



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Síntesis y caracterización de un polímero recombinante
para la generación de nanopartículas con aplicaciones
biomédicas**

Autora:

Ástrid Miguel Arias

Tutores:

Dr. F. Javier Arias

Dra. Alessandra Girotti

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todos los que habéis estado conmigo este tiempo, ha sido una aventura con altibajos, pero bonita.

Me gustaría agradecer a mis tutores Javier y Alessandra por haberme introducido en este nuevo campo y haberme ayudado a sacar adelante este trabajo.

A mis compis de laboratorio que me han dado la vida estos meses.

A mis papás y mi hermana por todo el amor que me han dado y por haber estado este tiempo aprendiendo conmigo, apoyándome y animándome cuando no entendía o no me salían las cosas.

A mis químicos (aunque estamos más dispersos siempre me habéis ayudado un montón) y un físico (Álvaro, cada vez te veo más cómodo rodeado de químicos) por haberme ayudado con las 90000 dudas que me han surgido continuamente (Ari, la paciencia que has tenido), y por el cariño con el que me han tratado siempre.

A Rodri, Javier Gutiérrez y Sergio, que sin ellos seguiría viendo negros los resultados.

Y a mi queridísimo Mario, mi mayor apoyo, y mi físico favorito. No nos unió la ciencia, pero acabamos unidos por ella.

*“Hoy el día se presenta ante mí esperando a que yo le dé forma y aquí estoy, soy el escultor.
Lo que suceda hoy depende de mí. Yo debo escoger el tipo de día que voy a tener.
Que tengas un buen día... a menos que tengas otros planes.”*

Mario Benedetti

ÍNDICE

1.RESUMEN.....	7
1.ABSTRACT.....	7
2.INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 BIOMATERIALES.....	8
2.2 BIOLOGÍA MOLECULAR Y TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE.....	9
2.3 ELASTINA.....	10
2.4 POLÍMEROS TIPO ELASTINA (ELPs).....	12
2.5 TRANSPORTE DE FÁRMACOS.....	14
3.OBJETIVO.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 MATERIALES.....	17
4.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS.....	17
4.1.2 SOLUCIONES DE TEÑIDO.....	18
4.1.2.1 Geles de poliacrilamida.....	18
4.1.3.2 Geles de agarosa.....	18
4.1.3. MATERIALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	19
4.1.3.1 Cepa bacteriana.....	19
4.1.3.2 Medios de cultivo.....	19
4.1.3.3 Enzimas de restricción.....	19
4.1.3.4 Vector de expresión.....	20
4.1.3.5 Plásmido empleado para la expresión de proteínas recombinantes.....	20
4.1.3.6 Purificación y extracción de pDNA.....	21
4.2 MÉTODOS.....	21
4.2.1 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	21
4.2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA BIOPRODUCCIÓN.....	22
4.2.3 BIOPRODUCCIÓN.....	24
4.2.4 RUPTURA Y LAVADO CELULAR.....	26
4.2.5 PURIFICACIÓN POLÍMEROS RECOMBINANTES.....	27
4.2.6 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA. (SDS-PAGE).....	27
4.2.7. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.....	29
4.2.8 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	30
4.2.9 DETERMINACIÓN CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL PLÁSMIDO.....	31
4.2.10 SECUENCIACIÓN DE DNA.....	32
4.2.11 DIGESTIÓN DE DNA MEDIANTE ENDONUCLEASAS.....	33
4.2.12 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA.....	33
4.2.12.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	33
4.2.12.2 Resonancia magnética nuclear de protón (¹ H-RMN).....	34
4.2.12.3 Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO pET10NKKK.....	37
5.2 BIOPRODUCCIÓN DEL POLÍMERO 3K(EI)2.....	40
5.3. PURIFICACIÓN DE 3K(EI)2.....	42
5.3.1 PRIMERA ETAPA PURIFICACIÓN: PRECIPITACIÓN POR CAMBIO DE pH.....	42
5.3.2 SEGUNDA ETAPA PURIFICACIÓN: PRECIPITACIÓN SALINA.....	45
5.4 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA.....	46
5.4.1 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR APARENTE POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	46

5.4.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF).....	47
5.4.3 RMN.....	48
5.4.4 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS).....	49
5.4.4.1 ESTABILIDAD PARTÍCULA 3K(EI) ₂	52
6. CONCLUSIONES	56
7.BIBLIOGRAFÍA.....	57
8.ANEXO.....	59
ANEXO 1. ABREVIATURAS.....	59
ANEXO 2. CÓDIGO DE REPRESENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	62
ANEXO 4. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS DEL POLÍMERO A DISTINTAS TEMPERATURAS.....	63
ANEXO 5. DISTRIBUCIÓN TAMAÑO POLÍMERO EN DIFERENTES MEDIOS.....	69

1.RESUMEN

Una de las proteínas más interesantes actualmente por sus propiedades y aplicaciones en el campo de la medicina es la elastina. La elastina es una proteína con una capacidad de autoensamblaje, resistencia y elasticidad muy altas. Esto ha dado lugar a su estudio en mayor profundidad llegando a sintetizar polímeros recombinantes tipo elastina (ELPs) mediante ingeniería genética. Este tipo de biopolímeros son muy útiles gracias a su biocompatibilidad permitiendo su uso transporte y dosificación de fármacos.

En este trabajo se ha sintetizado y caracterizado el polímero recombinante tipo elastina (ELP), 3K(EI)₂, el cual tiene la capacidad de formar nanopartículas debido a su naturaleza anfifílica. Se ha utilizado una cepa de *Escherichia coli* para su síntesis por su facilidad para cultivar sin requerir mucha energía, su facilidad para crecer y producir rápidamente y la fácil aceptación de modificaciones genéticas. Y posteriormente se ha realizado una caracterización y estudio de la formación de nanopartículas con diferentes técnicas de caracterización fisicoquímica: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión dinámica de la luz (DLS) y resonancia magnética nuclear (RMN).

1.ABSTRACT

Elastin is one of the most interesting proteins now a days due to its properties and applications in the medical field. Elastin is a protein with a very high resistance, elasticity, and capacity for self-assembly. This has led to further research, resulting in the synthesis of elastin-like recombinant polymers (ELPs) by means of genetic engineering. This type of biopolymers are greatly useful thanks to their biocompatibility allowing them to be used for drug transport and dosage.

In this work we have synthesized and characterized the recombinant elastin-like polymer (ELP), 3K(EI)₂, which has the ability to form nanoparticles due to its amphiphilic nature. An *Escherichia coli* strain has been used for its synthesis because of its ease of cultivation without requiring much energy, its facility to grow and produce rapidly and easy acceptance of genetic modifications. Subsequently, a characterization and study of nanoparticle formation has been carried out using different physicochemical characterization techniques: polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), mass spectrometry (MALDI-TOF), dynamic light scattering (DLS) and nuclear magnetic resonance (NMR).

2.INTRODUCCIÓN

2.1 BIOMATERIALES

Los biomateriales son un campo con algo más de medio siglo de desarrollo y que se definen como sustancias naturales o sintéticas, que no son fármacos, y son utilizados para asistir, mejorar o reemplazar una función fisiológica ⁽¹⁾¹. Estos materiales poseen la capacidad de sustituir total o parcialmente las funciones en un organismo, así pues, deben cumplir una serie de requisitos: que sean químicamente inertes y estables; que no sean tóxicos ni puedan causar rechazo inmunológico y que tengan buenas propiedades mecánicas ². La mayoría de estos materiales son utilizados clínicamente como parte de dispositivos en medicina y cirugía para tratar enfermedades y traumatismos². El éxito de los biomateriales se refleja en su importancia para las terapias médicas modernas, el potencial económico del mercado y el crecimiento constante del sector durante más de 50 años³. Cabe destacar que los últimos avances en biomateriales tienen como objetivo controlar las respuestas biológicas y, en última estancia, curar. Esta nueva generación de biomateriales se ha centrado en la modificación de la superficie de materiales para superar la adsorción de proteínas no específicas *in vivo*³ y el desarrollo de materiales sintéticos con propiedades controladas como portadores de fármacos y células.³ Una característica importante de los biomateriales es la capacidad de adaptarse a condiciones ambientales concretas de forma autosuficiente³.

