblado proteico origina gotas del orden de $1,2\mu\text{m}$, que, al coalescer entre sí, forman una separación de fases líquido-líquido pasada media hora. Además de la caracterización del polímero y de su proceso de coacervación, se le ha realizado una modificación química, añadiendo el fluoróforo Cy5, y se ha hecho una caracterización preliminar de la modificación. Esto permitirá realizar futuros estudios sobre el proceso de coacervación en presencia de células, ayudando a determinar, mediante microscopía de fluorescencia, la influencia de este proceso en la migración celular, así como su posible aplicación en la regeneración de tejidos dañados.

New biomaterials, such as elastin-like recombinamers, promise a broad variety of medical applications, from drug delivery to tissue regeneration. While the liquid-liquid phase separation of elastin is a known process, little is known about its effect on cell migration. It has been theorized that polymeric aggregates could drag the cells from the medium, by coacervation and liquid two-phase separation. To study the feasibility of this process, it has been proposed to perform a study with a recombinant elastin-like polymer, HRGD6, characterized by the cell adhesion sequence RGD. In this work, this polymer has been physically characterized, and its similarity to elastin has been analyzed by infrared spectroscopy. It has been determined, by means of differential scanning calorimetry measurements, that coacervation of this polymer occurs at physiological temperature, and this process has been followed by means of turbidimetry and dynamic light scattering measurements, as well as visually. It has been observed that the protein self-assembly originates droplets of about $1.2\mu\text{m}$, which, upon coalescence, form a liquid-liquid phase separation after half an hour. In addition to the characterization of the polymer and its coacervation process, a chemical modification has been carried out, adding the Cy5 fluorophore, and a preliminary characterization of the modification has been made. This will allow future studies on the coacervation process in the presence of cells, helping to determine, by means of fluorescence microscopy, the influence of this process on cell migration, as well as its potential application in tissue regeneration.

1. Introducción

1.1. Biomateriales y nanotecnología

La fabricación de implantes y prótesis con fines médicos se remonta a hace más de 7000 años. Es una práctica casi tan antigua como las primeras herramientas, presente en todas las grandes civilizaciones de la antigüedad [1]. En el registro histórico es común encontrar prótesis de madera para sustituir un miembro perdido, como el *Cairo Toe*, un pulgar del pie perteneciente a una momia egipcia de entre el 1550 y el 700 a.e.c., que le facilitó caminar en vida [2]. Si bien la madera puede resultar útil para este tipo de prótesis mecánicas, es un material altamente degradable, poco recomendable para implantes en contacto directo con el tejido del paciente. Un material más apropiado para ello es el oro, utilizado en algunas trepanaciones incas, muchas de ellas mostrando signos de recuperación del tejido óseo tras la intervención [3]. Otro material inerte es la plata, de la que aparentemente era la prótesis de nariz que llevaba el astrónomo *Tycho Brahe* (1546-1601), tras perderla durante un duelo por la disputa del título de mejor matemático de su época [4].



Ilustración 1: Prótesis de madera del Antiguo Egipto, conocida como "Cairo Toe" (izquierda); cráneo inca con indicios de una trepanación, con signos de recuperación del tejido óseo tras sellarse con oro (derecha) [1]

Este tipo de materiales, empleados en todo tipo de implantes médicos, reciben el nombre de *biomateriales*. Actualmente, la definición más aceptada de biomateriales es la dada por el *American National Institute of Health*, que los describe como "cualquier sustancia o combinación de sustancias, distintas de los fármacos, de origen sintético o natural, que puede utilizarse durante cualquier periodo de tiempo, que amplía o sustituye parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, con el fin de mantener o mejorar la calidad de vida del individuo" [5].

Hasta finales del siglo XIX tan solo se empleaban biomateriales inertes, como el oro o la plata mencionados. El desarrollo de los primeros polímeros sintéticos en esa época favoreció la creación de nuevos biomateriales, experimentando un creciente interés a mediados del siglo XX, debido a las mejoras tecnológicas y al aumento de la esperanza de vida, que trajo consigo la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos médicos. Algunas de las mejoras introducidas en esos años fueron la creación de materiales bioactivos, provocando una respuesta biológica que favorece la unión del material con el tejido adyacente; así como de materiales biodegradables, que no dejan rastro en el organismo tras haber cumplido con su función [6].

Paralelamente, el avance en otras disciplinas como la nanociencia ha permitido diseñar biomateriales mucho más avanzados, introduciendo nuevas funcionalidades, que permiten interacciones específicas del material con el tejido celular. Más recientemente se ha puesto el enfoque en los “materiales inteligentes”, cuyas propiedades pueden ser controladas bajo demanda, capaces de adaptarse de forma autónoma a las condiciones ambientales, o incluso de auto repararse, y que son empleados para satisfacer aplicaciones médicas muy concretas [7].

Actualmente, una de las líneas de investigación más relevantes es la de los polímeros recombinantes, o modificados genéticamente. Este tipo de biopolímeros son, en esencia, proteínas, similares a las que se pueden encontrar en los organismos biológicos, con el añadido de que su secuencia de aminoácidos ha sido modificada a voluntad, mediante técnicas de ADN recombinante [8]; se adjunta en el anexo (A1) una tabla informativa sobre los aminoácidos que conforman sus estructuras [9]. Estos biomateriales combinan propiedades como la gran elasticidad o resistencia de los materiales sintéticos, como pueden ser el ácido poliláctico (PLA) o el polietilenglicol (PEG), junto con la alta biocompatibilidad que ofrecen aquellos de origen natural, como el colágeno o la queratina. Con ello se consigue no solo imitar las funciones de los materiales biológicos, sino también mejorarlas, obteniendo nuevas propiedades ausentes en la naturaleza [10]. Gracias a esto se han desarrollado numerosas aplicaciones, en áreas como la regeneración de tejidos o la nanomedicina, entre las que se incluyen la fabricación de recubrimientos, membranas, paredes o micelas, capaces de conformar estructuras de soporte o de liberar fármacos de forma controlada, pudiendo penetrar en tejidos específicos según su tamaño, así como alcanzar órganos concretos según su solubilidad característica, todo ello mientras el recubrimiento proteico protege al medicamento del medio externo [11].

1.2. Polímeros recombinantes de tipo elastina (ELRs)

Unos de los biopolímeros recombinantes más relevantes en el panorama actual son los de tipo elastina, más conocidos como *Elastin-Like Recombinamers*, o *ELRs*. Se trata de una familia de polímeros creados mediante técnicas de ingeniería genética, inspirados en la elastina, una proteína presente en la matriz extracelular, cuya función es proporcionar elasticidad a los tejidos, así como promover la reparación tisular [12, 13]. Los ELRs están basados en la secuencia de la tropoelastina humana VPGVG, sustituyendo la valina (V) de la cuarta posición por cualquier aminoácido, excepto por prolina (P) [14]. El desarrollo de nuevas formas recombinantes de elastina ha favorecido la creación de toda esta familia de biomateriales, que se benefician de las capacidades de autoensamblaje y elasticidad innatas a la elastina [10]. Empleando tecnologías de ADN recombinante, es posible controlar la secuencia y estereoquímica de las proteínas resultantes, así como su peso molecular, todo ello asegurando una gran biocompatibilidad [8]. De este modo, se pueden crear polímeros con nuevas propiedades, a la vez que mantienen aquellas propias de la elastina, como su capacidad de autoensamblaje, o el comportamiento termorresponsivo, por el cual se produce una transición de fase reversible a nivel molecular, por encima de una temperatura de transición inversa T_t , característica de cada ELR [15].

Gracias a la existencia de una transición de fase reversible, se han podido establecer protocolos de purificación específicos para cada ELR, impulsando su producción en los últimos años. En la síntesis de una proteína natural, los ribosomas de las células de los seres vivos se encargan de ensamblar los polipéptidos, cuya secuencia de aminoácidos se encuentra descrita en el genoma de la célula [16]. La ingeniería genética ha conseguido imitar este proceso natural, permitiendo

la producción masiva de proteínas de forma artificial, abriendo la puerta a la introducción de terapias médicas con biopolímeros recombinantes en los años venideros, como ya sucedió con la insulina sintética, que actualmente ofrece un tratamiento asequible contra la diabetes [17]. Para ello, en el caso de los ELRs, se introducen los vectores de expresión del polipéptido deseado en ejemplares de bacterias de *Escherichia coli*, mediante plásmidos de ADN. Las bacterias se reproducen a gran escala en fermentadores, y una vez se ha producido la suficiente cantidad de polímero, se somete a varios procedimientos de purificación, entre los que se incluyen centrifugados y cambios de salinidad y pH, así como tratamientos térmicos, que aprovechan la temperatura de transición inversa característica del ELR para purificarlo de otras proteínas y restos de bacterias [18].

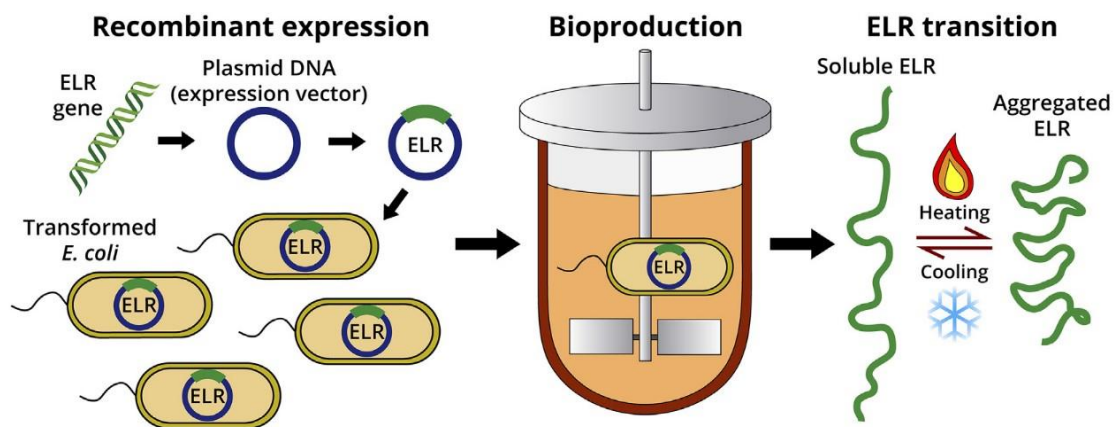


Ilustración 2: Esquema del proceso de obtención de los ELRs, mediante síntesis recombinante, fermentación de las bacterias, y purificación mediante procesos térmicos que aprovechan la temperatura de transición inversa [18]

La transición de fase reversible, en respuesta a cambios de temperatura, es una de las propiedades más relevantes de los ELRs. A bajas temperaturas, en una disolución acuosa, las cadenas del polímero se mantienen libres y extendidas. Se encuentran hidratadas por hidratación hidrofóbica [19], gracias a las estructuras tipo clatrato formadas por las moléculas de agua, que rodean los residuos apolares del ELR (sección izquierda de la ilustración 3). Cuando se supera una cierta temperatura de transición inversa T_t , las estructuras de clatrato formadas por las moléculas de agua se desestabilizan, debido a la agitación térmica, causando el plegamiento de la cadena polipeptídica mediante interacciones hidrofóbicas [20], que adopta una estructura mixta entre estructuras desordenadas (*random coils*) y ordenadas de espirales β , estabilizadas mediante fuerzas de puentes de hidrógeno (sección derecha de la ilustración 3). Esta transición conformacional, dada en un medio acuoso, conlleva la transición del polímero de un estado soluble a insoluble [21]. Este plegado es reversible, y la temperatura de transición inversa T_t a la que ocurre depende, principalmente, de la secuencia de aminoácidos y el peso molecular del ELR, si bien también depende de estímulos externos, como los iones y el pH del medio, entre otros. La presencia de residuos polares en la posición X del pentapéptido VPGXG causará un aumento global de la hidrofiliidad, favoreciendo un incremento de la temperatura T_t , mientras que un mayor tamaño del polímero producirá el efecto contrario, disminuyendo la temperatura de transición [22].

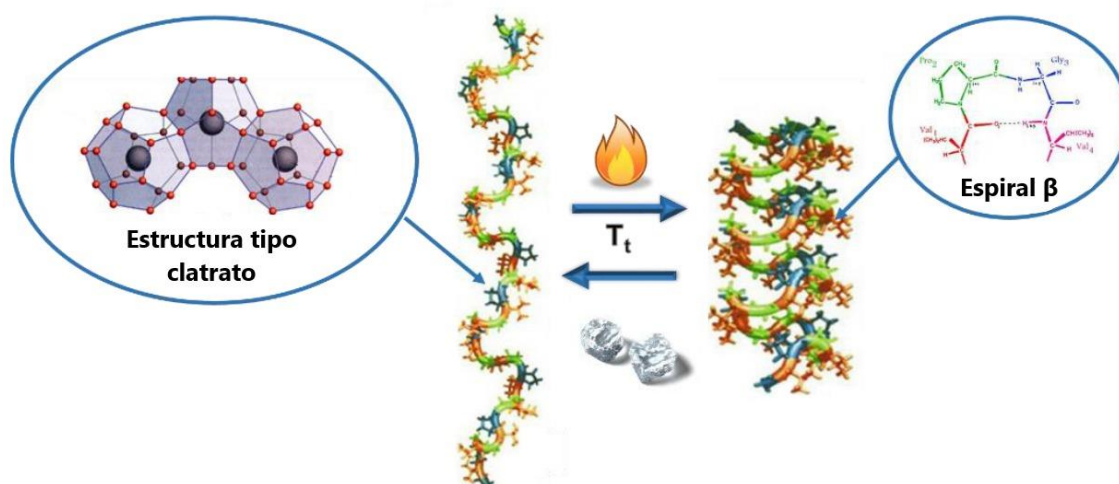


Ilustración 3: Esquema de la transición térmica reversible de un polímero ELR, desde un estado extendido a bajas temperaturas, con residuos apolares rodeados de estructuras de tipo clatrato, a un estado plegado en espiral β . Imagen versionada, [23]

Para la mayoría de las proteínas, el aumento de la temperatura es motivo de un desplegamiento y consecuente desnaturalización; sin embargo, la agregación de los ELRs se produce al aumentar la temperatura. Desde el punto de vista termodinámico, el polímero se pliega hidrofóticamente durante el calentamiento, provocando un aumento del orden local. Sin embargo, la magnitud de este orden es superada por el desorden causado por la ruptura de las estructuras de clatrato, debido a la agitación térmica. Es precisamente este aumento de la entropía global el que actúa como fuerza motora del plegamiento, cumpliendo este proceso con una energía libre de Gibbs $\Delta G < 0$. Este proceso endotérmico, inducido por los estímulos ambientales, puede ser considerado como una conversión de energía química o térmica en trabajo mecánico útil, siendo además un proceso reversible, al bajar la temperatura por debajo de T_t ; por todo esto, se ha calificado a los ELRs como “polímeros inteligentes”, al ser capaces de experimentar cambios estructurales como respuesta a los cambios en el microambiente que les rodea [23].

Los ELRs, aplicados como parte de una matriz extracelular artificial, constituyen una solución para sustituir tejidos dañados, así como para asistir en su regeneración, al proporcionar un soporte estructural para las células del entorno, promoviendo un crecimiento celular que favorece la integración de la estructura con el tejido adyacente. Para que este trasplante celular tenga lugar, es indispensable la integración de una estructura tridimensional como sustituto de la matriz extracelular, siendo los ELRs hechos a medida los candidatos perfectos para desarrollar hidrogeles, capaces de imitar el entorno natural donde las células podrán realizar sus funciones vitales, ayudando en la restauración del tejido dañado [24, 25].

1.3. Coacervación

El proceso termorresponsivo característico de los ELRs, por el cual se produce el autoensamblado de los polipéptidos en estructuras agregadas a temperaturas superiores a la T_t , se conoce como coacervación. En este proceso reversible, las proteínas en medio acuoso transicionan de un estado disuelto y transparente a una suspensión coloidal turbia, autoensamblándose en estructuras mixtas de *random coils* y hélices β [21]. Tras este cambio de estado, el proceso de coacervación pasa por una fase de maduración, por la que se forman agregados coloidales de gotas ricas en polímero, que pueden interactuar entre sí y coalescer (Ilustración 4). Se ha podido identificar, para algunos ELRs, el diámetro inicial de sus agregados nada más ocurrir la transición, de en torno a 1-2 μm , observando un rápido aumento en los tamaños con el tiempo, hasta estabilizarse en torno a los 60-100 minutos [26].