Además de las ventajas que supone el uso de estos materiales en tratamientos médicos como corazones artificiales, tubos de diálisis, como embalajes de productos alimenticios, reducción de la propensión a las infecciones mediante estrategias de liberación controlada de fármacos,³etc, también pueden presentar una importante desventaja, su degradación puede liberar sustancias nocivas en el organismo. ²Estas nuevas tecnologías en un futuro mejorarán las expectativas de vida del ser humano

Entre estos materiales se encuentran los polímeros. Un polímero es una sustancia química formada por la repetición de unidades más simples denominadas monómeros. Por ello se centró el estudio en polímeros naturales como el DNA, RNA, proteínas, o polisacáridos.

2.2 BIOLOGÍA MOLECULAR Y TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE

La Biología Molecular se trata de una rama de la Biología que se ocupa principalmente de la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética, que, en definitiva, determinan la estructura y función celulares de las principales moléculas que la forman: glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El dogma central de la Biología Molecular⁴ (*Figura 1*) se basa en el modo en el que fluye la información genética. De acuerdo con este concepto, el ARN se sintetiza a partir de moldes de ADN mediante un proceso denominado transcripción, mientras que las proteínas se sintetizan a partir de moldes de ARN con un proceso denominado traducción.

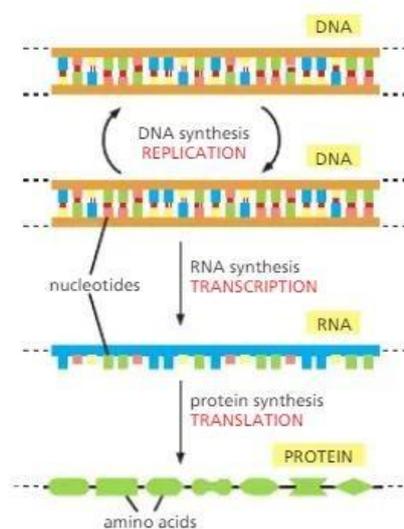


Figura 1. Representación del dogma de la Biología Molecular²³

El progreso de la biología molecular fue impulsado con el desarrollo de la tecnología de DNA recombinante, que permitió aislar, secuenciar y manipular genes individuales derivados de cualquier tipo celular, el conjunto de técnicas que permiten la manipulación del DNA se conoce como Ingeniería Genética. La estrategia básica es la clonación del DNA donde se inserta un fragmento del DNA de interés en un vector de expresión que permite la obtención de réplicas idénticas dentro de una célula huésped. La célula huésped se encarga de amplificar el gen de interés mediante la fabricación de copias de ese gen. Existen distintos tipos de células huésped dependiendo de las características y necesidades del proceso.

En este trabajo el gen de interés codifica para el polímero recombinante de tipo elastina y se introduce dentro de una bacteria de *Escherichia coli* (*E. coli*) donde se va a replicar generando una población de bacterias portadoras de plásmidos que contienen el inserto del polímero (Figura 2)

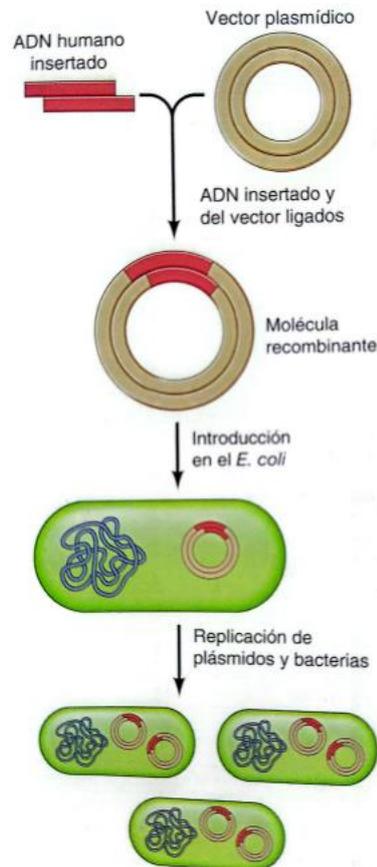


Figura 2. Esquema generación DNA recombinante⁴

2.3 ELASTINA

La elastina es una proteína fibrosa polimérica auto ensamblable y muy insoluble. Se encuentra en la matriz extracelular del tejido conectivo de los vertebrados y tiene un papel estructural muy importante aportando elasticidad a los tejidos, además participa en la reparación de tejidos y regulando el comportamiento celular^{5,6}. Forma parte de la piel, los vasos sanguíneos, el cartílago y los pulmones. Se localiza en el grupo de las holoproteínas debido a que está formado exclusivamente por una secuencia de aminoácidos.

Las redes de fibras elásticas están formadas por la interacción de varias moléculas de un precursor monomérico soluble llamado tropoeslastina ⁷. Este precursor está compuesto por un bloque hidrofóbico e hidrofílico permitiendo que, a diferencia de la elastina, sea soluble en medio acuoso.

Su estructura primaria está formada por secuencias repetidas de dominios de entrecruzamiento hidrófilos en hélice- α conformados en su mayor parte por alanina y lisina que se encargan de estabilizar el polímero; y de dominios elásticos hidrófobos en forma de espiral- β conformados en su mayor parte por glicina, prolina y aminoácidos hidrófobos como valina que se encargan de conferir el particular comportamiento elástico de la elastina (Figura 3) ^{2,8}.

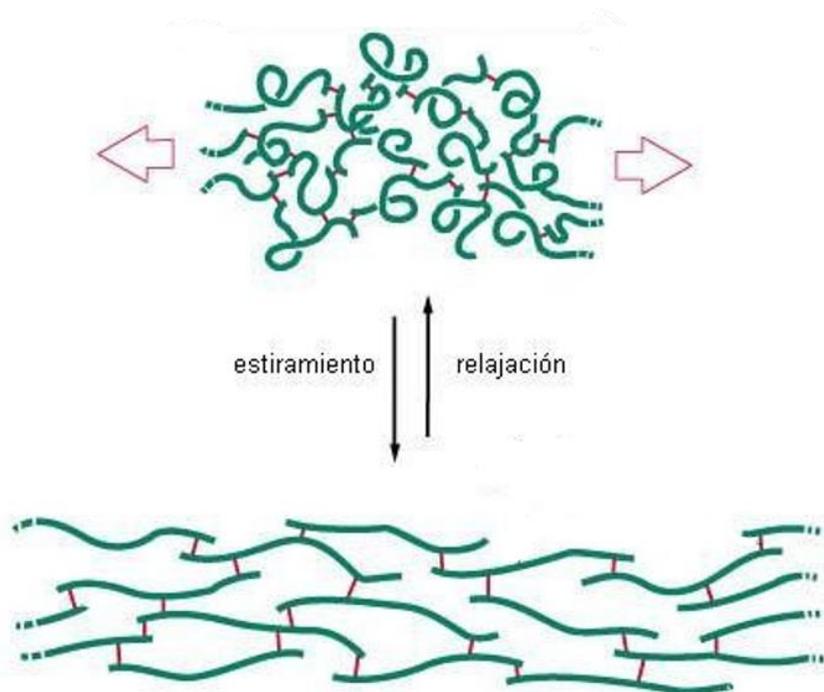


Figura 3. Representación esquemática del comportamiento elástico de la elastina².

Su estructura primaria contiene aminoácidos insolubles provocando así un autoensamblaje formando agregados que evitan la interacción con el agua. En esta proteína hay una secuencia de aminoácidos que se repite en concreto que es el pentapéptido VPGVG (Valina-Prolina-Glicina-Valina-Glicina)².

Una de las características más llamativas de la elastina cuando se encuentra en disolución acuosa es la capacidad de sufrir una transición de desorden→orden cuando la temperatura de la disolución aumenta. Siendo una conducta poco usual en otros sistemas y por ello se le denomina a esta transición, *Transición Inversa con la Temperatura* (ITT) y la temperatura específica a la que sucede, *Temperatura de Transición* (T_t)² Esta transición de fase permite a la elastina tener un cambio de estructura reversible pasando por una estructura extendida y desordenada a otra plegada y ordenada⁷. Cuando la elastina se encuentra a bajas temperaturas en medio acuoso, las moléculas de agua se colocan recubriendo los restos apolares impidiendo su interacción hidrófoba provocando que la cadena se encuentre extendida^{2,9}. Sin embargo, al aumentar la temperatura las moléculas de agua presentan mayor agitación, dejan de interactuar con los restos apolares y permiten que la cadena adquiera un estado ordenado de espiral- β ^{2,9}.

2.4 POLÍMEROS TIPO ELASTINA (ELPs)

Los polímeros tipo elastina (ELP, "Elastin Like Polymers") son polipéptidos artificiales con secuencias de aminoácidos repetidas presentes en la elastina natural.