Dependiendo de la estructura y conformación del ELR, así como de factores externos como el pH o los iones del medio, este proceso de coacervación puede desembocar en la formación de diferentes estructuras, como micelas, fibras o hidrogeles porosos, así como también puede originar una separación en dos fases líquidas tras la precipitación de la fase polimérica, entre otros [24]; es posible también adquirir un mayor control sobre estas estructuras, desplazando las gotas de polímero por medio de la adición de materiales magnéticos, o incluso mediante ondas acústicas estacionarias [27]. Los procesos de coacervación, impulsados por el autoensamblaje proteico, pueden ser empleados para producir una amplia variedad de estructuras, que unidas a la gran versatilidad de estos biomateriales, resultan de utilidad para diversas aplicaciones médicas, como pueden ser la creación de biosensores, transporte de fármacos o reparación de tejidos, entre otras [24].

En el proceso de coacervación, el tamaño de las gotas poliméricas puede llegar a estabilizarse, al detenerse la coalescencia entre gotas; no obstante, se ha observado que esto no ocurre para ELRs cuyas secuencias están constituidas mayoritariamente por dominios hidrófobos repetidos, en cuyo caso las fuerzas de agregación son mayores, por lo que las gotas pueden seguir coalesciendo, sin que se produzca la estabilización de tamaños [28]. En este caso, las proteínas pueden formar grandes agregados, mientras permanecen rodeadas de una fase acuosa, originando un régimen de dos fases líquido-líquido. Esta fase agregada de polipéptidos puede llegar a condensarse por deposición, dando lugar a una separación de dos fases líquidas, denominada *LLPS (Liquid-Liquid Phase Separation)*, en la que la fase proteica adquiere una consistencia gelatinosa al sedimentarse. Este tipo de separaciones líquido-líquido es común en los seres vivos, dándose, por ejemplo, en algunos de los orgánulos encargados de realizar las funciones vitales de las células [29]. Resulta de interés, por tanto, conocer los detalles sobre esta separación de fases líquidas, así como el proceso de coacervación por el que tiene lugar.

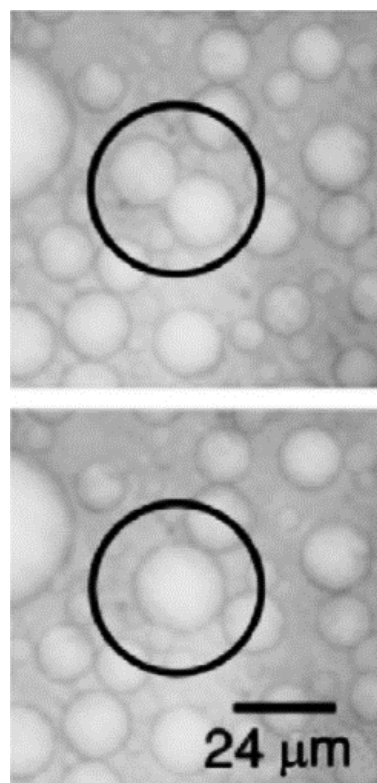


Ilustración 4: Microscopía de la coalescencia de dos gotas de ELR, con 1s de separación entre imágenes [26]

Uno de los polímeros que dan lugar a esta separación LLPS es la tropoelastina. Se han podido distinguir varias fases de autoensamblado en su proceso de coacervación: Inicialmente, se produce la formación de gotas de 70-600nm, seguidas, tras poco tiempo, de gotas de 6 μ m, que posteriormente se agregan, y que dan lugar finalmente a una capa cohesionada [30]. El estudio de la coacervación de la tropoelastina constituye el primer paso para el desarrollo de agregados de mayor complejidad [31].

1.4. Objetivos

Si bien hay estudios sobre la coacervación y separación en dos fases líquidas de la elastina, poco se sabe sobre su efecto en la migración celular. Es posible suponer que, dada la tendencia de las células de adherirse a esta proteína, los agregados poliméricos podrían arrastrar a las células presentes en el medio por sedimentación, al producirse la coacervación en dos fases líquidas.

Para obtener un marco de trabajo sobre el que poder estudiar la viabilidad de este proceso, así como su posible aplicación en la regeneración de tejidos dañados, se ha propuesto el estudio de la coacervación de un polímero similar a la elastina, el HRGD6, que servirá como modelo al emplear secuencias hidrófobas de tropoelastina. El estudio con este polímero, aparte de ofrecer gran disponibilidad en las instalaciones de BIOFORGE, tiene la ventaja de presentar la secuencia RGD proveniente de la fibronectina, lo que favorece la adhesión de las células al polímero. En este trabajo se pretende caracterizar dicho polímero, así como identificar su Tt , para verificar que la coacervación se produce a temperatura fisiológica (37°C). Se pretende realizar un seguimiento de su coacervación mediante distintas técnicas físicas, de forma que se puedan identificar los tamaños iniciales de las gotas de agregado, así como su crecimiento, y el tiempo que tardan en originar la separación de fases líquido-líquido. Esta caracterización servirá como paso previo al estudio del polímero *in vitro*, para el cual se ha propuesto realizar una modificación química del HRGD6, añadiendo un componente fluoróforo, de modo que próximamente se pueda estudiar, mediante microscopía de fluorescencia, la influencia de la coacervación del polímero en presencia de células humanas, ayudando a determinar la influencia de este proceso en la migración celular.

2. Métodos experimentales y materiales

2.1. Polímero estudiado y medios empleados

En este estudio se empleó un biopolímero ELR diseñado por el grupo BIOFORGE, nombrado como HRGD6. Presenta la siguiente secuencia de aminoácidos [32]:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP
{[(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂AVTGR**RGD**SPASS[(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₆}

Donde la cadena inicial de la primera línea sirve para inducir la síntesis del polímero, así como para facilitar su proceso de purificación; los pentapéptidos VPGIG constituyen la parte hidrofóbica, permitiendo la transición del polímero a bajas temperaturas; los pentapéptidos VPGKG contienen el aminoácido lisina (K), que presenta una amina terminal, a la que podrán adherirse otros compuestos al realizar una modificación química con ésteres NHS [33]; y la cadena RGD está constituida por 3 aminoácidos provenientes de la fibronectina, componente de la matriz extracelular, que favorece la adhesión de células al polímero [34]. Esto último cobra especial interés, para aplicaciones de regeneración de tejidos, o control de la migración celular, entre otras.

El peso molecular teórico del HRGD6, de acuerdo con el cálculo realizado mediante el software *ExpASY* [35] basado en su secuencia de aminoácidos, es de 60,550kDa, siendo el Dalton (Da) la unidad de masa atómica y molecular, equivalente a gramos por mol.

Para realizar los experimentos, se partió del polímero puro en estado liofilizado, esto es, el polímero deshidratado, tras haber pasado por un proceso de sublimación. Visualmente, el HRGD6 liofilizado presenta un aspecto algodonoso, de color blanquecino (ilustración 5).

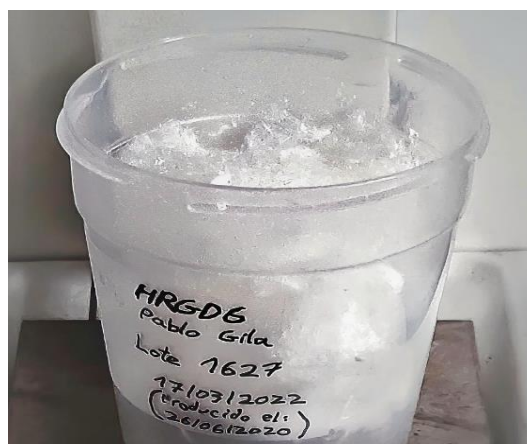


Ilustración 5: HRGD6 liofilizado

Para realizar las disoluciones se empleó principalmente PBS, a una concentración 1X. Se trata de una solución salina tamponada con fosfato, que mantiene un pH 7,4 de forma constante, y que simula la presión osmótica fisiológica [36]. También fue utilizado el medio celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), que añade compuestos como la glucosa, constituyendo una fuente de alimento para las células empleadas en experimentos *in vitro* [37]. Los recipientes empleados para las disoluciones fueron, principalmente, tubos Eppendorf de 1,5 y 2mL, así como tubos Falcon de 50mL, además de cubetas de plástico de 3mL; se adjuntan fotos en el anexo (A2).

2.2. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, o SDS-PAGE (acrónimo de *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) [38] es una técnica empleada para separar distintas proteínas, en función de factores como la longitud de las cadenas polipeptídicas o su peso molecular, y en esencia, en función de su tamaño. De este modo, empleado junto a una muestra de proteínas de peso conocido o *marker*, es posible estimar, por comparación, el peso molecular aproximado de una muestra.

Esto se consigue haciendo pasar las muestras por un gel poroso de poliacrilamida, aplicando una diferencia de potencial entre los bordes superior e inferior. El componente SDS se une a las proteínas, desnaturalizándolas, deshaciendo su estructura tridimensional. Dado que el SDS tiene carga negativa, todas las proteínas acaban con una relación similar entre carga y masa, favoreciendo que la diferencia de potencial aplicada ejerza una fuerza idéntica sobre todas las muestras. De este modo, se favorece una migración de estas desde el ánodo al cátodo, y ya que están desnaturalizadas, serán las más pequeñas las que atraviesan el gel poroso con mayor facilidad, mientras que las de mayor tamaño se desplazarán más despacio, quedándose, en consecuencia, en las partes más altas del gel. Dependiendo del peso de los polímeros estudiados, es posible variar la concentración del gel de poliacrilamida, por lo general entre un 8 y un 15%, para obtener una mayor separación de las proteínas en rangos de peso concretos. Para ello ha de seguirse el protocolo correspondiente [39]. En este estudio se empleó un gel de poliacrilamida al 12%.

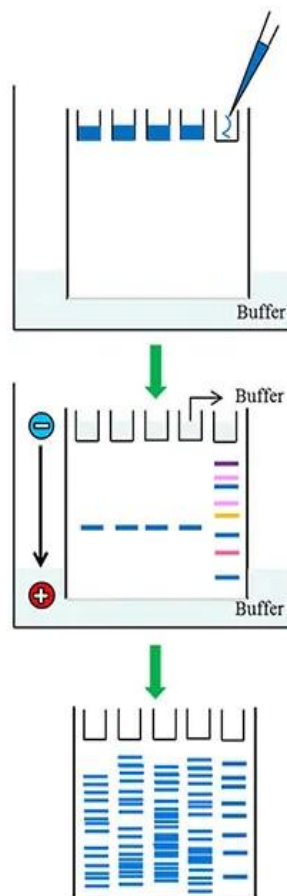


Ilustración 6: Esquema del funcionamiento de una Electroforesis SDS PAGE [41]

Una vez hecho el gel de electroforesis, han de prepararse las muestras. Deberán prepararse en frío, sobre un contenedor con hielo, para asegurar que el polímero se mantiene disuelto. Primero se prepara una disolución del ELR a 1mg/mL, en agua MQ ultrapura. Seguidamente se extraen 16µL de la anterior disolución para teñirlos con 4µL de un tampón buffer a concentración 5X, obteniendo así 20µL de muestra teñida.

Dependiendo del número de pocillos preparados en el gel, se introducirá en cada uno una cantidad distinta de la muestra anterior, así como del marker, según se especifica en la tabla de la derecha. Se empleó un marker del fabricante ThermoFisher, con sus pesos moleculares detallados en el informe del fabricante [40], adjuntados en el anexo (A3).

	marker	muestra
10 pocillos	5µL	4µL
15 pocillos	4µL	2,4µL

Tabla: Cantidades de marker y muestra a utilizar en la electroforesis, según el número de pocillos del gel.

Una vez introducidas las muestras y el marker, se conecta a una fuente de tensión a 25mA. Pasado un cierto tiempo, se tiñe el gel con una disolución de sulfato de cobre, y se obtiene una fotografía del resultado, mediante una cámara especializada para geles de electroforesis [41]. En este estudio se empleó el modelo *Gel Doc EZ Imager*, del fabricante *BIO-RAD*.

2.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, o FTIR (*Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy*) es una técnica de identificación, empleada para estudiar la presencia de ciertos enlaces químicos, así como los distintos grupos funcionales presentes en una muestra. Se basa en la resonancia producida entre los enlaces moleculares, al absorber radiación infrarroja a frecuencias determinadas. De este modo, al exponer los enlaces a una radiación de frecuencia igual a su frecuencia de resonancia, la vibración intramolecular resultante amplificará la intensidad de la señal [42]. Esto puede analizarse mediante un interferómetro de Michelson, con un espejo móvil y otro fijo, situando la muestra sobre el detector a la salida del sistema; la intensidad resultante se mide como función del desfase del espejo móvil respecto a su posición base, de modo que, aplicando una Transformación de Fourier, se obtienen los picos de intensidad para las distintas frecuencias de resonancia, permitiendo determinar los enlaces presentes en la muestra estudiada [43].

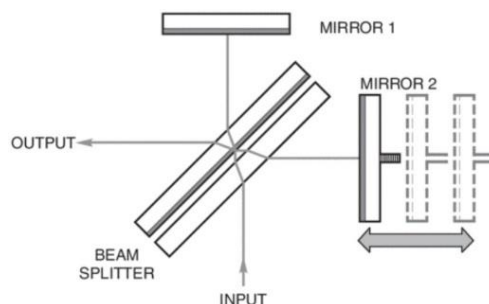


Ilustración 7: Esquema del interferómetro Michelson usado en la espectroscopía FTIR [43]

Sin embargo, algunas bandas de intensidades pueden llegar a solaparse, de modo que, por lo general, no es posible identificar el origen de un pico analizando únicamente el espectro. Para ello se deberá tener en cuenta la composición del material estudiado, pudiendo buscar en el espectro los picos esperados para dicho material, por medio de tablas de espectroscopía [44, 45]. Por tanto, la espectroscopía FTIR resulta especialmente útil para comprobar la calidad de una muestra conocida, así como para comparar los espectros antes y después de realizar una modificación química [46].

Para este trabajo se ha empleado el equipo de Infrarrojo *Tensor 27* del fabricante *Bruker*, que proporciona el software *OPUS* empleado en la toma de datos. Este modelo permite mediciones en un rango de longitudes de onda de 600 a 4000 cm^{-1} . Se realizó una medida del ruido de fondo, seguida de la toma del espectro con el polímero liofilizado, con 64 medidas a una resolución de 2 cm^{-1} . Para ello se dispuso una muestra de aproximadamente 5mg sobre el sensor, limpiando el mismo con acetona antes y después de la medida. Estos datos de espectroscopía infrarroja permitieron determinar ciertos grupos químicos del polímero estudiado, cerciorando con ello una buena calidad del lote empleado. Así mismo, podrá ser utilizado como referencia antes de realizar la modificación química del HRGD6, pudiendo comprobar que se ha llevado a cabo correctamente.

2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido, o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) es una técnica muy versátil, empleada comúnmente en la física de materiales, que permite medir el calor absorbido o liberado por una muestra en un proceso determinado. Esto puede aprovecharse para determinar temperaturas de transición de fase, así como para estudiar la estabilidad térmica de materiales, o bien realizar medidas de capacidades caloríficas, entre otras aplicaciones [47].

Un equipo de DSC consta de dos sondas de temperatura, sobre las cuales se sitúan unos crisoles de aluminio. Uno de ellos contiene la disolución con la muestra a estudiar, mientras que en el otro se introduce únicamente el solvente empleado, sirviendo como referencia. Ambos crisoles de muestra y referencia han de tener la misma masa, ya que se estudiarán los intercambios de calor entre ambos. Cuando se produzca un cambio en la capacidad calorífica de la muestra, como en una transición de fase, se transferirá calor entre ambos crisoles, por medio de una célula de Peltier, hasta que la temperatura se iguale nuevamente. La célula de Peltier generará una diferencia de potencial, que será proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre los dos crisoles. Será posible, por tanto, representar la energía transferida en forma de calor en función de la temperatura, permitiendo identificar las temperaturas a las que se producen determinados procesos térmicos, gracias a los picos de energía presentes en la gráfica [48].

En este estudio se empleó un equipo de DSC *Mettler Toledo 822e*, con refrigeración mediante nitrógeno líquido. El día anterior a la toma de medidas se realizó una disolución de HRGD6 en PBS a 50mg/mL, así como otra de igual concentración en medio celular DMEM, manteniéndolas en agitación a 4°C hasta el día siguiente. No fue necesario ajustar el pH, dado que ambos medios constituyen un tampón químico, manteniendo el pH constante en torno a 7,4 [36, 37]. Para cada medida se introdujeron en frío 20µL de disolución en un crisol estándar de aluminio de 40µL, colocando en otro crisol de referencia la misma cantidad del medio correspondiente. Para asegurar la misma masa en ambos crisoles, se empleó una balanza de precisión *XS105 Mettler Toledo* colocada sobre una mesa anti-vibraciones de granito, con una mampara de vidrio para evitar corrientes, y con una precisión de centésimas de miligramo. Se empleó el software *Mettler* para la toma de datos de DSC, creando un programa para calentar las muestras de 4 a 50°C, a 4°C por minuto. Posteriormente, se determinaron los picos endotérmicos correspondientes a la temperatura de transición inversa del polímero, empleando para ello el apartado de análisis del software de Mettler. Este software está configurado para que los picos endotérmicos, en los que la muestra absorbe energía, apunten hacia abajo. Haciendo la media entre las medidas tomadas, se obtuvo la temperatura de transición inversa del HRGD6 disuelto en cada medio, así como su desviación. Se confirmó que estas temperaturas están por debajo de los 37°C, de modo que el ELR transicionará en hidrogel al introducirse en estudios celulares.

2.5. Turbidimetría

La Turbidimetría es una técnica analítica para determinar la absorbancia de una muestra en suspensión. Para ello, se basa en la medida de la atenuación de un haz de luz al atravesar el medio estudiado, debida a la absorción y dispersión del haz por las partículas de la muestra. Así pues, para medios con baja turbidez, la absorbancia será baja, mientras que si el medio se encuentra turbio, este absorberá y dispersará parte de la luz, y por tanto la absorbancia será mayor [49].

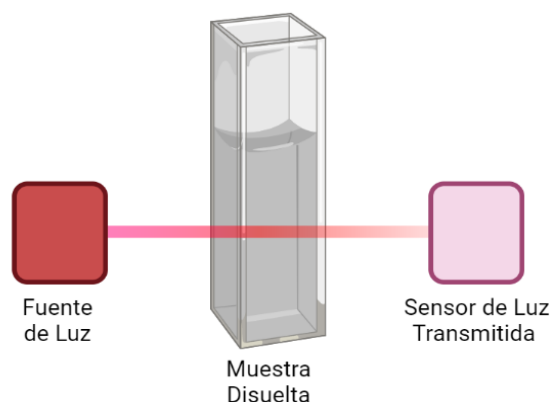


Ilustración 8: Esquema de funcionamiento de una medida de turbidimetría. (Imagen creada con BioRender)

En este estudio, se tomaron medidas de absorbancia a lo largo de una hora, a una temperatura constante de 37°C, para una muestra de HRGD6 disuelto en PBS a 50mg/mL. La disolución se preparó el día anterior, y se dejó agitando en frío durante la noche. Se dispuso una cubeta con 1,3mL de muestra, junto a otra con PBS como blanco de referencia, en un espectrofotómetro *UV/Vis Cary Series* del fabricante *Agilent*. La muestra se introdujo inicialmente a 4°C, para que la transición se realizase dentro del aparato de medida, en lo que se estabilizaba a 37°C, garantizando con ello la homogeneidad del hidrogel inicial. Se activó la toma de aire del aparato, para evitar efectos de condensación en las paredes de la cubeta, que pudiesen falsear los datos de absorbancia. La absorbancia medida se cuantificó en las unidades de absorbancia proporcionadas.

Con este experimento se pudo estudiar la sedimentación del polímero, al medir la disminución de la absorbancia de la muestra a lo largo del tiempo. Estos datos pudieron ser relacionados posteriormente con el seguimiento visual de la coacervación.

2.6. Seguimiento visual de la coacervación

Se propuso ratificar los datos del estudio de turbidimetría de forma visual, para verificar la separación de la disolución en dos fases acuosas. Para ello, se dispuso de 1mL del polímero disuelto en PBS a 50mg/mL, en condiciones idénticas a las que se realizaron las medidas de turbidimetría. Para mantener estas condiciones, a la par que se seguía de forma visual la evolución de la sedimentación, se introdujo la cubeta con la muestra, inicialmente a 4°C, en una incubadora a una temperatura constante de 37°C. Se situó una cámara en el exterior, grabando la evolución de la muestra durante hora y media. Al finalizar, se extrajo la cubeta, se golpeó suavemente para apartar las burbujas, y se tomó una fotografía para registrar la división en dos fases líquidas. Posteriormente, se realizó un *timelapse* con el vídeo, acelerándolo a cámara rápida para visualizar la evolución del proceso, mediante el software *DaVinci Resolve 18*.

2.7. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

La técnica de Dispersión Dinámica de la Luz, o *Dynamic Light Scattering* (DLS) en inglés [50], sirve para determinar una distribución del tamaño de las partículas suspendidas en una disolución, a partir de su movimiento browniano: cuanto más pequeñas sean las partículas, más se verá afectado su movimiento por las colisiones aleatorias de las moléculas de solvente. Análogamente, cuanto más grandes sean, menos se verán afectadas por el movimiento browniano. Esto queda reflejado en la ecuación de Einstein-Stokes,

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde D es el *coeficiente de difusión traslacional* de las partículas, que da cuenta de la velocidad del movimiento browniano; η la viscosidad, T la temperatura absoluta, y k es la constante de Boltzmann. Finalmente, $d(H)$ es el *diámetro hidrodinámico* de las partículas, esto es, el diámetro equivalente a una esfera con el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula medida, y es el principal resultado deducido por la técnica de DLS. Por tanto, conociendo el

coeficiente de difusión traslacional de una muestra, sería posible deducir su diámetro hidrodinámico aplicando la ecuación de Einstein-Stokes.

El coeficiente de difusión puede sufrir ligeras alteraciones, debido a factores como la estructura de la superficie de la muestra, así como la forma no esférica de esta o bien por los iones presentes en la disolución. Sin embargo, en este trabajo no se tendrán en cuenta dichos factores, ya que el interés reside en la medida cualitativa del proceso de autoensamblado del polímero al transicionar, así como de su posterior sedimentación. Para ello es relevante que la temperatura sea constante en todo momento, ya que influye directamente en la viscosidad del medio; asimismo, variaciones en la temperatura podrían originar corrientes de convección en la muestra, causando movimientos no aleatorios que estropearían la medida.

Para medir la velocidad de difusión de las partículas debida al movimiento browniano, la técnica de DLS se aprovecha de las fluctuaciones dinámicas de la intensidad de la luz dispersada al atravesar la muestra. La suma de fases de las partículas en movimiento evoluciona constantemente, de modo que la intensidad para las partículas pequeñas fluctúa más rápidamente que para las grandes.

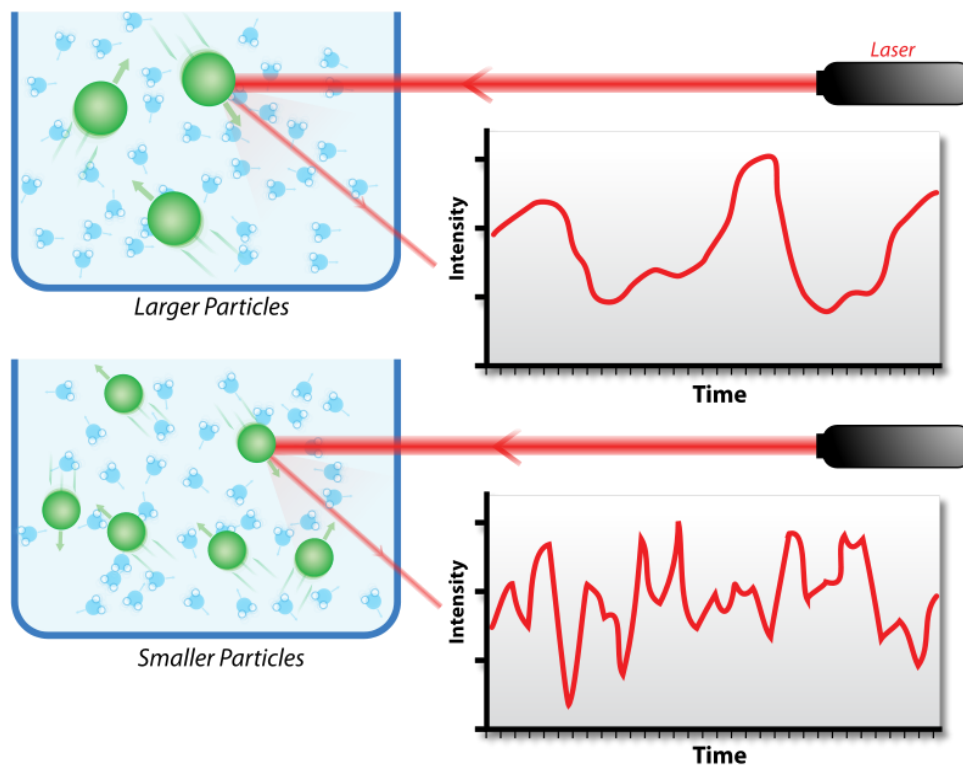


Ilustración 9: Esquema de una medida de DLS. Las partículas grandes se ven menos afectadas por el movimiento browniano, produciéndose una menor fluctuación en la intensidad (arriba). Las partículas pequeñas se mueven más rápido, por lo que la fluctuación de la intensidad es mayor (abajo) [65]

Si bien sería posible analizar el espectro de frecuencias contenido en las fluctuaciones de la intensidad causadas por el movimiento browniano, esto no resulta muy eficiente. La solución empleada en la técnica de DLS es utilizar un *correlador* de señal digital, cuya función es comparar la señal consigo misma a lo largo del tiempo. Conociendo el estado inicial de una señal aleatoria, será imposible predecir su estado en un tiempo mucho mayor; pero para un tiempo muy pequeño δt , se puede esperar una fuerte correlación. Esta correlación es representada a lo largo

del tiempo, en lo que se denomina un *correlograma*. De este modo, el tiempo en que la correlación empieza a decaer significativamente, resulta un indicativo del tamaño medio de las partículas en suspensión. Por otro lado, cuanto mayor pendiente tenga la caída de la correlación, mayor monodispersidad tendrá la muestra, y alternativamente, cuanto menos pronunciada sea la pendiente, mayor será su polidispersidad [51].

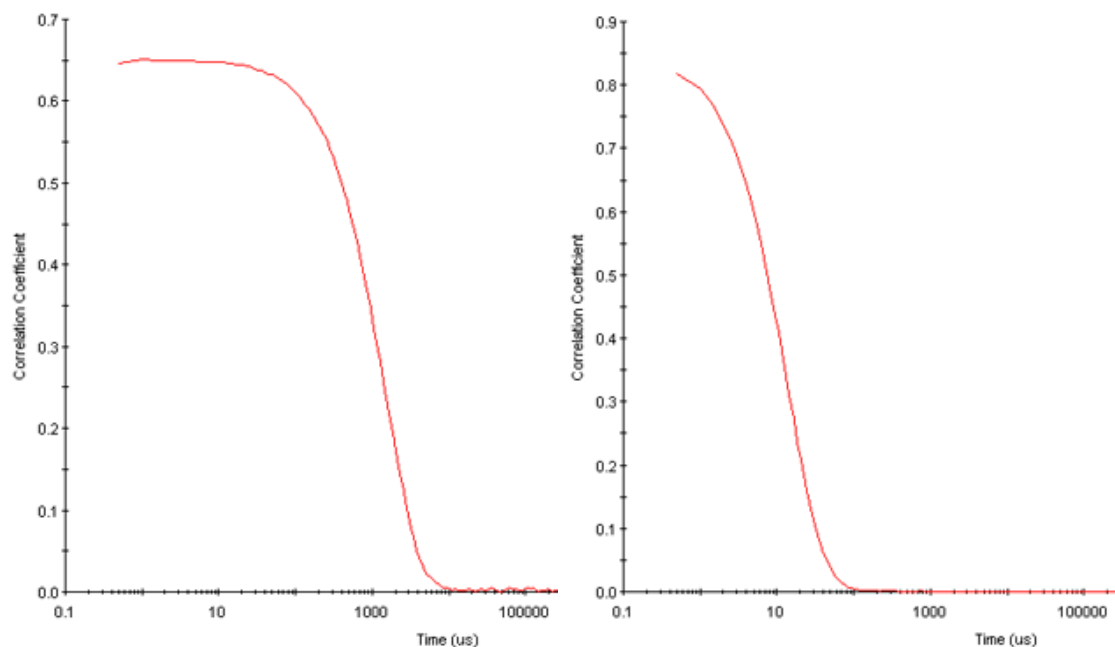


Ilustración 10: Correlogramas para partículas grandes disueltas (izquierda), y para partículas pequeñas (derecha) [51]

Para determinar el diámetro hidrodinámico a partir de los correlogramas, la técnica de DLS se aprovecha de dos métodos distintos: por un lado, se realiza un ajuste de la función de correlación a una exponencial, con el objetivo de obtener una estimación del tamaño medio y de la polidispersidad, de acuerdo con la norma ISO13321 Parte 8 [52]; así como también se ajusta el correlograma a una exponencial múltiple, lo que permite realizar un análisis de porcentaje de intensidades según los tamaños de las partículas [53]. El software empleado para el análisis, *Zetasizer Software*, del fabricante *Malvern Instruments*, se basa en estos métodos para realizar la interpretación del correlograma, ofreciendo datos de distribución de tamaños de partículas, según el porcentaje de intensidad con el que aparecen.

Para realizar las medidas de DLS se empleó un *Zetasizer Nano ZSP*, de *Malvern Instruments*, con 1mL de muestra de HRGD6, disuelto en PBS a 50mg/mL, a una temperatura constante de 37°C. Se tomaron medidas de correlación durante 1 hora, realizando un promediado cada 3 medidas. La muestra se introdujo inicialmente a 4°C, para favorecer la transición del polímero dentro del aparato, en lo que se calentaba a 37°C. Si bien esto no garantiza la precisión de las primeras medidas, permite un estudio cualitativo de la transición inicial del polímero. Las medidas posteriores permitieron estudiar el proceso de agregación del polímero, pudiendo determinarse el tiempo que tarda en comenzar a sedimentarse en el fondo de la cubeta.

2.8. Modificación Química

Para poder estudiar posteriormente la separación de fases líquido-líquido en presencia de células, será necesario poder distinguir en el microscopio entre la estructura polimérica y las células. Para ello, resultará indispensable realizar una tinción a las células, así como añadir un componente fluoróforo al polímero, de modo que se puedan estudiar por medio de una microscopía de fluorescencia, en este caso en un microscopio confocal de fluorescencia [54]. Algunas tinciones celulares permiten incluso distinguir entre células vivas y muertas, emitiendo fluorescencia verde a 488nm para células vivas, y roja a 570nm para células muertas [55], resultando de gran interés para futuras investigaciones. Por el momento, se realizó una modificación química del HRGD6 mediante una reacción amino [33], añadiendo a las lisinas del polímero el fluoróforo Cy5, con fluorescencia a 663nm [56], que permitirá estudiar, en un futuro, la interacción del ELR con las células de su entorno durante la coacervación.

Se propuso modificar muy pocas lisinas, las suficientes para poder observar el polímero al microscopio, pero sin alterar sus propiedades físicas. En consecuencia, se decidió añadir aproximadamente 1 molécula de Cy5 por cada 20 moléculas de HRGD6; en total, una cantidad de 0,5mg de Cy5 por cada 1000mg de HRGD6.