La secuencia de aminoácidos más común es (VPGXG) donde X se trata de cualquier aminoácido excepto prolina ya que neutraliza una de las propiedades de mayor interés de los ELPs, la capacidad de transición de fase, ya que interfiere en el ordenamiento de las cadenas desestabilizando la conformación de espiral- β . Este aminoácido (X) determina la hidrofobicidad del bloque y su comportamiento con la temperatura.²

La capacidad de la elastina en un medio acuoso para contraerse y estirarse se va a ver reflejada en este tipo de polímeros. Presentan la transición de fase reversible que depende de la transición inversa con la temperatura ITT, "Inverse Temperature Transition", de este modo las cadenas se encontrarán desplegadas por debajo de una temperatura específica y ensambladas adquiriendo un mayor tamaño por encima de esa temperatura. Propiedad que conservan incluso al fusionar el ELP con otra proteína, permitiendo que tenga una amplia variedad de aplicaciones biomédicas.^{6,9}

Esta transición depende de ciertos factores tales como la composición de aminoácidos del ELP, la concentración, la adición de cosolventes, del pH y de la temperatura principalmente. Una variación de estos parámetros puede provocar un aumento o disminución de la temperatura de transición.

Para poder entenderlo es necesario conocer por tanto el concepto de temperatura de transición T_t . La temperatura de transición es el valor máximo de la temperatura a la que se produce la agregación del ELP.⁶ Al superar dicha temperatura, el polímero se vuelve insoluble y precipita adquiriendo una conformación de espiral β donde las cadenas laterales muestran una estructura ordenada. Estabilizada por interacciones hidrofóbicas y enlaces intramoleculares. (Figura 4). Sin embargo, al disminuir la temperatura de transición el polímero se encuentra disuelto adoptando una conformación desplegada donde las cadenas laterales se encuentran desordenadas y completamente hidratadas.

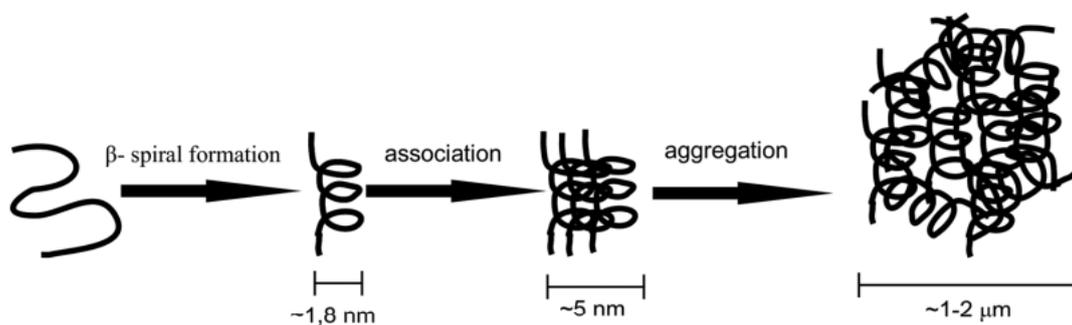


Figura 4. Agregación de los ELPs⁶.

La producción de ELPs obtenidos mediante técnicas de ingeniería genética ha permitido generar un gran número de ELPs específicos con una elevada complejidad a nivel molecular, precisión y reproducibilidad suplantando otros métodos sintéticos.

Este tipo de polímeros intentan aludir a su parecido con la elastina, por su forma de obtención mediante una síntesis recombinante y su carácter polimérico. Los ELPs mantienen las propiedades propias de la elastina siendo las más interesantes su naturaleza termosensible y su comportamiento auto ensamblable.

Para la síntesis del ELP utilizado en este trabajo se diseñó un polímero denominado $3K(EI)_2$, posee tres lisinas (K) en el extremo amino terminal y el dibloque (EI) tiene una estructura anfifílica. El dibloque se divide en dos bloques con diferente composición. Un bloque hidrofílico, polar compuesto por ácido glutámico, E, con una secuencia $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{10}$ y una temperatura de transición en condiciones fisiológicas superior a 70°C ². Un bloque hidrofóbico, que incluye el aminoácido isoleucina, I, con una secuencia $(VPGIG)_{60}$ y una temperatura de transición que oscila entre los $16-20^\circ\text{C}$.^{2,10} Esta diferencia de dominios con

diferentes Tt permite que a temperatura fisiológica uno de los bloques se encuentre soluble en medio acuoso mientras el otro permanezca insoluble.

El resultado de esta combinación es la formación de micelas del tamaño de nanopartículas⁹. Estas nanopartículas se orientan mostrando la parte hidrófoba hacia el interior y la parte hidrofílica queda expuesta hacia el exterior hidratándose (Figura 5)¹¹.

Los ELP poseen un gran potencial en el campo biomédico para el desarrollo de nanovacunas que induzcan una mejor respuesta inmunológica¹²

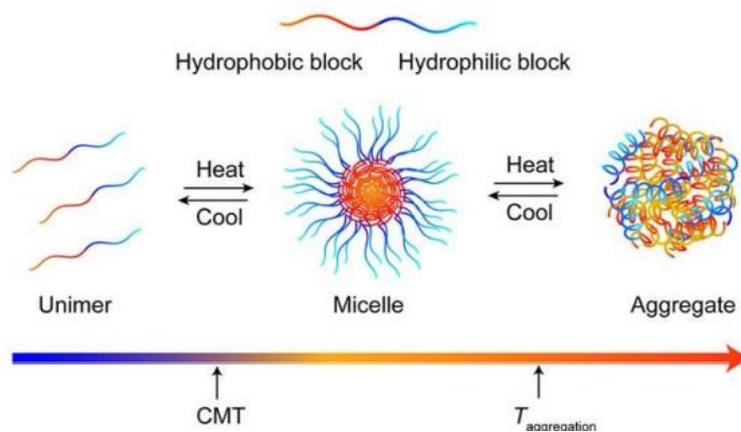


Figura 5. Esquema de la formación de nanopartículas. A temperaturas superiores a la temperatura crítica micelar, CMT se forman las micelas por asociación del bloque hidrofóbico. Al superar la temperatura de agregación las micelas se compactan formando agregados a escalas micro²⁴.

2.5 TRANSPORTE DE FÁRMACOS

El transporte de fármacos es uno de los principales problemas de la medicina actualmente, ya que en muchos casos solo llega una pequeña porción del fármaco a su destino, mientras que el resto tiene un efecto negativo sobre las células sanas. Esto hace que sea necesario el desarrollo de portadores selectivos menos tóxicos y más selectivos, los ELPs¹³.

Una de las propiedades intrínsecas de este tipo de polímeros es la formación de nanopartículas. Estas nanopartículas se han utilizado como sistema de transporte, encapsulación y dosificación de fármacos. En un estudio *in vitro* se utilizaron para la dirección térmica de un fármaco a tumores calentados a 42°C¹⁴. En el último caso, se creó un gradiente de difusión del fármaco a través de la vasculatura del tumor¹⁴

La encapsulación del fármaco evita el contacto con el exterior aumentando así su estabilidad fisicoquímica, aumentando también su vida útil en circulación y mejorando su rendimiento. Además, la degradación de los ELPs no genera residuos tóxicos ni se acumulan en el organismo¹³. La encapsulación se produce debido a la formación de dos dibloques, uno de mayor hidrofobicidad que otro, unidos de forma covalente, cuando se encuentran por debajo de la temperatura crítica micelar, CMT, estos dibloques son solubles, mientras que al estar por encima el dibloque es lo suficientemente anfifílico que permite autoensamblarse formando micelas esféricas¹³. En el interior se encuentra el núcleo micelar, el cual es capaz de solubilizar y albergar fármacos, mientras que los bloques hidrófobos están en contacto directo con el exterior, generalmente acuosos¹³.

La administración dirigida de fármacos consiste en la inclusión de moléculas biológicas como DNA, RNA, péptidos o fragmentos de anticuerpos en la superficie de la nanopartícula para ser internalizadas selectivamente en ciertos tipos de células que tienen receptores específicos de esas moléculas¹⁵.

Además, los materiales que llevan lisina en su estructura conforman un prometedor medio de transporte de fármacos. Las lisinas constituyen un grupo muy versátil al tener un grupo amino que puede protonarse dotando a la molécula una densidad de carga positiva. Esto permite que interactúe electrostáticamente con las células y se internalice fácilmente¹⁶. Aunque las lisinas son intrínsecamente sensibles al pH, la conjugación con diferentes grupos funcionales le confiere rasgos inteligentes y sensibles a los estímulos, añadiendo características de respuesta al pH, la temperatura, las enzimas, mejorando así la administración de agentes terapéuticos. Así pues, este tipo de polímeros que integran lisina en el extremo N-terminal se ha utilizado para transporte de fármacos de moléculas pequeñas, genes y proteínas.¹⁶

3.OBJETIVO

Cómo se ha explicado en los apartados anteriores, los polímeros tipo elastina poseen unas propiedades muy útiles en biomedicina para la dosificación de fármacos gracias a la encapsulación en el interior de las micelas que se forman en disolución acuosa. Con el fin de estudiarlas se realizó una bioproducción y caracterización del polímero denominado 3K(EI)₂. Se trata de un polímero recombinante, biocompatible y biodegradable capaz de degradarse dentro del organismo introducido y así no acumularse en el interior.