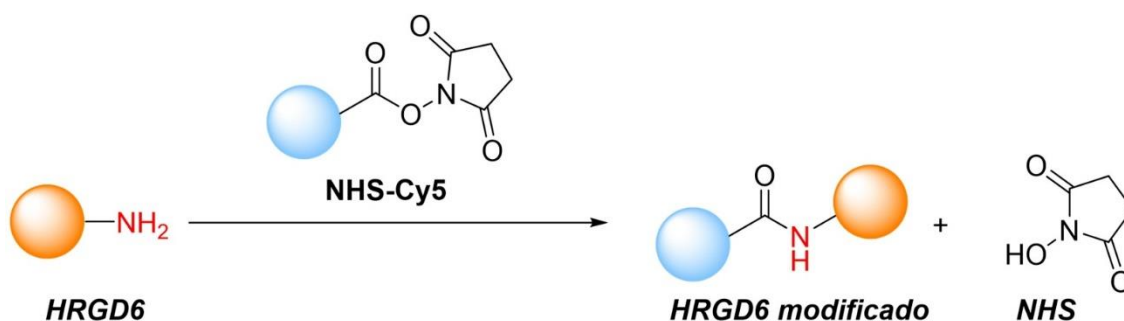


Ilustración 11: Esquema de la reacción amino empleada para modificar el HRGD6, añadiendo el fluoróforo Cy5. El éster NHS reacciona con la amina terminal de la lisina del HRGD6, formando un conjugado estable entre el Cy5 y el HRGD6 mediante una unión amino, liberando un NHS como residuo (Imagen creada con el software ChemDraw)

Para realizar la modificación química [33], se extrajeron 1000,0mg de HRGD6 puro, del lote con número de producción 1627, el mismo empleado durante las caracterizaciones de este trabajo. Se introdujo el polímero en un matraz, y se purgó con nitrógeno para propiciar una atmósfera inerte. Se añadieron 20mL de disolvente amídico N,N-dimetilformamida (DMF) [57], y se dejó agitando 2 horas. Se pesaron 0,5mg de NHS-Cy5 para disolverlos en 0,5mL de DMF, se añadieron al matraz con el polímero, y se dejó en agitación durante la noche. Posteriormente, se precipitó mediante un lavado con dietiléter (Et2O) [58], con un centrifugado a 15000g de 20 minutos, a 4°C. Seguidamente, se eliminaron los restos de DMF y Et2O realizando 3 lavados con acetona, por medio de centrifugados a 17500g de 15 minutos y 4°C. Se guardó a presión reducida durante la noche para eliminar los restos de acetona, y al día siguiente se resuspendió en agua MQ ultrapura, manteniéndolo en agitación a 4°C durante 4 días. Se realizaron 3 diálisis a lo largo de 3 días, la primera con agua destilada, y las dos siguientes con agua MQ. Finalmente, se filtró para garantizar la esterilidad del polímero final, y se liofilizó.

Una vez se obtuvo el polímero liofilizado, se pesó para calcular el rendimiento de la modificación, y se realizó una espectroscopía FTIR según el apartado (2.3), para comparar el espectro del HRGD6 modificado con el del polímero puro.

Del mismo lote empleado para la modificación, se preservaron aparte a -20°C unos 100mg de polímero puro, para que, en un futuro, se pudiese caracterizar con mayor precisión la modificación realizada, mediante análisis de RMN (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) [59], así como por espectroscopía MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) [60].

3. Discusión de resultados

3.1. Peso molecular

Primero se calculó el peso molecular teórico del HRGD6, introduciendo su secuencia de aminoácidos en el software ExPASy [35], arrojando un peso teórico de 60,550kDa.

Posteriormente se realizó una electroforesis SDS PAGE del polímero, con una muestra del lote que será empleado en posteriores experimentos, con número de identificación de producto 1627, siguiendo la metodología expuesta en el apartado (2.2).

En el margen derecho se adjunta la imagen obtenida tras la medida. Se observa que la muestra se encuentra por debajo del indicador de 66,2kDa, en la zona esperada para el peso molecular teórico del HRGD6, de 60,550kDa. Apenas se observan franjas adicionales, por lo que se determina una buena pureza del polímero. Se confirma con esto la buena calidad del lote utilizado, pudiendo por tanto ser empleado en posteriores experimentos.

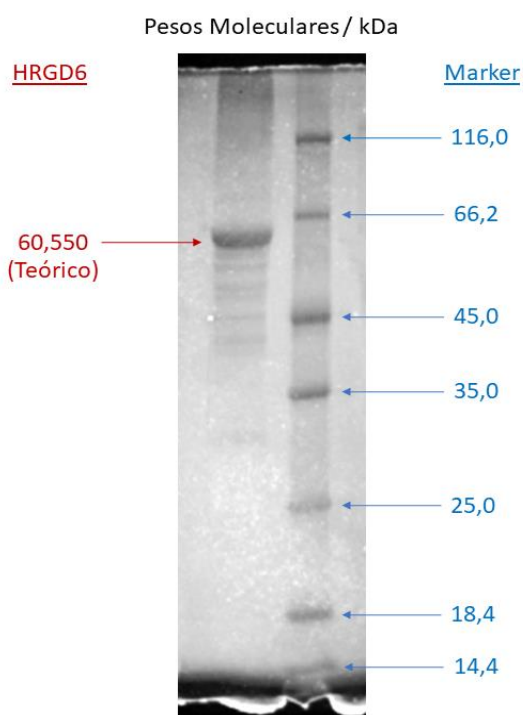


Ilustración 12: Fotografía del gel de electroforesis realizado, con la muestra de HRGD6 a la izquierda, y el marker a la derecha. En los márgenes se indican los pesos moleculares correspondientes a cada franja.

3.2. Espectroscopía Infrarroja

Se realizó una medida de espectroscopía infrarroja del HRGD6, siguiendo la metodología del apartado (2.3). Conociendo la estructura del polímero [32], se pudieron buscar los picos indicativos de los enlaces esperados mediante tablas de espectroscopía [44, 45], garantizando con ello la pureza de la muestra. El espectro del polímero puro se comparó posteriormente con el del HRGD6 tras añadir el fluoróforo, en los resultados de la modificación química (3.5).

A continuación, se adjunta en la ilustración 13 el espectro de FTIR obtenido para el HRGD6. Analizando en busca de enlaces típicos en polímeros de tipo elastina [61], se encuentran contribuciones de grupos OH a los 3300cm^{-1} , así como en torno a los 1250cm^{-1} . Aparece un pico a 3060cm^{-1} , correspondiente a la hibridación de enlaces simples de carbono sp^3 , así como tres picos a 2870 , 2930 y 2960cm^{-1} , que se corresponden a la hibridación de enlaces dobles de carbono sp^2 , y que se encuentran en la región de la Amida B [62]. Se observa un pico de contribución del enlace simple C-O, solapado con la aportación del OH, en los 1250cm^{-1} , correspondiente a la zona de la Amida III, característica del estiramiento del C-O y la deformación del N-H. Se tienen dos picos muy intensos a causa del doble enlace C=O, a 1630 y 1520cm^{-1} , donde posiblemente también contribuyan dobles enlaces C=N. Estos dos picos tienen aportaciones de las bandas de Amida I y II respectivamente [63], por las cuales se producen las vibraciones de estiramiento del enlace C=O en la Amida I, así como las vibraciones de flexión del enlace N-H y estiramiento del C-N en la Amida II. Siguiendo con los enlaces típicos de compuestos nitrados, en el anterior pico de 1520cm^{-1} , así como a los 1440cm^{-1} , previsiblemente también contribuirán enlaces simples C-N, así como grupos NH_3^+ . Se observa cierta contribución de los grupos NH_2 a los 3460cm^{-1} , parcialmente solapada con la aportación de los OH, y que se corresponde a la zona de la Amida A, del estiramiento de los enlaces O-H y N-H. Los grupos NH_2 también podrían tener una ligera contribución en torno a los 1000cm^{-1} , si bien podría estar solapada con otras pequeñas aportaciones de NH_3^+ , así como otros enlaces simples sin identificar. No se observan contribuciones de enlaces triples, entre los 2500 y 2000cm^{-1} .

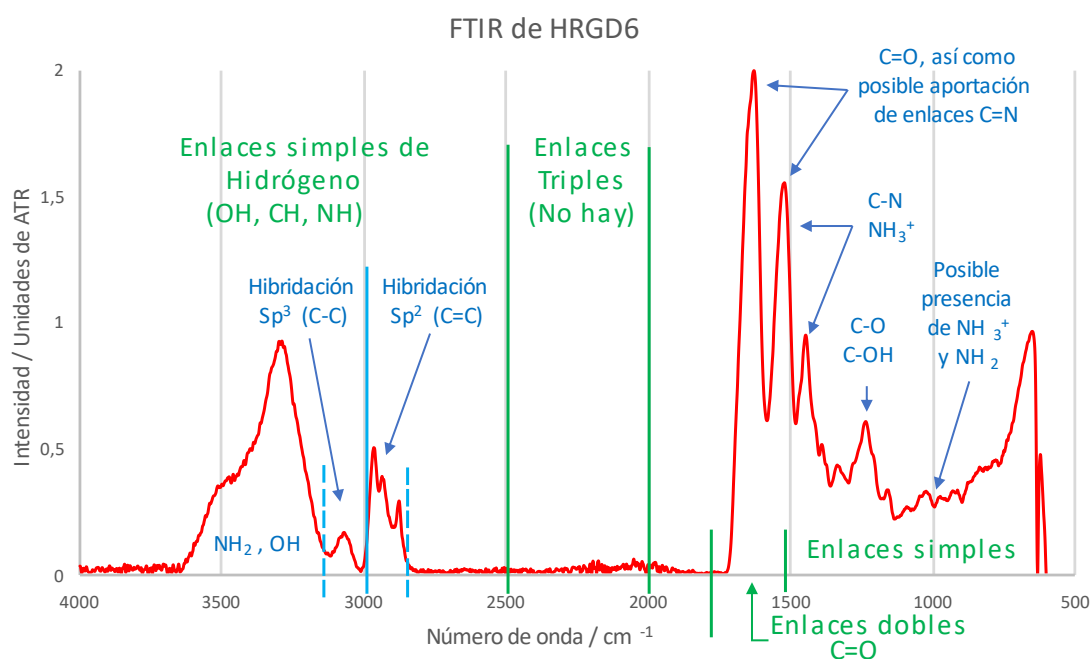


Ilustración 13: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier del HRGD6, con indicaciones de los picos característicos más relevantes para su análisis.

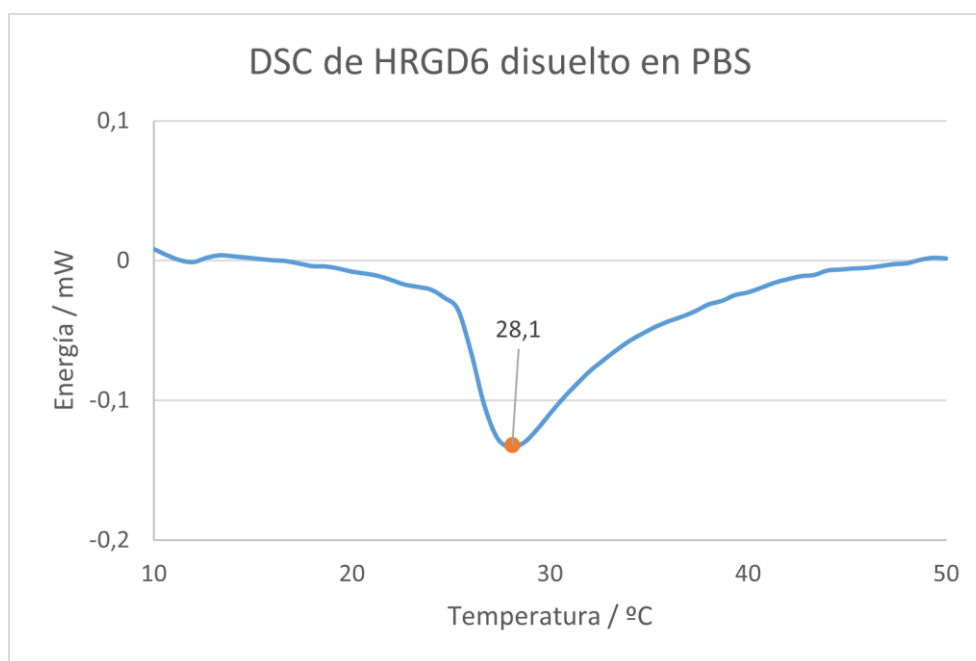
Se concluye que el espectro obtenido concuerda con el esperado para un polipéptido [61], y en especial para la estructura del HRGD6 estudiado [32], concluyendo, por tanto, la semejanza con los enlaces característicos de las proteínas ELR, y con ello la pureza de la muestra empleada a lo largo de este trabajo.

3.3. Temperatura de Transición Inversa

Se prepararon en frío dos disoluciones de HRGD6, una disuelta en PBS y otra en DMEM, de 200 μ L cada una, ambas a una concentración de 50mg/mL. Las dos se encontraban en torno a pH 7,4, ya que ambos medios constituyen tampones salinos [36, 37]. Se dejaron agitando a 4 $^{\circ}$ C durante la noche anterior a la toma de medidas. Se realizaron 3 medidas de DSC de la disolución en PBS, así como 2 medidas de la de DMEM, según la metodología presentada en el apartado (2.4). Se extrajo el pico de transición para cada medida, empleando la función de análisis del programa *METTLER*. Se calculó el promedio entre los picos de transición obtenidos para el HRGD6 en cada medio, así como su desviación.

Para la disolución en PBS, se obtuvo una temperatura de transición inversa de $28,1 \pm 0,1$ $^{\circ}$ C, mientras que para la de DMEM se obtuvo una temperatura de $30,9 \pm 0,7$ $^{\circ}$ C.

La diferencia entre las T_t medidas pone de manifiesto la influencia de factores presentes en el medio, como la salinidad y el pH, en el proceso de autoensamblado del polímero. Dado que estas temperaturas son inferiores a 37 $^{\circ}$ C, se puede asegurar que el ELR se agregará a temperatura fisiológica. A continuación, se adjuntan las tablas con los resultados de las mediciones, así como la gráfica de DSC de la primera medida realizada en PBS, a modo orientativo. Las demás gráficas se encuentran disponibles en el anexo (A4).



HRGD6 disuelto en PBS	Temperatura del pico / $^{\circ}$ C
Medida 1	28,1
Medida 2	28,0
Medida 3	28,3
Media	28,1
Desviación	0,1

HRGD6 disuelto en DMEM	Temperatura del pico / $^{\circ}$ C
Medida 1	31,4
Medida 2	30,4
Media	30,9
Desviación	0,7

Ilustración 14: Gráfica de DSC, de la primera medida de la temperatura de transición inversa del HRGD6, disuelto en PBS (arriba), así como tablas con los resultados experimentales y la desviación de las medidas tomadas, en PBS y en DMEM (abajo).

3.4. Evolución de la coacervación

Para el estudio de turbidimetría, se preparó una disolución de 1,3mL de HRGD6 en PBS a una concentración de 50mg/mL, guardándola en agitación a 4°C la noche previa a cada medida, para favorecer la resuspensión del polímero. Se tomaron 2 medidas de turbidimetría, de 60 minutos cada una, a una temperatura constante de 37°C, si bien inicialmente se introdujo la muestra a 4°C, siguiendo la metodología del apartado (2.5). En ambas experiencias, se observó el rápido aumento inicial de la absorbancia al transicionar el polímero, debido al aumento inicial de la temperatura, seguido de una notable disminución al cabo de media hora, a medida que el polímero transicionado se sedimentaba en el fondo de la cubeta. Se adjunta la gráfica de la primera medida de turbidimetría en la ilustración 15, pudiendo encontrar las gráficas de las dos medidas en el anexo (A5).

Se realizó el seguimiento visual de otra muestra idéntica del polímero, en las mismas condiciones de 37 °C durante 90 minutos, siguiendo el procedimiento detallado en el apartado (2.6). De esta forma, se pudo relacionar la evolución de la coacervación con los datos de absorbancia tomados previamente. Mediante el software *DaVinci Resolve 18*, se montó un timelapse con las imágenes, facilitando la visualización del proceso.

El vídeo se encuentra disponible en el siguiente enlace privado:

<https://youtu.be/1xIHIM1C9sA>

A continuación, en la ilustración 15 se exponen los resultados de la turbidimetría, relacionados con el seguimiento visual. A tiempo 0, la disolución se encuentra a 4°C, por lo que todavía no ha transicionado (imagen A). La muestra se calienta y alcanza los 37°C, aumentando la absorbancia al transicionar. Tras pasar 10 minutos (imagen B) la transición se ha completado, observándose cierta estabilidad en la absorbancia. Pasada media hora, la absorbancia disminuye, y se observa que gran parte del material se ha depositado en el fondo de la cubeta (imagen C). Esta deposición se sigue produciendo hasta los 50 minutos (imagen D), momento a partir del cual, la absorbancia se mantiene relativamente estable, al no quedar casi polímero en la parte superior de la cubeta. Tras más de 60 minutos, se golpeó suavemente la muestra para apartar las burbujas, y se tomó una fotografía de las dos fases líquidas (imagen E), identificándose la fase superior de medio acuoso, en este caso PBS (1), y la fase inferior de consistencia gelatinosa del hidrogel (2).

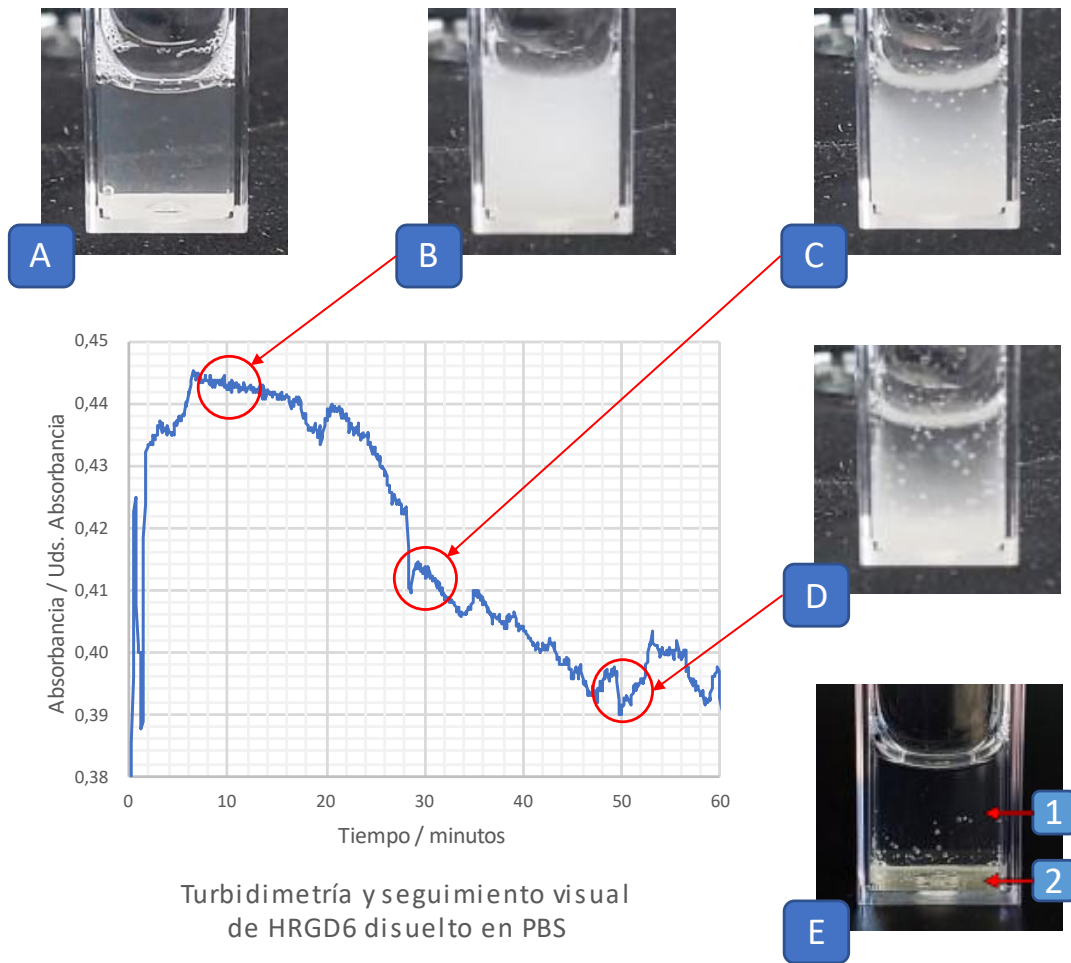


Ilustración 15: Medida de la evolución de la absorbancia de la disolución de HRGD6, durante 1 hora a 37°C. Las imágenes adjuntas se corresponden al seguimiento visual de una disolución idéntica en iguales condiciones, a tiempo 0 minutos (A), 10 minutos (B), 30 (C), 50 (D) y más de 60 minutos (E). En las imágenes se aprecia claramente cómo se va sedimentando el polímero transicionado.

Se realizó también un estudio de la evolución de la coacervación durante 1 hora mediante DLS, para una muestra de 1mL de HRGD6 disuelto en PBS a 50mg/mL, de acuerdo con la metodología del apartado (2.7) [64]. Mediante el software de análisis de Zetasizer, se obtuvieron los picos de porcentaje de intensidad según la distribución de tamaños.

A continuación, en la ilustración 16 se expone la evolución del tamaño de los agregados, a medida que pasa el tiempo. La transición acababa de empezar en la primera medida, debido al aumento inicial de la temperatura, y tuvo lugar durante el primer minuto aproximadamente. Sin embargo, dado que la temperatura todavía se estaba estabilizando, podrían estarse dando corrientes que alterasen las mediciones, de modo que inicialmente podrían no ser precisas, hasta que no se estabilizase la transición. Pese a ello, a modo orientativo, las medidas del primer minuto sugieren el aumento del tamaño inicial. A tiempo 3 minutos, la transición se había

estabilizado; el tamaño medio de las partículas se encontraba en torno a 1,2 micras, concordando con resultados previos [26], si bien el análisis del software indicaba un alto grado de polidispersidad. La agregación del polímero se produjo rápidamente en los minutos posteriores, alcanzando tamaños de 4 micras al cabo de los primeros 10 minutos. A partir de 6 micras, este análisis por picos de intensidad deja de ser fiable [51], de modo que en este primer enfoque no se pueden determinar tamaños mayores, para medidas de más de cuarto de hora de agregación. Por ello, el análisis de los picos de intensidad resulta más efectivo para caracterizar la evolución de los tamaños tras la transición del polímero, mientras que el análisis de los correlogramas permite obtener más detalles acerca del proceso de sedimentación.

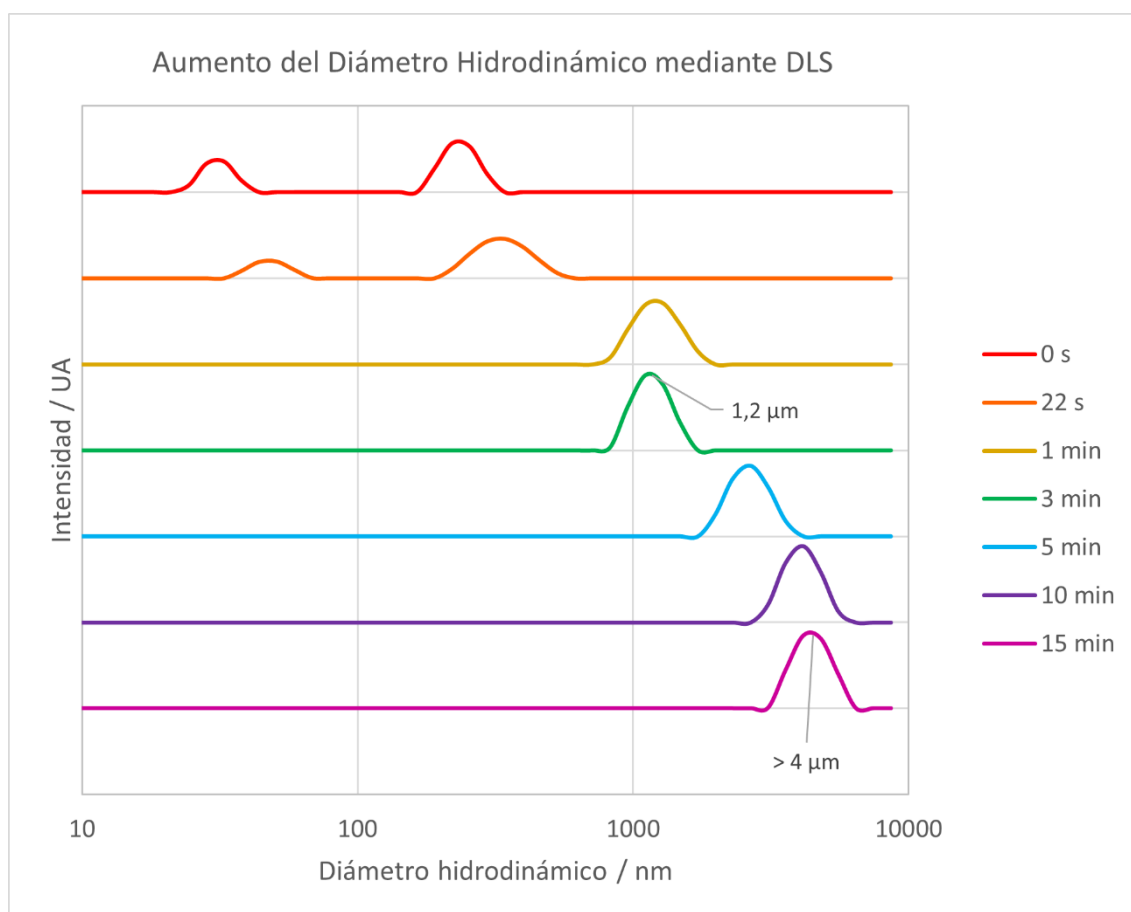


Ilustración 16: Distribución de los picos de intensidad (en Unidades Arbitrarias, UA) en función de los tamaños de las partículas, para varias medidas de DLS durante los primeros 15 minutos, de una muestra de HRGD6 disuelta en PBS.

A continuación, se realizó un análisis de los correlogramas, adjuntados en la ilustración 17, para deducir información adicional sobre el proceso de sedimentación del HRGD6.

A tiempo 0 minutos, se observa una rápida caída de la correlación, así como una pendiente poco pronunciada, indicativo de un alto grado de polidispersidad al comienzo de la transición (A). Tras los primeros 3 minutos, la transición se estabiliza, formando agregados de en torno a 1,2 micras, si bien la muestra sigue presentando un alto grado de polidispersidad, como se deduce de la pendiente poco pronunciada del correlograma (B)

Al alcanzar los 10 minutos, comienzan a aparecer picos de sedimentación en la parte baja del correlograma (C), indicando la presencia de partículas sedimentándose. Se observa un aumento en la polidispersidad, patente en la pendiente del correlograma a los 20 minutos (D), así como ruido en los primeros instantes de las medidas, presente entre los minutos 10 y 30 (E), debido a la inestabilidad de la muestra; es en este periodo de tiempo en el que, presumiblemente, tiene lugar la mayor parte de la sedimentación, concordando también con los resultados de turbidimetría y seguimiento visual. Se observa que el tamaño medio ha aumentado tras 30 minutos, como se deduce del desplazamiento de la caída del correlograma hacia la derecha de la gráfica, a tiempos mayores.

Tras este periodo en que se produce la mayor parte de la sedimentación, la muestra comienza a estabilizarse, y el ruido de los instantes iniciales desaparece. Se incrementa la intensidad de los picos de sedimentación a los 40 minutos (F), indicando la sedimentación de agregados de mayor tamaño; este aumento del tamaño de las partículas prosigue hasta los 60 minutos, patente en el desplazamiento de la caída del correlograma hacia tiempos mayores (G).

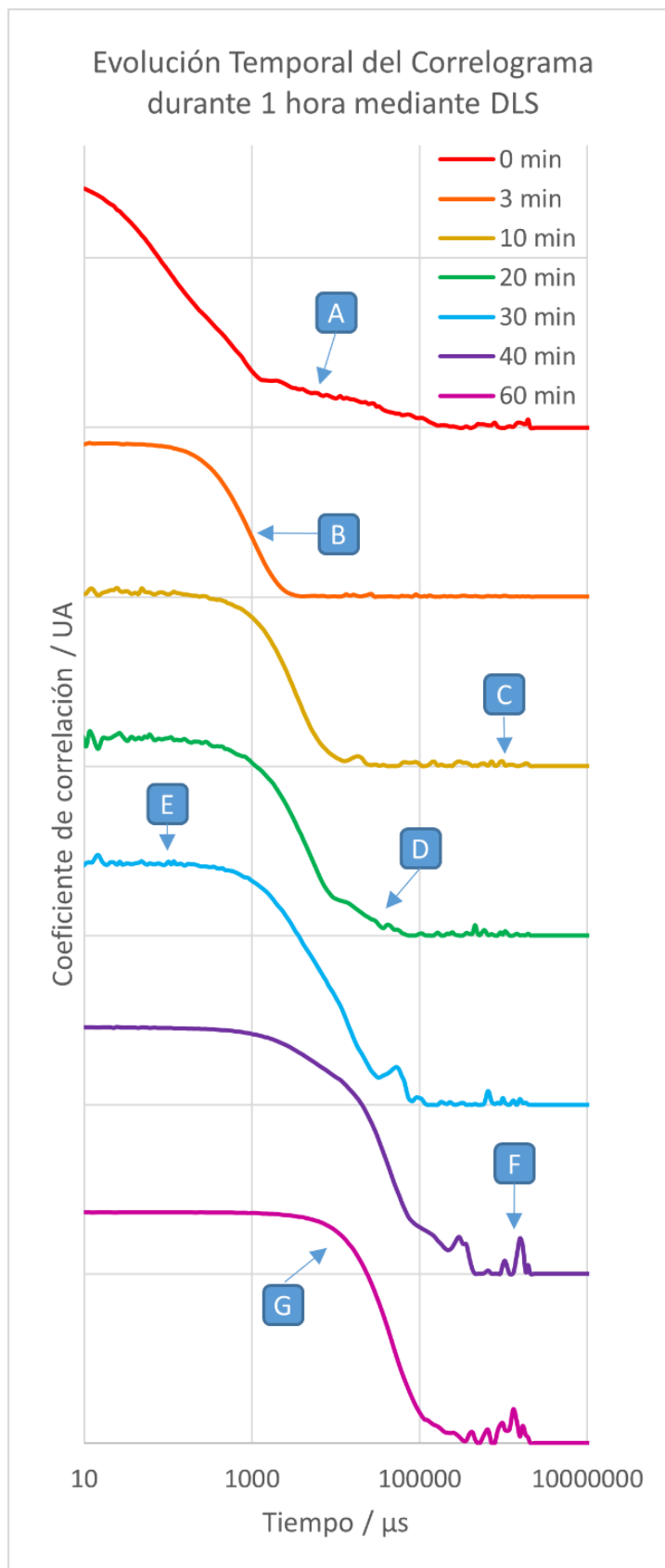


Ilustración 17: Correlogramas de DLS para una muestra de HRGD6 en PBS al cabo de 0 minutos, 3 minutos, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos.

3.5. Modificación Química

Una vez realizada la modificación química (2.8), se pesó en campana la cantidad de polímero obtenido, para calcular el rendimiento del proceso. Se emplearon 1000,5mg de reactivos, y se obtuvieron 825,6mg de HRGD6 modificado, arrojando un rendimiento del 82,5%.

Se realizó también una espectroscopía FTIR, siguiendo la metodología del apartado (2.3), para comparar con el espectro del polímero sin modificar, obtenido previamente en el apartado (3.2). Tal y como cabía esperar, no se observaron cambios relevantes del espectro, ya que tan solo se habría añadido, aproximadamente, 1 molécula de Cy5 por cada 20 moléculas de HRGD6, manteniendo intacta la mayor parte del ELR para preservar sus propiedades físicas; no obstante, visualmente se comprueba que ha cambiado el color del polímero, habiendo adquirido una tonalidad azulada tras la modificación, debido a la adición del fluoróforo Cy5.



Ilustración 18: Aspecto del HRGD6 tras la modificación, con una tonalidad azulada a causa de la adición de Cy5.