Los objetivos específicos en este trabajo han sido:

- Bioproducción del polímero tipo elastina 3K(EI)₂ y purificación mediante ciclos de transición inversa (ITC).
- Caracterización físico-química del recombinámero y de capacidad de autoensamblado empleando distintas técnicas de análisis: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF), resonancia magnético nuclear (RMN) y dispersión dinámica de la luz (DLS).
- Estudio de la estabilidad del polímero en distintos medios en condiciones fisiológicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS

A continuación, se muestra un listado de los reactivos químicos utilizados ordenados alfabéticamente. Estos reactivos tendrán un papel importante que será explicado a lo largo del trabajo.

Tabla 1. Reactivos químicos utilizados.

Reactivo	Casa comercial
Agarosa	Sigma Aldrich
Albúmina sérica bovina (BSA)	Apollo Scientific
Ácido clorhídrico	Thermo Fisher
Acrilamida/Bis-acrilamida	VWR Life Science
Agarosa (Seakem® LE)	Cambrex
Azul de bromofenol 2%	Alpha Aesar
Ácido etilendiamnotetraacético (EDTA)	Sigma Aldrich
Benzamidina	Acros Organics
β -Mercaptoetanol (β -Me)	Gibco
Cloruro de cobre II (CuCl_2)	Thermo Fisher
Cloruro de sodio (NaCl)	Formedium
DNA Marker:NZYDNA Ladder III	NZYTech
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Formedium
Fluoruro de fenilsulfonilmetano (PMSF)	Sigma Aldrich
GELPed Nucleic Acid Stain	Biotium
Glicerol	Thermo Fisher
Glicina	Sigma Aldrich
Glucosa	Sigma Aldrich
Isopropanol	Merck
Kanamicina	Formedium
NZY-Blue Protein Marker	NZYTech
Persulfato amónico (PSA)	Merck
Pierce Protease inhibitor	Pierce
Tetrametiletildiamina (TEMED)	Thermo Fisher
Tris (Hidroximetil)aminometano (Tris base)	Sigma Aldrich

Una solución tamponada o *buffer* tiene como función mantener el pH dentro de un valor conocido y constante en todo momento evitando cualquier variación. Las soluciones tamponadas utilizadas aparecen en la tabla siguiente:

Tabla 2. Tampones utilizados.

Tampón	Composición
SDS-PAGE Tampón de carga 5x	10% (p/v) SDS; 5% (v/v) β-mercaptoetanol; 0.2% (v/v) azul de bromofenol (BPB); 50% (v/v) glicerol; 0,3 M Tris; pH 6,8
SDS-PAGE Running Buffer 1x	Tris-base 0.025 M; glicina 0,192M; SDS 0.1% (p/v); pH 8,3
Tampón de carga de DNA 5x	50 mM Tris-HCl; 0,05 mM EDTA; 0,05 % (p/v) azul de bromofenol; 30% (p/v) glicerol; pH 8
Tampón fosfato sódico (PBS)	10 mM NaH ₂ PO ₄ ; 140 mM NaCl; pH 7
Tampón de lavado celular	20 mM Tris-base; 140mM NaCl; pH 8
Tampón de sonicación o lisis celular	10mM Tris-base; 1mM EDTA; pH 8
Tampón TAE	40mM Tris-base; 19mM ácido acético; 1mM EDTA; pH 8
Tampón Tango 10x	33mM Tris-acetato; 10 mM acetato de magnesio; 66 mM acetato de potasio; 0,1mg/mL albúmina sérica bovina (BSA); pH 7,9

4.1.2 SOLUCIONES DE TEÑIDO

Tras realizar una electroforesis, los geles se tiñen en disoluciones para poder detectar las proteínas o ácidos nucleicos separados. Dependiendo del tipo de gel se utilizará una tinción distinta.

55

Cloruro de cobre II (CuCl₂): se prepara una disolución 0,2M de CuCl₂ en agua destilada.

4.1.2.2 Geles de agarosa

GELPed Nucleic Acid Stain: se prepara una disolución de 1:10000 (v/v) en tampón TAE.

4.1.3. MATERIALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1.3.1 Cepa bacteriana

Se utilizó la siguiente cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*): **BLR (DE3) competent Cells (Novagen)**:

Eficiencia $>2 \times 10^6$ cfu/ μ g

4.1.3.2 Medios de cultivo

LB (Lysogeny Broth) (Formedium™): compuesto por 10 g/L de bacto triptona, 10 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura en agua destilada; pH 7. medio líquido Utilizado para el cultivo y crecimiento bacteriano.

LB-agar: constituido por medio LB con un 1,5% (p/v) de bacto agar; pH 7. Medio sólido para el crecimiento bacteriano.

TB (Terrific Broth) (Formedium™): formado por 20 g/L de bacto triptona, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL/L de glicerol, 0,017 M de KH_2PO_4 y 0,072 M de K_2HPO_4 ; pH 7

S.O.C. Medium Fisher (Bioreagents™): su composición lleva un 2% (p/v) de bacto triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 10mM de NaCl, 2,5mM de MgCl_2 , 10 mM de MgSO_2 y 20 mM de Glucosa; pH 7. Medio líquido utilizado en la transformación bacteriana.

4.1.3.3 Enzimas de restricción

Se emplearon enzimas de restricción para la caracterización del plásmido mediante una digestión analítica del ADN. Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN en lugares concretos y específicos de su secuencia. Las enzimas empleadas son *DpnI* y *XhoI* con las especificaciones suministradas por Thermo Scientific™¹⁷.

Tabla 3. Enzimas de restricción y secuencias de reconocimiento.

Enzima de restricción	Secuencia de reconocimiento
<i>DpnI</i>	
<i>XhoI</i>	

tetrabloque formado por la repetición del dibloque (EI) y contiene tres lisinas en el extremo amino terminal (*Figura 7*), a su vez está formado por los bloques proteicos citados, E e I.



Figura 7. Esquema del inserto introducido en el plásmido.

E se corresponde con el dominio hidrofílico de la elastina (compuesto por el aminoácido ácido glutámico) con una temperatura de transición superior a 70°C. I se corresponde con el dominio hidrofóbico de la elastina (compuesto por el aminoácido isoleucina) con una temperatura de transición de aproximadamente 17°C. La diferencia entre ambas temperaturas de transición permite solubilizar en agua a temperaturas fisiológicas (37°C) el bloque hidrofóbico mientras el bloque hidrofílico permanece insoluble.

Cada uno de los dos bloques están formados por una repetición de una secuencia pentapéptida de la siguiente forma (VPGXG) (*Figura 8*) donde X representa los aminoácidos isoleucina y ácido glutámico (para este polímero).



Figura 8. Esquema de la secuencia de aminoácidos representados según el código internacional de una letra anexo 2

4.1.3.6 Purificación y extracción de pDNA

La extracción y purificación del plásmido se realizó mediante kits para el tratamiento de DNA. En este trabajo se extrajo el plásmido para poder sucesivamente comprobar mediante secuenciación y electroforesis, la secuencia y el tamaño del gen. El Kit empleado para obtener el plásmido a partir de un cultivo bacteriano de 60 mL:

Quantum Prep Plasmid MidiPrep Kit (BioRad) Procedimiento explicado en *el apartado 4.2.8.*

4.2 MÉTODOS

4.2.1 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

El proceso de transformación es el paso de introducción del plásmido (*apartado 4.1.4*) al interior de una célula, en este caso una bacteria, para su posterior expresión y modificación del plásmido dependiendo de la finalidad y siguiendo el protocolo de uso. Para este trabajo se utilizaron células competentes de una cepa de expresión de *Escherichia coli*: BLR. (*apartado 4.1.3*).