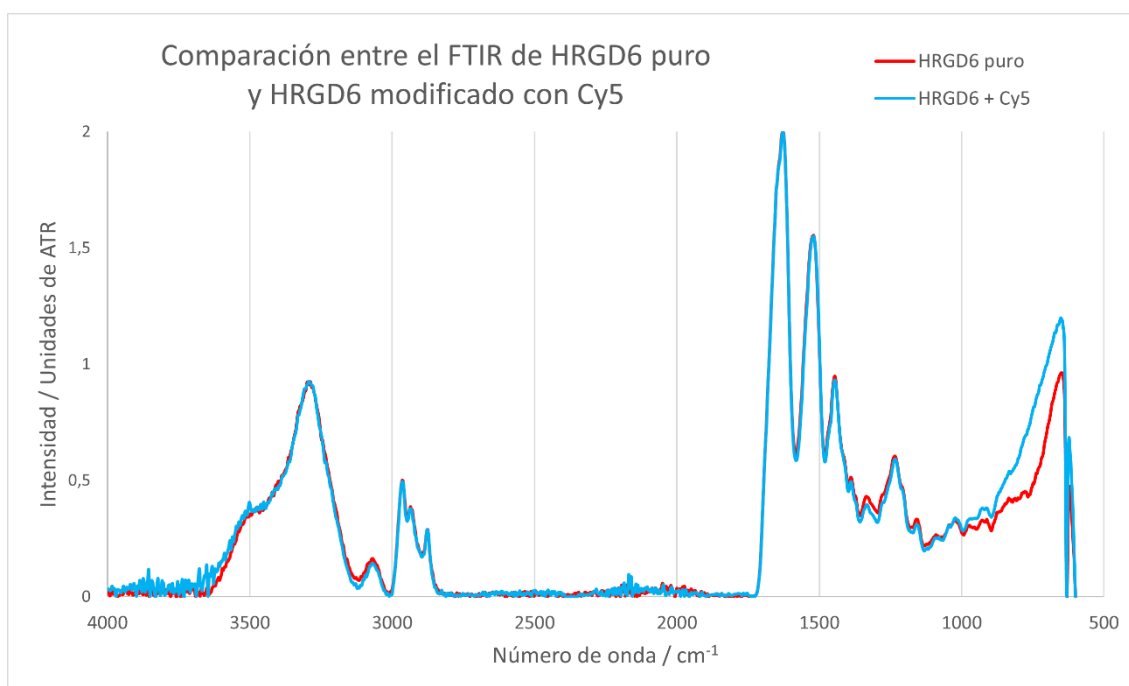


Ilustración 19: Comparación entre los espectros FTIR del HRGD6 puro, y el HRGD6 modificado con Cy5. No se observan diferencias relevantes entre ambos espectros, indicativo de que la cantidad modificada es muy pequeña.

Para obtener una caracterización más precisa del polímero modificado, en un futuro se realizará una espectroscopía MALDI-TOF [60], que no pudo ser completada durante este trabajo debido a problemas técnicos.

4. Conclusiones y futuras líneas de investigación

Actualmente, poco se sabe sobre el efecto de la separación en dos fases líquidas de la elastina en la migración celular, cobrando especial interés en el campo de la regeneración de tejidos. Para poder estudiar esta cuestión, se ha realizado una caracterización física del proceso de coacervación de un polímero recombinante similar a la elastina, el HRGD6, con la ventaja de tener una secuencia RGD, que fomenta la adhesión celular al polímero.

Para este ELR, se ha verificado un peso molecular de 60,550kDa mediante una electroforesis SDS-PAGE; también se ha realizado una espectroscopía FTIR, caracterizando sus enlaces y comprobando una alta similitud con la elastina. Se ha verificado que el HRGD6 transiciona a temperatura fisiológica, obteniendo mediante DSC una T_t para el polímero disuelto en PBS de $28,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$, así como de $30,9 \pm 0,7^\circ\text{C}$ para disoluciones en medio celular DMEM. Se ha caracterizado el proceso de coacervación mediante técnicas de Turbidimetría y DLS, así como también se ha realizado un seguimiento visual del proceso. Con ello, se ha concluido que la coacervación de este polímero desemboca en una separación de fases líquido-líquido, apareciendo inicialmente gotas poliméricas de entre 1 y 2 micras, concordando con estudios previos [26]; estas gotas coalescen rápidamente, alcanzando tamaños de en torno a 4 micras a los 10 minutos, produciéndose la sedimentación de la mayor parte del polímero pasados 30 minutos desde la transición. Tras esta primera media hora, ya es posible discernir una separación de fases líquido-líquido, que prácticamente se completa al alcanzar los 50 minutos.

Como investigación futura, se realizarán estudios de la coacervación del HRGD6 en presencia de células. Para ello, se ha modificado un gramo del polímero añadiendo el fluoróforo Cy5, que permitirá estudiar, mediante microscopía de fluorescencia, la interacción de la fase polimérica con las células del entorno; se han obtenido 825,6mg de polímero modificado, con un rendimiento del 82,5%. Se han comparado los espectros FTIR del polímero modificado y sin modificar, si bien no se aprecian cambios relevantes. Próximamente, se continuará la caracterización de este HRGD6 modificado con diversas técnicas, entre las que se incluye una espectroscopía MALDI-TOF, que no pudo ser completada debido a problemas técnicos. Una vez completada la caracterización, se estudiará el proceso de coacervación de este polímero en presencia de células, para determinar el posible papel de la separación de fases líquido-líquido en la migración celular.

Referencias

- [1] H. F. Hildebrand, "Biomaterials - a history of 7000 years," *BioNanoMaterials*, vol. 14, no. 3–4, pp. 119–133, 2013, doi: 10.1515/bnm-2013-0014.
- [2] J. L. Finch, G. H. Heath, A. R. David, and J. Kulkarni, "Biomechanical assessment of two artificial big toe restorations from ancient Egypt and their significance to the history of prosthetics," *Journal of Prosthetics and Orthotics*, vol. 24, no. 4, pp. 181–191, Oct. 2012, doi: 10.1097/JPO.0B013E31826F4652.
- [3] M. Velasco-Suarez, J. B. Martinez, R. G. Oliveros, and P. R. Weinstein, "Archaeological origins of cranial surgery: trephination in Mexico," *Neurosurgery*, vol. 31, no. 2, pp. 313–319, 1992, doi: 10.1227/00006123-199208000-00017.
- [4] Dreyer JLE, *Tycho Brahe: A Picture of Scientific Life and Work in the Sixteenth Century*, Digital edn. 2014. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1890.
- [5] National Institute of Health, "Clinical Applications of Biomaterials, NIH Consensus Development Conference Statement," 1982. Accessed: Mar. 29, 2022. [Online]. Available: <https://consensus.nih.gov/1982/1982Biomaterials034html.htm>
- [6] B. D. Ratner, "Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 21, pp. 171–191, Jun. 2019, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOENG-062117-120940.
- [7] J. C. Rodríguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, M. Alonso, and A. M. Testera, "Developing functionality in elastin-like polymers by increasing their molecular complexity: the power of the genetic engineering approach," *Progress in Polymer Science*, vol. 30, no. 11, pp. 1119–1145, Nov. 2005, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2005.07.004.
- [8] A. Girotti, A. Fernández-Colino, I. M. López, J. C. Rodríguez-Cabello, and F. J. Arias, "Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications," *Biotechnology Journal*, vol. 6, no. 10, pp. 1174–1186, Oct. 2011, doi: 10.1002/BIOT.201100116.
- [9] Thomas Ryckmans, "Structure of the proteinogenic amino acids," *Wikimedia Commons: Amino Acids*, 2021. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proteinogenic_aminoacids_structures_and_pka\(edited_with_correct_threonine\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proteinogenic_aminoacids_structures_and_pka(edited_with_correct_threonine).png) (accessed May 02, 2022).
- [10] J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, A. Girotti, C. Garca-Arévalo, F. J. Arias, and M. Alonso, "Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 1, pp. 111–122, Dec. 2010, doi: 10.2217/NNM.10.141.
- [11] M. C. Urrejola *et al.*, "Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly),"

- International Journal of Morphology*, vol. 36, no. 4, pp. 1463–1471, Dec. 2018, doi: 10.4067/S0717-95022018000401463.
- [12] R. Wang, J. Ozsvar, G. C. Yeo, and A. S. Weiss, “Hierarchical assembly of elastin materials,” *Current Opinion in Chemical Engineering*, vol. 24. Elsevier Ltd, pp. 54–60, Jun. 01, 2019. doi: 10.1016/j.coche.2019.01.004.
- [13] P. Contessotto *et al.*, “Elastin-like recombinamers-based hydrogel modulates post-ischemic remodeling in a non-transmural myocardial infarction in sheep,” *Science Translational Medicine*, vol. 13, no. 581, Feb. 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.aaz5380.
- [14] D. W. Urry, *What sustains life? Consilient mechanisms for protein-based machines and materials*. Boston (USA): Birkhäuser Boston, 2006. doi: 10.1007/978-0-8176-4562-5.
- [15] D. W. Urry, “Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, no. 51, pp. 11007–11028, Dec. 1997, doi: <https://doi.org/10.1021/jp972167t>.
- [16] C. G. Carter and D. F. Houlihan, “Protein synthesis,” *Fish Physiology*, vol. 20, no. C, pp. 31–75, Jan. 2001, doi: 10.1016/S1546-5098(01)20003-X.
- [17] W. Landgraf and J. Sandow, “Recombinant human insulins-clinical efficacy and safety in diabetes therapy,” *European Endocrinology*, vol. 12, no. 1, pp. 12–17, Mar. 2016, doi: 10.17925/EE.2016.12.01.12.
- [18] A. Ibáñez-Fonseca, T. Flora, S. Acosta, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials,” *Matrix Biology*, vol. 84. Elsevier B.V., pp. 111–126, Nov. 01, 2019. doi: 10.1016/j.matbio.2019.07.003.
- [19] V. v. Yaminsky and E. A. Vogler, “Hydrophobic hydration,” *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 6, no. 4, pp. 342–349, Aug. 2001, doi: 10.1016/S1359-0294(01)00104-2.
- [20] N. K. Li, F. G. Quiroz, C. K. Hall, A. Chilkoti, and Y. G. Yingling, “Molecular description of the lcst behavior of an elastin-like polypeptide,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 10, pp. 3522–3530, Oct. 2014, doi: <https://doi.org/10.1021/bm500658w>.
- [21] J. C. Rodríguez-Cabello, A. Girotti, A. Ribeiro, and F. J. Arias, “Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 811, Humana Press, 2012, pp. 17–38. Accessed: Jul. 07, 2022. [Online]. Available: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-388-2_2
- [22] D. W. Urry *et al.*, “Hydrophobicity scale for proteins based on inverse temperature transitions,” *Biopolymers*, vol. 32, no. 9, pp. 1243–1250, Sep. 1992, doi: 10.1002/BIP.360320913.

- [23] A. Fernández-Colino, A. Girotti, M. I. López, F. J. Arias, and J. C. Rodríguez-Cabello, "Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas," *Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales*, vol. 19, no. 1, pp. 8–16, Dec. 2011, doi: 10.5821/SIBB.V19I1.1811.
- [24] J. C. Rodríguez-Cabello, I. G. de Torre, S. Acosta, S. Salinas, and M. Herrero, "Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling," in *Self-Assembling Biomaterials: Molecular Design, Characterization and Application in Biology and Medicine*, Elsevier, 2018, pp. 49–78. doi: 10.1016/B978-0-08-102015-9.00004-6.
- [25] J. C. Rodríguez-Cabello, Sara Escalera, Diana Juanes-Gusano, M. Santos, and A. Girotti, "Designing Elastin-Like Recombinamers for Therapeutic and Regenerative Purposes," *Multifunctional Hydrogels for Biomedical Applications*, pp. 37–62, Jul. 2022, doi: 10.1002/9783527825820.CH3.
- [26] J. T. Cirulis and F. W. Keeley, "Kinetics and morphology of self-assembly of an elastin-like polypeptide based on the alternating domain arrangement of human tropoelastin.," *Biochemistry*, vol. 49, no. 27, pp. 5726–5733, Jul. 2010, doi: <https://doi.org/10.1021/bi100468v>.
- [27] L. Tian *et al.*, "Spontaneous assembly of chemically encoded two-dimensional coacervate droplet arrays by acoustic wave patterning," *Nature Communications*, vol. 7, p. 13068, Oct. 2016, doi: 10.1038/ncomms13068.
- [28] L. D. Muiznieks, S. Sharpe, R. Pomès, and F. W. Keeley, "Role of Liquid–Liquid Phase Separation in Assembly of Elastin and Other Extracellular Matrix Proteins," *Journal of Molecular Biology*, vol. 430, no. 23, pp. 4741–4753, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.JMB.2018.06.010.
- [29] P. G. Argudo and J. J. Giner-Casares, "Folding and self-assembly of short intrinsically disordered peptides and protein regions," *Nanoscale Advances*, vol. 3, no. 7, pp. 1789–1812, Apr. 2021, doi: 10.1039/D0NA00941E.
- [30] A. Tarakanova, J. Ozsvar, A. S. Weiss, and M. J. Buehler, "Coarse-grained model of tropoelastin self-assembly into nascent fibrils," *Materials Today Bio*, vol. 3, p. 100016, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.MTBIO.2019.100016.
- [31] G. C. Yeo, F. W. Keeley, and A. S. Weiss, "Coacervation of tropoelastin," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 167, no. 1–2. Elsevier B.V., pp. 94–103, Sep. 14, 2011. doi: 10.1016/j.cis.2010.10.003.
- [32] I. González De Torre, M. Santos, L. Quintanilla, A. Testera, M. Alonso, and J. C. Rodríguez Cabello, "Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 6, pp. 2495–2505, Jun. 2014, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2014.02.006.
- [33] Thermo Fisher Scientific, "Amine-Reactive Crosslinker Chemistry," *Protein Biology Resource Library*. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/amine-reactive-crosslinker-chemistry.html#2> (accessed Jul. 05, 2022).

- [34] J. C. Liu and D. A. Tirrell, "Cell Response to RGD Density in Crosslinked Artificial Extracellular Matrix Protein Films," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 11, p. 2988, Nov. 2008, doi: 10.1021/BM800469J.
- [35] H. C. , G. A. Gasteiger E., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., and Bairoch A., "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server," in *The Proteomics Protocols Handbook*, John M. Walker, Ed. Humana Press, 2005, pp. 571–607. Accessed: Jun. 29, 2022. [Online]. Available: https://web.expasy.org/compute_pi/pi_tool-doc.html
- [36] Thermo Fisher Scientific, "Technical Resources: Media Formulations for PBS, pH 7.4, Catalog Number 10010023." <https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/media-formulation.160.html>
- [37] Sigma-Aldrich, "Spec Sheet: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)." <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/specification-sheet/SIGMA/D6429> (accessed Jun. 24, 2022).
- [38] J. M. Manns, "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins," *Current Protocols in Microbiology*, vol. 22, no. 1, p. A.3M.1-A.3M.13, Aug. 2011, doi: 10.1002/9780471729259.MCA03MS22.
- [39] F. T. Sambrook J, "Agarose Gel Electrophoresis," in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2012, pp. 94–98. doi: 10.1016/0307-4412(83)90068-7.
- [40] Thermo Fisher Scientific, "Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker," 2017. Accessed: Mar. 18, 2022. [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0011769_Unstain_Protein_Molec_Wght_Mark_UG.pdf
- [41] Sigma-Aldrich, "Introduction to SDS-PAGE - Separation of Proteins Based on Size." <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page> (accessed Mar. 08, 2022).
- [42] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy," *Photosynthesis Research*, vol. 101, no. 2–3, pp. 157–170, Sep. 2009, doi: DOI 10.1007/s11120-009-9439-x.
- [43] MKS Instruments, "Technical note: Introduction to FT-IR Spectroscopy." <https://www.newport.com/n/introduction-to-ftir-spectroscopy> (accessed Jul. 12, 2022).
- [44] E. Pretsch, P. (Philippe) Bühlmann, and C. (Christian) Affolter, *Structure determination of organic compounds: tables of spectral data*, 3rd ed. Springer, 2000.
- [45] Sigma-Aldrich, "IR Spectrum Table & Chart by Frequency Range." <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical->

- article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table (accessed Jun. 13, 2022).
- [46] B. R. Singh, "Basic Aspects of the Technique and Applications of Infrared Spectroscopy of Peptides and Proteins," in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins*, American Chemical Society, 2000, pp. 2–37.
- [47] S. Suriñach, M. D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera, and M. T. Clavaguera-mora, "La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 31, no. 1, pp. 11–19, 1992.
- [48] L. C. Thomas, "An Introduction to the Techniques of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated DSC," in *Thermal Analysis. Fundamentals and Applications to Material Characterization*, 2005, pp. 9–25. Accessed: May 25, 2022. [Online]. Available: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/11493>
- [49] J. Zhu and L. J. Kaufman, "Collagen I Self-Assembly: Revealing the Developing Structures that Generate Turbidity," *Biophysical Journal*, vol. 106, no. 8, p. 1831, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.BPJ.2014.03.011.
- [50] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophysical Reviews*, vol. 8, no. 4, p. 427, Dec. 2016, doi: 10.1007/S12551-016-0218-6.
- [51] Malvern Panalytical, "An Introduction to Dynamic Light Scattering (DLS)," *DLS technical note MRK656-01*, 2010. <https://www.malvernpanalytical.com/es/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction> (accessed Apr. 22, 2022).
- [52] International Organisation for Standardisation (ISO), "Methods for Determination of Particle Size Distribution Part 8: Photon Correlation Spectroscopy," *International Standard ISO13321*. 1996.
- [53] B. E. Dahneke, "Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering," *Wiley*, p. 570, 1983, doi: 10.1002/POL.1983.130211210.
- [54] Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, "Principios de la técnica de Microscopía Láser Confocal." <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/microscopia/microscopa-laser-confocal> (accessed May 03, 2022).
- [55] Thermo Fisher Scientific, "LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (488/570) Protocol." <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/live-dead-cell-imaging-kit-488-570.html> (accessed Jul. 04, 2022).
- [56] Sigma Aldrich, "Cy5-azide Substance Record," *PubChem*, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329767899> (accessed Jul. 05, 2022).