Inicialmente las cepas bacterianas se encuentran almacenadas a -80°C y es necesario descongelarlas previamente. Se toman $20\ \mu\text{L}$ de bacterias, de DNA plasmídico y se incuban en agua-hielo a 4°C durante la coprecipitación de células y DNA. Tras la incubación se realiza un choque térmico a 42°C para facilitar la introducción del plásmido en las bacterias y se procede a incubar otra vez a 4°C durante 2 minutos. Luego se añade un volumen de $80\ \mu\text{L}$ de S.O.C. (*apartado 4.1.4*) y se incuban a 37°C a 250 rpm durante 1 hora. Pasada la hora, sobre una placa de cultivo LB-Agar que contenga glucosa, y el antibiótico para el que tiene resistencia el plásmido (Kanamicina), se siembra la mezcla de transformación, se envuelve la placa en papel de aluminio y se coloca bocabajo en la incubadora a 37°C durante 16-24 horas hasta la observación de colonias aisladas. La glucosa se añade como fuente de energía y para inhibir al operón Lac, que es el conjunto de genes estructurales y promotor que regula la expresión de estos genes. Al inhibir al operón, el gen del polímero no se expresa y únicamente se produce un crecimiento bacteriano.

4.2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA BIOPRODUCCIÓN

Para poder comenzar la bioproducción es necesario realizar un cultivo previo de las colonias transformadas (*apartado 4.2.1*). Una vez se han obtenido colonias aisladas se procede a realizar un análisis cualitativo de las colonias para seleccionar la colonia más productora o la que más expresa el polímero recombinante.

Para ello hay que realizar un primer *screening* seleccionando 8 colonias que se encuentren aisladas en la placa Petri y que tengan un tamaño uniforme.

Primero en un tubo de 50 mL, se le añaden 45 mL de medio TB (5 mL por cada colonia a picar y un control negativo de esterilidad que sirve para verificar si hay algún otro tipo de crecimiento bacteriano y comprobar que materiales y reactivos están estériles), y $45\ \mu\text{L}$ del antibiótico Kanamicina (el antibiótico se añade en una dilución 1:1000). Todo esto se reparte en 9 tubos tipo Falcon de 50 mL vertiendo 5 mL en cada uno.

Después se procede a picar las colonias en la campana de flujo laminar. Para ello se coge un asa de siembra previamente esterilizada al rojo vivo y enfriada antes de picar. Se toca la colonia seleccionada, se lleva al interior de uno de los tubos que contienen el medio líquido y se cierra dejando el tapón flojo sujeto con cinta de carroceros para permitir la oxigenación durante la incubación, se esteriliza el asa y se repite el proceso en cada uno de los 8 tubos. El

último, el control de esterilidad, se deja sin picar, únicamente contiene medio líquido con antibiótico.

Por último, se introducen los 9 tubos en la incubadora con agitación 250 rpm a 37°C durante 16 horas.

Una vez pasadas las horas suficientes, se para la incubación y se trasfiere 1 mL de cada uno de los tubos en un tubo de 1.5 mL eppendorf. Estas muestras deben prepararse antes de comenzar su análisis por electroforesis SDS-PAGE. La preparación consiste en la eliminación del medio de cultivo de las células mediante centrifugaciones y lavados con agua desionizada. Antes de cargar las muestras en el gel de poliacrilamida se resuspenden en agua desionizada, se añade 1/5 de tampón de carga 5x y se hierven 5 minutos. Este buffer está formado por unos componentes (*apartado 4.1.2*) esenciales para poder caracterizar por electroforesis. Contiene SDS, detergente aniónico encargado de desnaturalizar las proteínas y confiriéndolas carga negativa; β -mercaptoetanol, agente reductor cuya función es reducir los puentes disulfuro separando las subunidades de la proteína dando lugar a proteínas lineales, facilitando que se extienda el efecto de SDS y permitiendo que se muevan a través de los poros en función de su masa molecular; Glicerol, reactivo para aumentar la densidad de la muestra antes de cargar en los pocillos; Azul de bromofenol, colorante cuyo fin es trazar el frente de la electroforesis y determinar cuando finaliza.

Una vez se ha determinado la colonia más productora comparando la cantidad de proteína del polímero respecto a la cantidad de proteínas endógenas de la bacteria se realiza un segundo análisis para obtener 'las hijas' de la colonia más productora, es decir, se obtienen colonias de un subcultivo realizado a partir de la colonia seleccionada en el primer análisis. y se volverá a seleccionar la colonia más productora. El procedimiento es el mismo que para el primer análisis. De este segundo análisis se selecciona la colonia más productora con la misma técnica y comienza el proceso de producción.

4.2.3 BIOPRODUCCIÓN

A partir de la colonia seleccionada (*apartado 4.2.2*) se comienza la producción de los polímeros (*Tabla 4*).

Tabla 4. Esquema de la bioproducción.

	Preinóculo	Inóculo	Producción
Contenedor:	<u>1 FALCON 50mL</u>	<u>2 ERLLENMEYER 250 mL</u>	<u>15 FLASKS 2L</u>
Células:	-picar colonia más productora	-100 µL preinóculo	-14 mL inóculo
Medio:	-5 mL LB con Kanamicina	-30 mL LB con Kanamicina	-7,5L TB-LB AIM con Kanamicina
Suplemento:	-250 µL glucosa	-1,5 mL glucosa	
Tiempo:	-incubar durante 16h	-Incubar 4h	-Incubar durante 16h

Todo el proceso de preparación se realiza en la cabina de flujo laminar con un medio estéril. El proceso inicia con la preparación del preinóculo a mediodía. Para ello se cultiva la colonia más productora en 5 mL de medio LB con antibiótico (Kanamicina) y 250 µL glucosa al 20 % (m/v). Todo ello en un tubo de 50 mL y en otro tubo se prepara un control negativo (*apartado 4.4.2*) para controlar la esterilidad del proceso. Una vez preparado se introduce en la incubadora dinámica durante 16 horas a 37°C y 250 rpm. Se añade glucosa para reprimir el operón de la lactosa. El operón es un grupo de genes estructurales y promotores cuyo fin es controlar la expresión de estos genes. Al añadir glucosa, la bacteria prefiere la glucosa a la lactosa como fuente de energía, y por tanto no se activa el operón Lac ya que el iniciador del operón es la lactosa, así que no comienza la expresión génica, sino que únicamente se produce el crecimiento bacteriano, ya que la glucosa está actuando como represor de la traducción durante el crecimiento de la biomasa.

A primera hora de la mañana se prepara el inóculo. Se toman 60 mL de medio LB, 60 µL antibiótico (Kanamicina) y 3 mL glucosa al 20 % (m/v). Se reparte a partes iguales en dos erlenmeyers de 250 mL. Uno de ellos será el control negativo y en el otro se le añaden 100 µL del preinóculo. Se dejan los dos erlenmeyers toda la mañana en la incubadora dinámica a 37°C y 250 rpm. En este paso se quiere aumentar el crecimiento bacteriano en un medio mayor

que el anterior y conseguir mayor producción. A mediodía-tarde se toman dos alícuotas de 1 mL en dos viales eppendorfs distintos para poder hacer un seguimiento más adelante de la electroforesis y medir la absorbancia. Tras esto, se realiza la inoculación en 15 Flasks de 2 L. En cada flask se añaden 500 mL de medio TB-LB AIM, 0,5 mL de antibiótico (Kanamicina) y 1mL del inóculo preparado por la mañana. Se dejan incubando durante 16 horas en la incubadora dinámica todos los flasks a 37°C y 250 rpm. No se ha añadido glucosa porque se han dejado crecer las bacterias en los pasos anteriores y ahora interesa que las bacterias comiencen a expresar la proteína.

Al día siguiente a las 8 de la mañana se toman 2 muestras de 1 mL cada una para medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm y así saber si se puede parar la producción y comenzar los lavados o no y para analizar por electroforesis más adelante. Antes de medir la muestra se diluye 1:20 (v/v) en agua desionizada. La absorbancia va a indicar si el crecimiento de las bacterias se encuentra en fase exponencial o en la estacionaria (*Figura 9*). Para ello es necesario tomar medidas cada media hora y observar si la absorbancia varía o se mantiene constante.

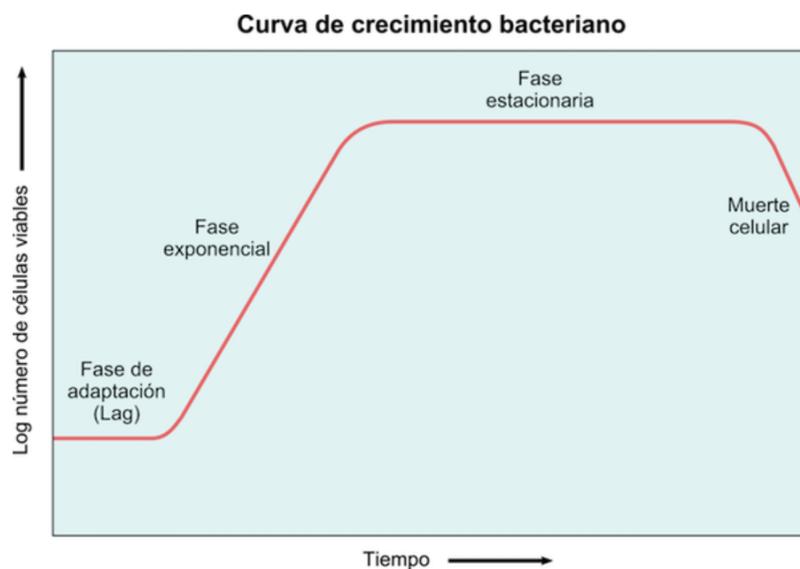


Figura 9. Representación de la curva de crecimiento bacteriano²⁵

4.2.4 RUPTURA Y LAVADO CELULAR

Después de que las bacterias hayan llegado a la fase estacionaria, se para la producción y comienza la recolección de las bacterias en el mínimo número de flasks mientras se van enfriando en hielo para evitar que las bacterias sigan creciendo. Se transfiere el contenido de los flasks en botes de centrífuga de 1 L y se centrifuga 15 minutos a 4°C y 1700 xg en el rotor basculante de 1 L (TX1000). Esto permite separar dos fases: una fase sólida denominada pellet celular (donde se encuentran las bacterias) y una fase líquida denominada sobrenadante (donde se encuentra el medio de cultivo). Se separan las dos fases por centrifugación y con una simple decantación se deshecha el sobrenadante y se resuspende el pellet con el tampón de lavado (*apartado 4.1.2*). Se vuelve a centrifugar y separar hasta que el sobrenadante tenga un aspecto incoloro y se elimine el medio de crecimiento. Todas las centrifugaciones se ejecutan a 4°C para evitar que las proteasas degraden el polímero.

Al finalizar el lavado celular se procede a la ruptura de las bacterias. Para ello primero se resuspende el pellet en un tampón de sonicación (*apartado 4.1.2*) en un volumen que dependerá del volumen de cultivo usado y la absorbancia obtenida de la última muestra medida antes de parar la producción según la siguiente relación:

$$V_{\text{Tampón de sonicación}} = 5 \times V_{\text{Cultivo (en mL)}} \times \text{ABS}_{\text{última muestra}}$$

Además, se añaden también 2mL de PMSF (1mM) por cada litro de tampón de sonicación y 1 eppendorf de Benzamidina (1mM) (*apartado 4.1.1*). Estos inhibidores evitarán la degradación del polímero por parte de proteasas celulares. Las bacterias se llevan al sonicador (equipo Hielscher UP400St) donde se produce la lisis celular durante 12 minutos al 100% de amplitud y ciclos de 20 segundos ON + 20 segundos OF con pausas para refrigerar (20 segundos funcionando, 20 segundos sin funcionar) en los que se somete a las bacterias a presiones altas entre 1500-1800 bar. Todo esto a una temperatura de 4°C. Esto provoca la ruptura de la pared celular y la membrana plasmática liberando al exterior el contenido intracelular.

Tras la ruptura se realiza una centrifugación con el rotor F14 durante 45 minutos a 15000xg y 4°C para separar el sobrenadante (donde se debería encontrar el polímero) y el precipitado o *debris* (donde se encontrarán los restos celulares). Se toma una muestra de cada una de las fases para su posterior análisis en electroforesis antes de comenzar con la purificación del polímero.

4.2.5 PURIFICACIÓN POLÍMEROS RECOMBINANTES

Una vez comprobado por electroforesis SDS-PAGE que el polímero se encuentra en la fase líquida, comienza su purificación. El método utilizado son los ciclos de transición inversa (ITC) que tienen en cuenta la transición inversa con la temperatura que manifiestan este tipo de polímeros. Este método sigue un protocolo de purificación a partir de precipitaciones ácidas y salinas variando la temperatura

Comienza con una precipitación ácida del sobrenadante obtenido tras la sonicación (*apartado 4.2.4*) obtenida añadiendo gota a gota HCl a 4°C y con agitación hasta llevarlo a pH 4 (*apartado 4.1.1*). Esto provocará una precipitación de las proteínas ácidas y DNA que se eliminarán con una posterior centrifugación durante 45 minutos a 4°C y 16000xg. El sobrenadante obtenido se somete a una transición de fase incubándolo durante 2 horas a 42°C en un baño de agua permitiendo que precipite el polímero al superar la temperatura de transición del bloque hidrofílico (*apartado 4.1.3*). En el sobrenadante, las proteínas solubles contaminantes se separarán fácilmente del polímero ya que no tienen la capacidad de transición que posee la elastina ni sus derivados poliméricos y a esa temperatura quedarán solubilizadas en el líquido mientras que el polímero precipita.

El precipitado obtenido se separa centrifugando durante 15 minutos a 10000xg a 25°C. Se solubiliza el precipitado en tris-base 20 mM (pH 8,8) (*apartado 4.1.1*) a 4°C en agitación durante 12 horas. Se repite la operación de precipitación caliente añadiendo NaCl 1M (*apartado 4.1.1*) y resuspensión en agua desionizada fría, hasta eliminar por completo las proteínas endógenas y demás contaminantes. La adición de la sal tiene un efecto sobre la temperatura de transición facilitando así la precipitación del polímero al calentarlo por encima de la T_t . Tras obtener el polímero purificado se somete a diálisis a 4°C para eliminar las sales y después se liofiliza consiguiendo el polímero puro y deshidratado listo para las caracterizaciones fisicoquímicas y su almacenamiento.

4.2.6 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA. (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) se realiza en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico), de ahí su nombre SDS-PAGE. El SDS se encarga de desnaturalizar las proteínas rompiendo las interacciones no covalentes además de recubrir las proteínas proporcionando carga negativa. Los geles están formados por acrilamida, bisacrilamida, SDS, tampón-tris, PSA (encargado de formar radicales en disolución que

interaccionan con la acrilamida y bis acrilamida) y TEMED (iniciador de la polimerización) (*apartado 4.1.1*). La acrilamida polimeriza entre si intercatenariamente con la bisacrilamida, por lo tanto, variando la proporción de estos dos reactivos se conseguirán distintas porosidades en los geles. Estos geles actúan a modo de tamiz molecular retrasando el movimiento de macromoléculas grandes. Los geles de poliacrilamida se dividen en dos:

Gel compactador o *stacking gel*: este gel difiere por la concentración de acrilamida que es menor permitiendo que los poros sean de mayor tamaño. Y por la diferencia de pH debido a la adición del tampón Tris. Así pues, las proteínas de una muestra se concentran en una banda al principio antes de pasar al *resolving gel* facilitando que vayan a la vez

Gel de resolución o *resolving gel*: la diferencia parte del tamaño de poro, el cual será menor que en el *stacking gel* debido a que la concentración de acrilamida es mayor. Esto permite la separación de las proteínas en función de su masa molecular.

En este trabajo se realizaron geles del 10% (p/v) en acrilamida. Estos geles se realizan en un soporte añadiendo el gel de resolución primero, el gel compactador después y colocando un peine para formar los pocillos donde se introducen las muestras y el marcador. Cuando polimeriza se introducen en una cubeta que contiene *Running buffer* (*apartado 4.1.1*). Una vez se ha formado el gel se introducen las muestras previamente preparadas (*apartado 4.2.2*) en los pocillos del gel y se carga un marcador de peso molecular conocido (mezclas de proteínas de peso molecular conocido y que se tiñen uniformemente), NZY Bluesafe[®]. Se aplica una intensidad de carga constante (25 mA/gel) durante 65 minutos y se va controlando la electroforesis en función de la altura del frente marcado por el azul de bromofenol. Una vez termina la electroforesis se realiza la tinción de los geles en cloruro de cobre incubando durante 5 minutos en agitación. Se lava en agua destilada y se coloca el gel en un transiluminador de luz blanca Gel DocTM EZ Image, y se realiza una captura fotográfica.

Por último, se analizan los resultados de la separación proteica Para ello hay que tener en cuenta el retraso electroforético causado por la hidrofobicidad del polímero provocando que las bandas aparezcan a un tamaño de banda superior al real.

Esta técnica permite separarlas proteínas en función de su tamaño molecular y así poder conocer el peso aparente del polímero, su grado de pureza y el factor de retraso.