- [57] National Center for Biotechnology Information, "N,N-dimethylformamide Compound Summary," *PubChem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6228> (accessed May 07, 2022).
- [58] National Center for Biotechnology Information, "Et2O diethylether Compound Summary," *PubChem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Et2O-diethylether> (accessed Jul. 05, 2022).
- [59] D. Y. Zhu, Z. H. Deng, and S. W. Chen, "A review of nuclear magnetic resonance (NMR) technology applied in the characterization of polymer gels for petroleum reservoir conformance control," *Petroleum Science*, vol. 18, no. 6, pp. 1760–1775, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.PETSCI.2021.09.008.
- [60] T. Y. Hou, C. Chiang-Ni, and S. H. Teng, "Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 27, no. 2, pp. 404–414, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.JFDA.2019.01.001.
- [61] M. C. Popescu, C. Vasile, and O. Craciunescu, "Structural analysis of some soluble elastins by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy," *Biopolymers*, vol. 93, no. 12, pp. 1072–1084, Dec. 2010, doi: 10.1002/BIP.21524.
- [62] Z. S. Silva *et al.*, "Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis," *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 1–7, Jun. 2015, doi: 10.1038/srep11448.
- [63] M. C. Popescu, C. Vasile, and O. Craciunescu, "Structural analysis of some soluble elastins by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy," *Biopolymers*, vol. 93, no. 12, pp. 1072–1084, Dec. 2010, doi: 10.1002/BIP.21524.
- [64] S. Singh, D. E. Demco, K. Rahimi, R. Fechete, J. C. Rodriguez-Cabello, and M. Möller, "Coacervation of Elastin-Like Recombinamer Microgels," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 37, no. 2, pp. 181–186, Jan. 2016, doi: 10.1002/marc.201500457.
- [65] Mike Jones, "An example of Dynamic Light Scattering," *Wikimedia Commons: Dynamic Light Scattering*, 2010. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DLS.svg> (accessed Apr. 19, 2022).

Anexo

A1. Tabla de Aminoácidos

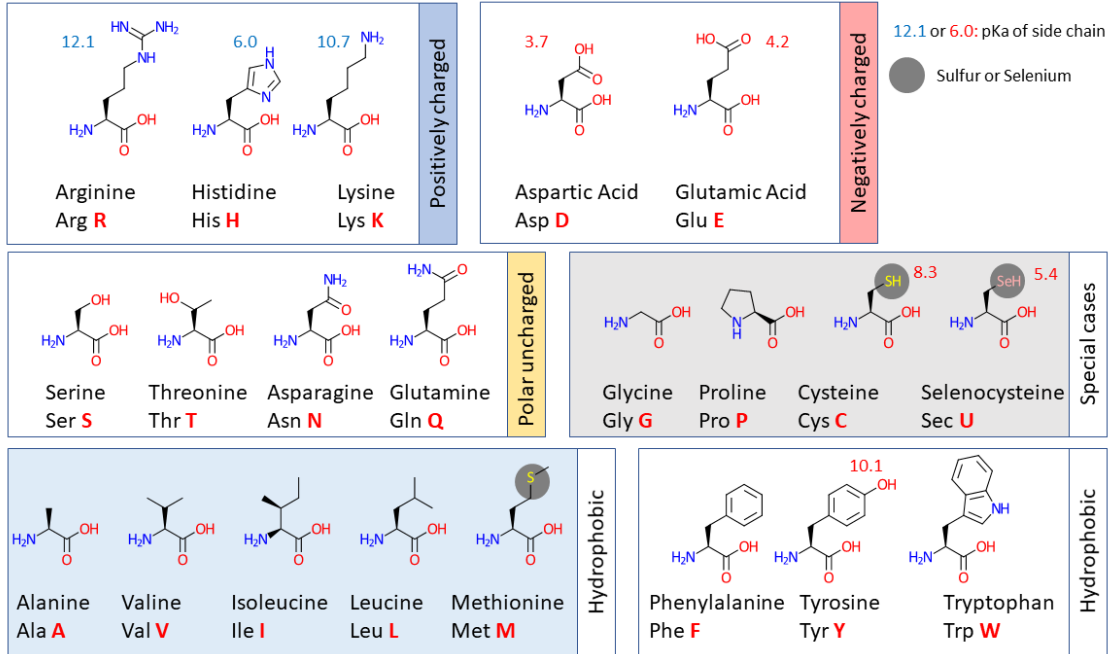


Ilustración 20: Tabla de aminoácidos, con su correspondiente nomenclatura y composición [9]

A2. Recipientes más utilizados

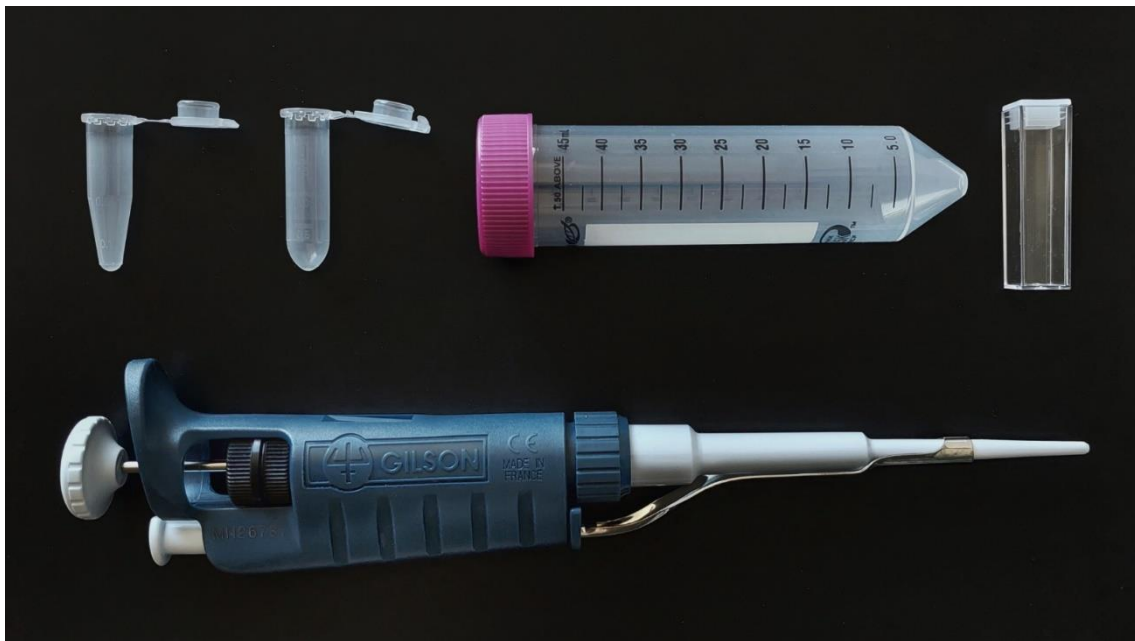
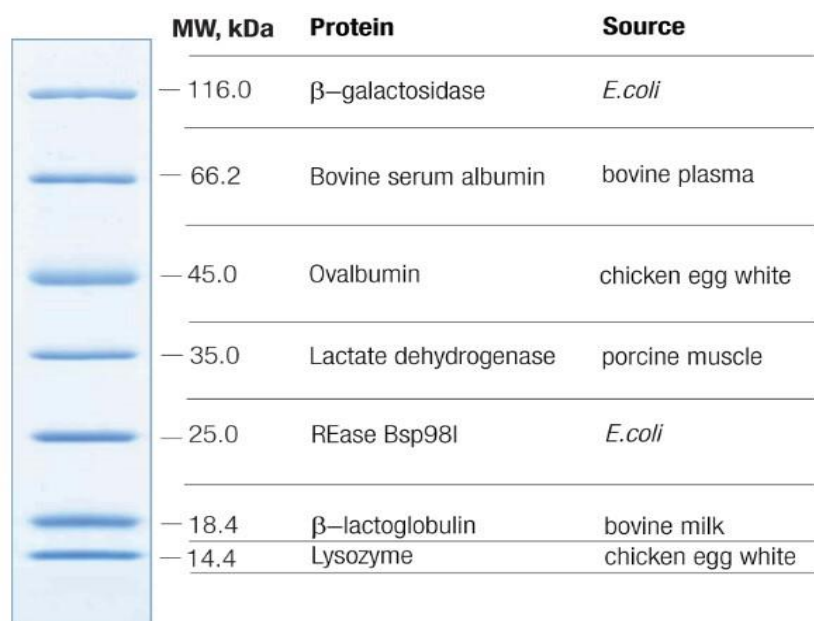


Ilustración 21: De izquierda a derecha: Eppendorf de 1,5mL, Eppendorf de 2mL, Tubo Falcon de 50mL, cubeta estándar de 3mL. En la parte inferior de la imagen, una de las pipetas de precisión empleadas, de la serie Gilson PIPETMAN

A3. Marker de electroforesis

Unstained Protein Molecular Weight Marker



8-16% Tris-glycine SDS-PAGE

Ilustración 22: Pesos moleculares del marker #26610 de Thermo Fisher [40]

A4. Gráficas de DSC

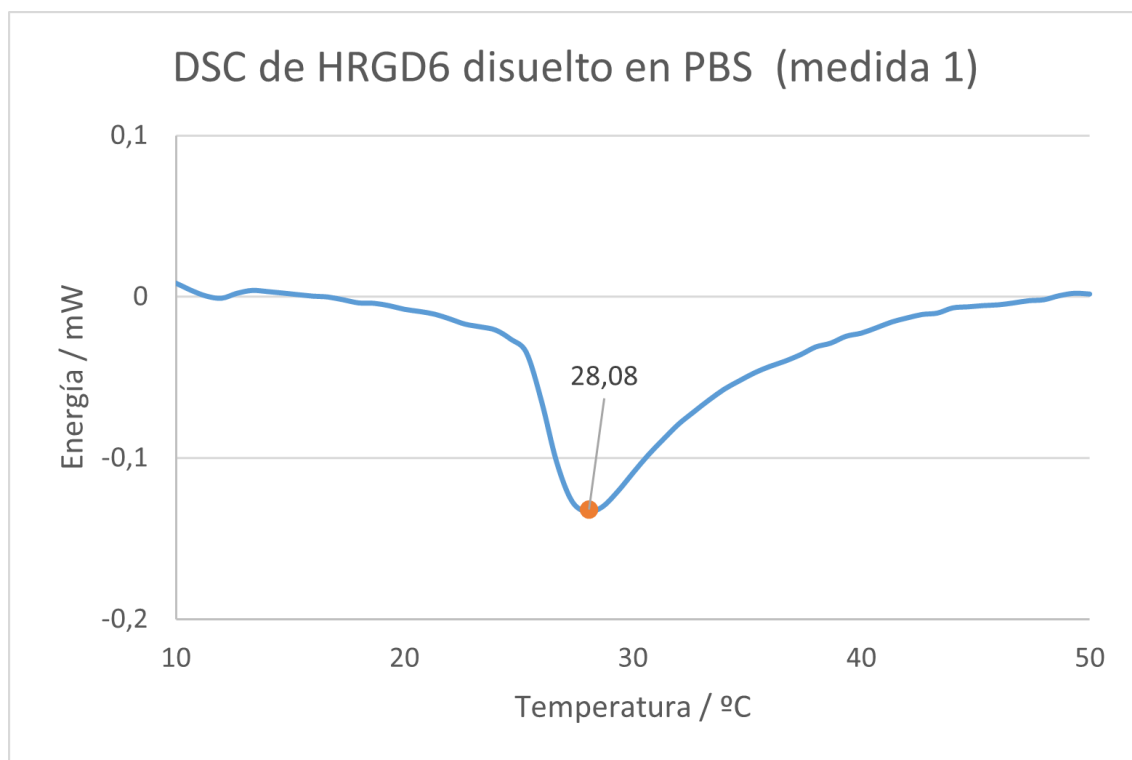


Ilustración 23: Medida 1 de DSC de la disolución de HRGD6 en PBS a 50mg/mL

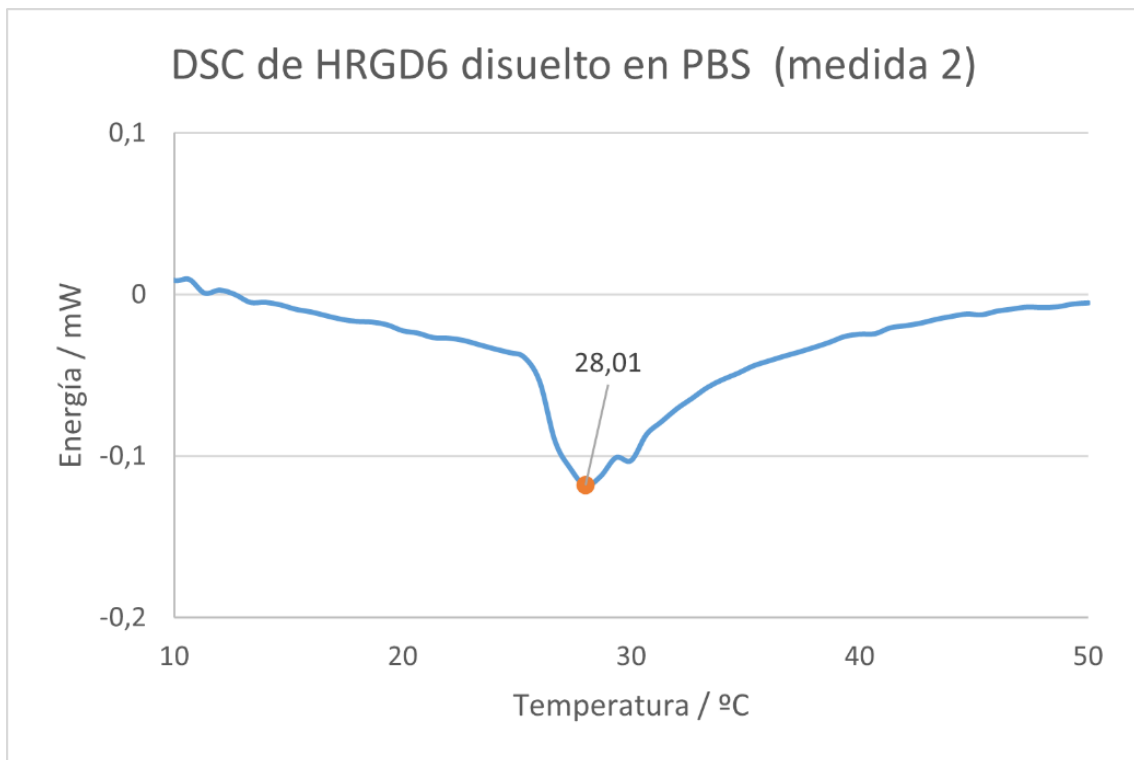


Ilustración 24: Medida 2 de DSC de la disolución de HRGD6 en PBS a 50mg/mL

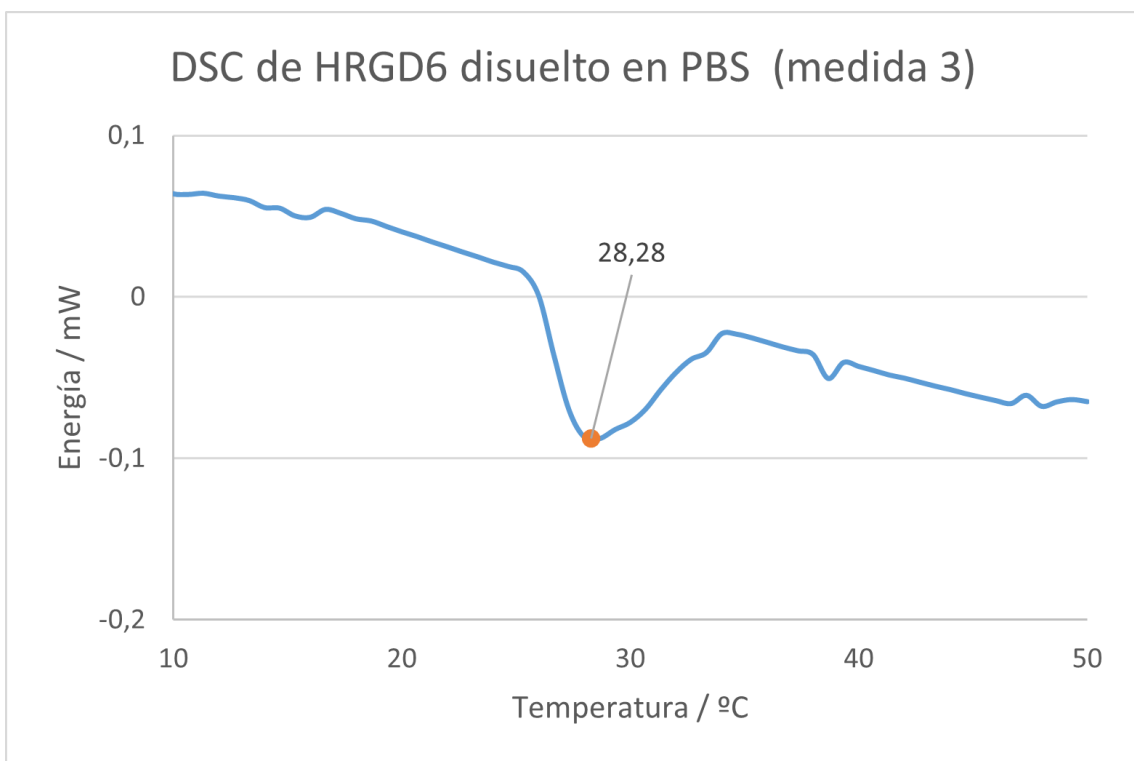


Ilustración 25: Medida 3 de DSC de la disolución de HRGD6 en PBS a 50mg/mL

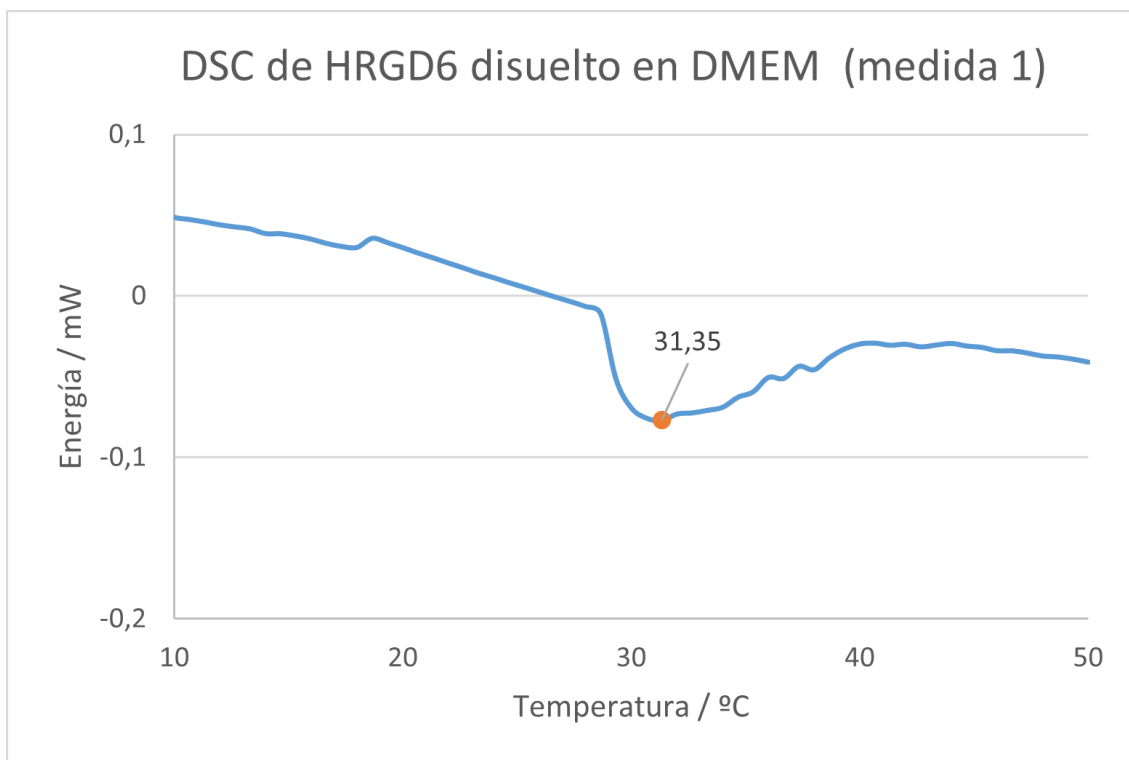


Ilustración 26: Medida 1 de DSC de la disolución de HRGD6 en DMEM a 50mg/mL

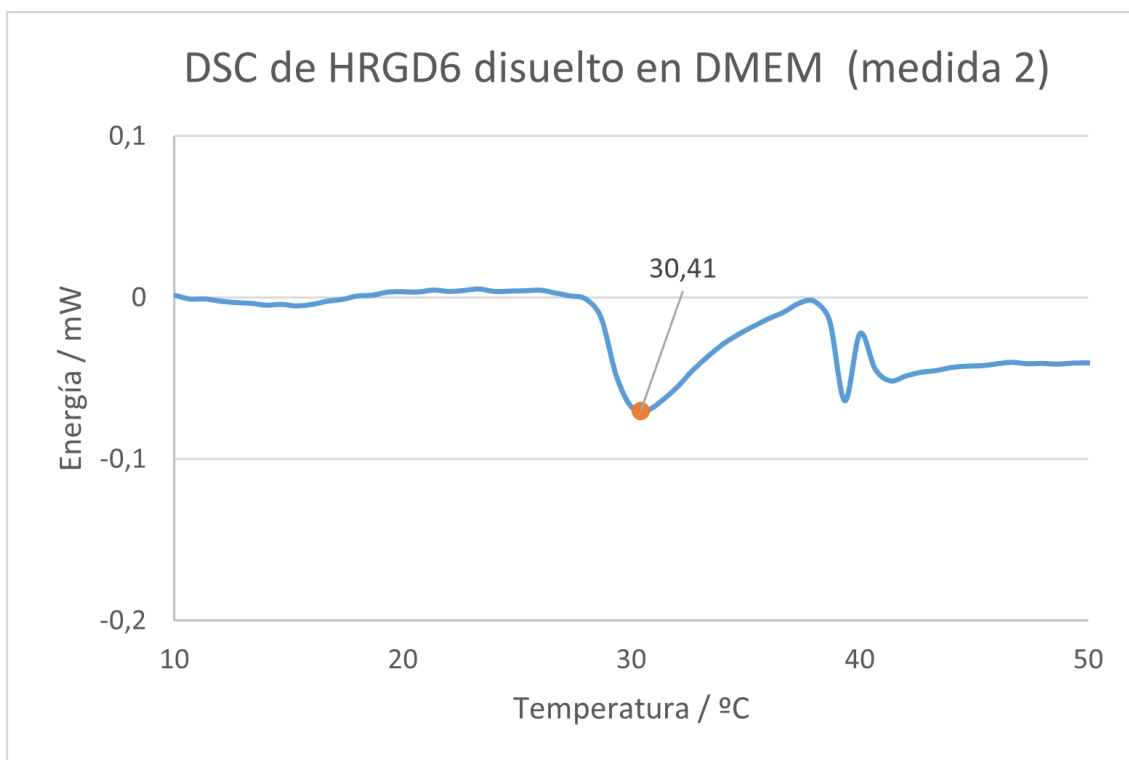


Ilustración 27: Medida 2 de DSC de la disolución de HRGD6 en DMEM a 50mg/mL

A5. Gráficas de Turbidimetría

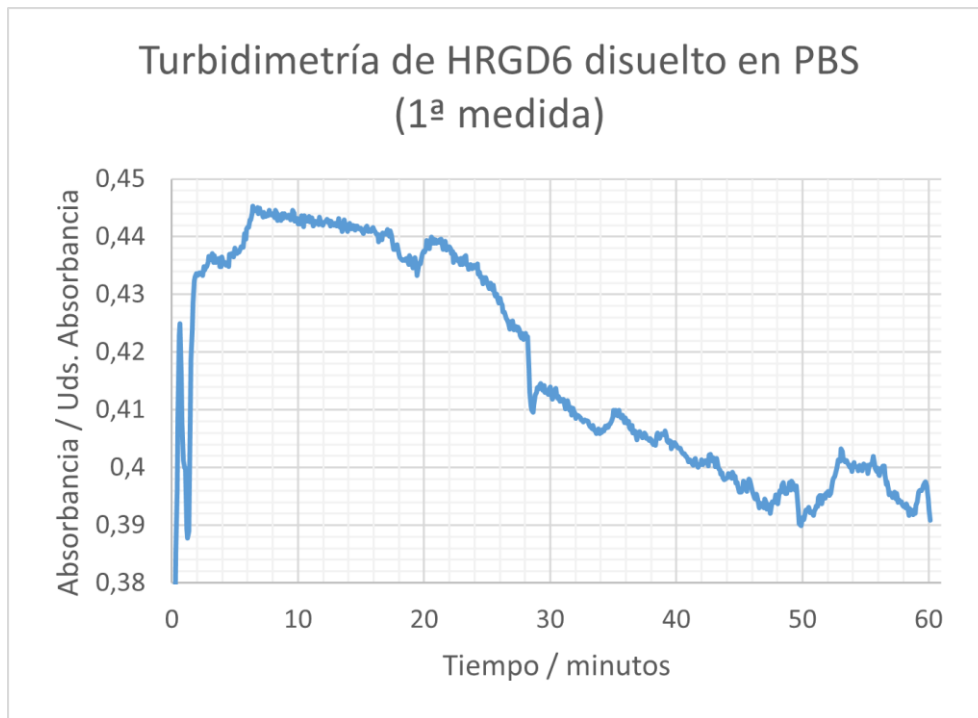


Ilustración 28: Medida 1 de Turbidimetría de la disolución de HRGD6 a 50mg/mL

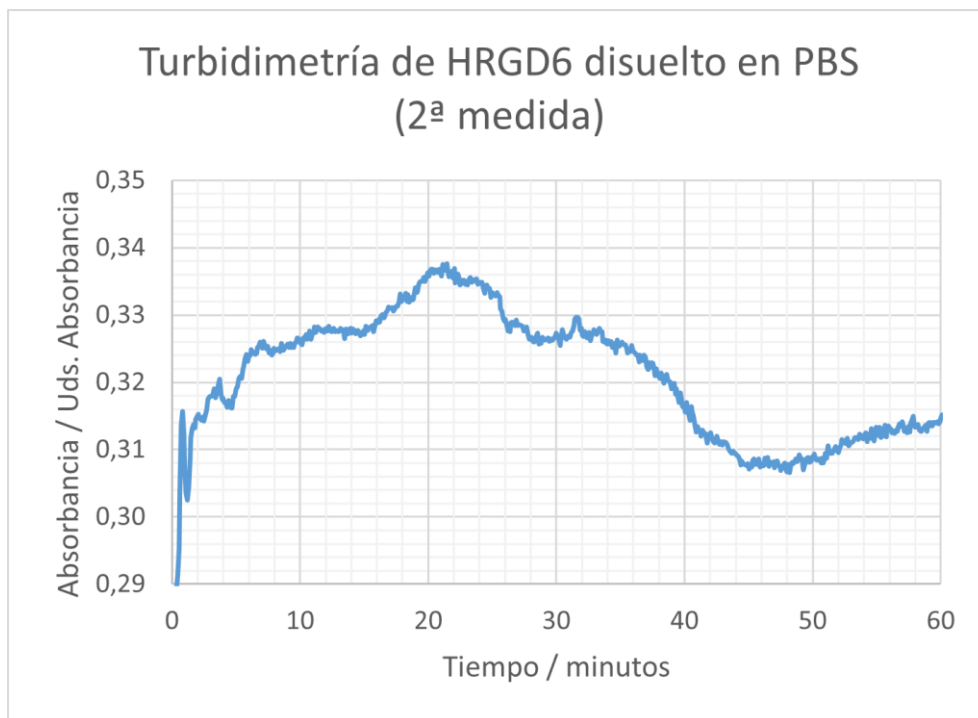
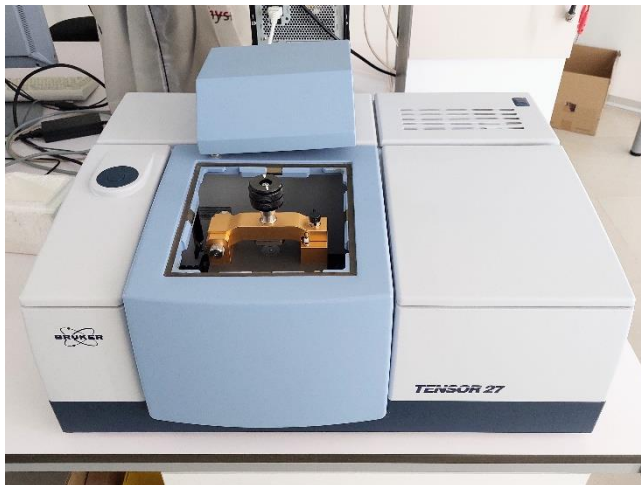


Ilustración 29: Medida 2 de Turbidimetría de la disolución de HRGD6 a 50mg/mL

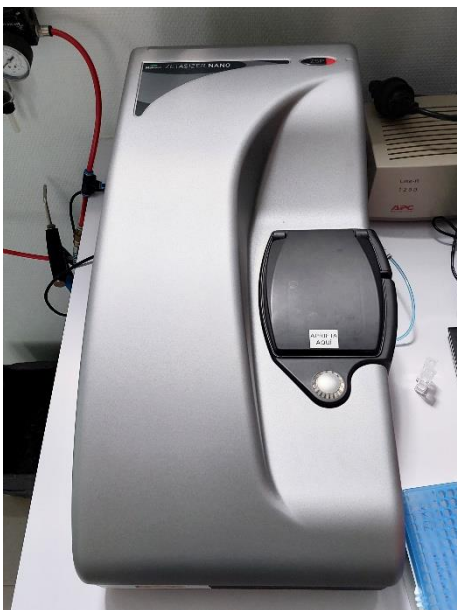
A6. Equipos empleados



Gel Doc EZ Imager, BIO-RAD



Equipo de Infrarrojo Tensor 27, Bruker



Zetasizer Nano ZSP, Malvern Instruments



Equipo de DSC Mettler Toledo 822e



Espectrofotómetro UV/Vis Cary Series, Agilent