4.2.7. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Para poder analizar el tamaño de fragmentos de DNA se utiliza una electroforesis en geles del polisacárido agarosa. Se preparan geles en distintas concentraciones de agarosa en tampón TAE (*apartado 4.1.2*). La agarosa es un polímero cuyas cadenas forman fibras helicoidales que, tras la fusión en medio acuoso, al enfriarse solidifican formando una malla cuyo tamaño de poros puede ser controlado con la concentración y el tipo de agarosa. El tampón utilizado tiene un pH básico facilitando que los grupos fosfatos de DNA se encuentren cargados negativamente, así separar las moléculas de DNA sometidas a electroforesis que se desplazarán al polo positivo en función de su tamaño.

Estos geles se realizan en un matraz sobre el cual se añade la agarosa y el tampón TAE, luego se calienta hasta que se disuelva completamente. Una vez disuelto se vierte sobre un formador donde se coloca un peine para formar los pocillos donde se cargarán las muestras y el marcador y se deja enfriar (*Figura 5*).

Una vez polimerizado, el gel se introduce en una cubeta de electroforesis que contiene tampón TAE. En los pocillos se cargan las muestras y un marcador NZY Ladder III que contiene 14 fragmentos de DNA de tamaños y cantidades conocidas (*Figura 10*). Los geles se someten a un voltaje fijo comprendido entre 2 y 7 V/cm entre los dos electrodos.

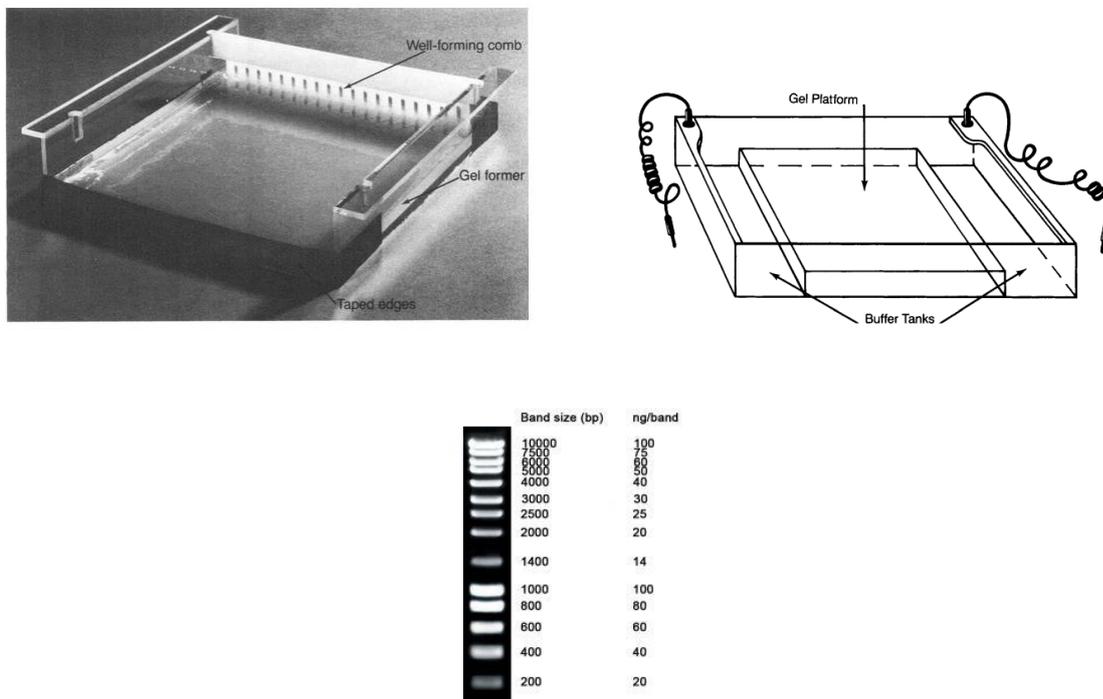


Figura 10. A la izquierda, gel de agarosa polimerizando sobre el formador con el peine formando los pocillos. A la derecha, cubeta de electroforesis. Debajo, tamaño de las bandas que se obtienen con el marcador NZY Ladder III

4.2.8 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Se realiza una purificación del plásmido procedente de una cepa de *E. coli*. con el fin de determinar si las colonias transformadas contienen el plásmido correcto. Para ello se ha usado el Kit **Quantum Prep Plasmid MidiPrep Kit** (Kit BioRad) el cual contiene un protocolo facilitado por el fabricante cuyo esquema se muestra a continuación (*Figura 11*).

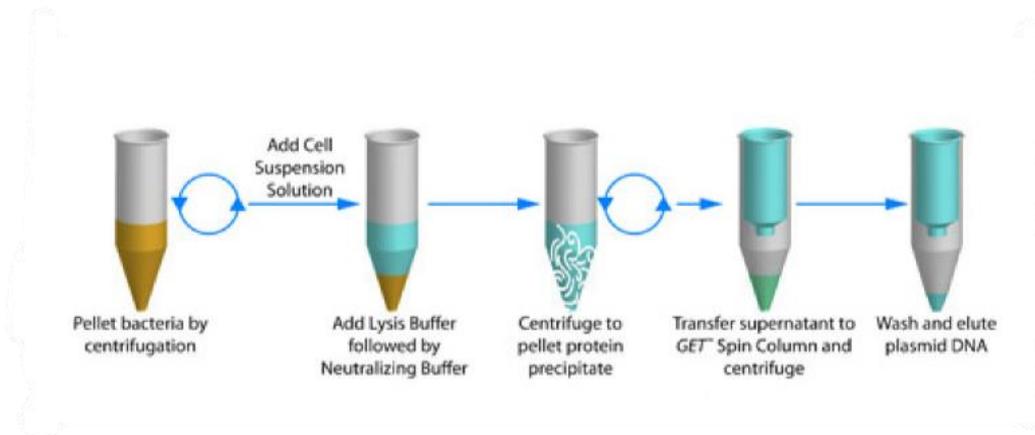


Figura 11. Esquema del protocolo de extracción y plásmido²⁶

Brevemente, el proceso se inicia preparando un cultivo bacteriano de 60 mL. Tras esto se procede a eliminar el medio de cultivo mediante una centrifugación retirando el sobrenadante. A continuación, se añade Buffer A1 conservado a 4°C para resuspender las células. Este tampón permite el lavado y permeabilización de células, además contiene la enzima RNAasa que se encarga de degradar RNA que pueda encontrarse en la disolución evitando que la relación A260/A280 tenga valores superiores a 2. Una vez están resuspendidas se toma el Buffer A2, el cual realiza una lisis alcalina y es el encargado de romper parcialmente la pared de la bacteria y permitir la salida del DNA plasmídico al medio extracelular. La ruptura se produce debido a que contiene NaOH y SDS, medio lo suficientemente alcalino que provoca la ruptura. Tras esto se añade el Buffer A3 el cual contiene cloruro de guanidinio el cual romperá los enlaces no covalentes que se formen entre DNA y otras biomoléculas además de neutralizar el buffer A2. Para poder eliminar restos celulares que puedan encontrarse en disolución se realiza una centrifugación separando el pellet (contiene restos celulares) y el sobrenadante (contiene el DNA plasmídico). El sobrenadante se introduce a través de una columna de extracción en fase sólida (SPE) y se centrifuga para que la muestra atraviese la columna. El sorbente de la columna de sílica va a tener afinidad únicamente por el DNA del

plásmido. Se añade el buffer de lavado AW calentado previamente a 50°C encargado de eliminar los interferentes que puedan haber quedado atrapados en la columna eluyéndolos junto al buffer. Por último, se añade el buffer de elución para facilitar la salida del DNA de la columna, ya que tiene más afinidad por el DNA que la sílica de la columna y permite su elución.

4.2.9 DETERMINACIÓN CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL PLÁSMIDO

Una vez se termina el proceso se toma una muestra de DNA plasmídico y se analiza la concentración y pureza, mediante las lecturas a 3 longitudes de ondas en un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). En la tabla que se muestra a continuación se indica la pureza de la muestra (*Tabla 5*). La ratio de pureza A260/280 indica si la contaminación es debida a proteínas siendo a 280 nm la longitud a la que absorbe el triptófano y 260 nm las proteínas, mientras que la ratio A260/230 indica si la contaminación es debida a fenoles y carbohidratos siendo a 230 nm la longitud de onda que absorben fenoles o carbohidratos. Dado que la absorbancia y la concentración pueden relacionarse con la Ley de Lambert-Beer (*ecuación 1*) pueden conocerse los valores de absorbancia y concentración mediante una regresión lineal:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Ecuación 1. Absorbancia en función de la concentración de DNA de la disolución.

Siendo A la absorbancia a una determinada longitud de onda λ ; a la absortividad a esa longitud de onda, b el camino óptico de la radiación y c la concentración de la muestra que absorbe la radiación incidida. El blanco utilizado en la determinación es el tampón de elución utilizado para la purificación del plásmido.

Tabla 5 Valores de pureza del plásmido del DNA

Relación	Valor (Unidades de absorbancia)	Pureza
A260/A280	>2.0	Contaminación con RNA
	1.8 – 2.0	DNA de pureza óptima
	1.6 – 1.8	DNA de pureza aceptable
	< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos
A260/A230	1.5 – 2.2	DNA de pureza óptima
	< 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos y fenoles

4.2.10 SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación es una técnica que permite determinar de manera exacta el orden de los nucleótidos de un fragmento individual de DNA. El método utilizado para la secuencia del DNA obtenido del plásmido purificado (*apartado 4.2.8*), es el método Sanger. Este método se basa en la interrupción de la síntesis de DNA mediante la inclusión de dideoxynucleótidos marcados fluorescentemente permitiendo que su incorporación pueda monitorizarse. La síntesis de DNA se inicia en un punto único marcado con un cebador sintético. Al incorporarse los dideoxynucleótidos se detiene la síntesis de DNA porque no hay ningún grupo hidroxilo en 3' para la adición del siguiente nucleótido, generando una serie de moléculas de DNA donde cada una termina en la base representada por un dideoxynucleótido fluorescente determinado. Por último, se determinan estos fragmentos, previamente separados por tamaño, a partir de un haz láser que excita las moléculas fluorescentes y cuya luz emitida es llevada a un fotomultiplicador para amplificar la señal y analizarla en un ordenador y representarla en un electroferograma.

La secuenciación de los pDNA se lleva a cabo en la empresa Cenit Support Systems S.L. situada en el Parque Científico de Salamanca (Villamayor).

4.2.11 DIGESTIÓN DE DNA MEDIANTE ENDONUCLEASAS

Las digestiones enzimáticas se llevan a cabo según las indicaciones de la casa comercial que proporciona la enzima. Una vez finalizada, la digestión se evalúa mediante electroforesis de DNA (*apartado 4.2.9*).

Las digestiones pueden realizarse con dos fines: analíticos y preparativos. Con fines analíticos se utiliza para identificar fragmentos de DNA mientras que, con fines preparativos se utiliza para recuperar y purificar DNA.

En este trabajo se realizaron dos digestiones: una con *XhoI* y otra con *DpnI*, enzimas cuyos sitios de reconocimiento se encuentran explicados en (*apartado 4.1.3 enzimas de restricción tabla 3*). Para la digestión de cada una se tomó 1 tubo de 1,5 mL donde se añadió plásmido purificado, enzima *XhoI*, *tampón Tango* y agua desionizada. Se tomó otro tubo eppendorf donde se añadió plásmido purificado, enzima *DpnI*, *buffer R* y agua desionizada. Ambas digestiones se incubaron en la incubadora estática (Memmert) durante 12 horas a 37 °C.

4.2.12 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

4.2.12.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas se trata de una técnica analítica de análisis cualitativo y cuantitativo que permite identificar un compuesto conociendo su masa molecular.

En esta técnica se obtiene un ión molecular, que es el de mayor masa molecular y a la izquierda de este se encuentran los productos de fraccionamiento de la muestra. Esta técnica se divide en 4 etapas: activación (ionización), para poder detectar los compuestos deben estar ionizados ya que no detecta las especies neutras; Aceleración (extracción), una vez ionizados hay que extraer los analitos de la fuente de iones y acelerarlos con diferencias de potencial; Análisis, los iones acelerados se llevan un analizador el cual los irá separando según su relación m/z ; y, por último la detección, los iones separados han generado una corriente iónica que se transforma en una corriente eléctrica y dará lugar a picos que se observan en el espectro de masas.

La técnica MALDI-TOF se lleva a cabo por una fuente de iones de desorción de láser asistido por una matriz (MALDI) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF). MALDI se trata de una fuente de iones blanda (menos energética, produce menos fragmentación) y trabaja en fases condensadas (sólidos o líquidos) muy útil para el análisis del polímero. TOF es un analizador

adecuado para el análisis de este tipo de polímeros ya que tiene un rango de masa de 200-300KDa.

La muestra se analizó en una concentración de 5mg/mL en agua desionizada. Esta muestra se mezcla con una matriz que protege al analito evitando su degradación además de actuar como diluyente, se incide con una radiación de láser pulsante ionizando así los analitos. Después son enfocados al analizador mediante lentes. Al analizador los iones llegarán con distinta energía cinética y para igualarla se utiliza un reflector el cual aplica un potencial que frena los iones permitiendo así que finalmente todos lleguen a la vez al detector.

El análisis se realizó con el equipo Bruker Autoflex Speed (MALDI-TOF) perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid.

4.2.12.2 Resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y es capaz de dar información estructural de los compuestos. Al alcanzar un protón con una energía adecuada, sus estados nucleares, inicialmente degenerados, se desdoblán en dos niveles de energía. Estos núcleos tendrán transiciones entre ambos niveles dando lugar al fenómeno de la resonancia. Como cada núcleo vibrará a una frecuencia determinada dependiendo del entorno, se podrán identificar los distintos protones que componen el polímero.

La muestra se analizó en una concentración de 20 mg/mL en agua deuterada utilizando el equipo RMN 500 Hz Agilent Technologies del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid.

4.2.12.3 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La técnica DLS (Dynamic Light Scattering) permite analizar la medida del tamaño de entidades submicrométricas sometidas a movimiento browniano y la carga superficial. El movimiento browniano se trata de un movimiento aleatorio entre partículas en suspensión y el disolvente que las rodea y depende del tamaño de las partículas y de la viscosidad del medio. La velocidad del movimiento viene dada por la ecuación de Stokes-Einstein (*Ecuación 2*).

$$D = \frac{k T}{3\pi\eta d_h}$$

Ecuación 2. Ecuación Stokes-Einstein.

Donde k es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta, η la viscosidad del medio y d_h el diámetro hidrodinámico.

Las muestras se analizaron en una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada tipo Mili-Q. Antes de medirlas fueron filtradas con un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 μm para eliminar posibles interferencias por encima de los 450 nm en las cubetas ZEN0040 y DTS1070 (Figura 12). Se utilizó el equipo Zetasizer Nano Series (Malvern) ubicado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Para realizar las medidas se ha fijado la temperatura según ha sido necesario.



Figura 12. Cubetas usadas en DLS. A la izquierda cubeta DTS1070 utilizada para medir el potencial z. A la derecha cubeta ZEN0040 utilizada para medir el diámetro de las partículas.

Tras la realización de las medidas, se obtendrán diferentes diagramas. Junto al diagrama de distribución de diámetro de partícula se obtiene un correlograma (Figura 13). Este correlograma representa la función de correlación, función que registra todas las diferentes frecuencias de intensidad obtenidas a lo largo del tiempo y que dependerán del tamaño de las partículas. También en los resultados se obtendrá el índice de polidispersidad (PDI), el PDI es una medida adimensional de la distribución de tamaño.

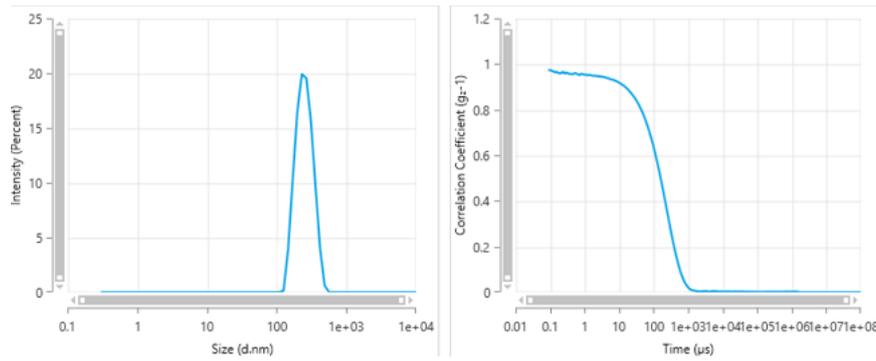


Figura 13. Diagramas obtenidos tras la medida del diámetro de partícula. A la izquierda se muestra el diagrama de distribución de tamaño, a la derecha el diagrama de correlación.

En el análisis el potencial Z se obtienen tres diagramas (*Figura 14*). Se obtiene un diagrama de fases que permite la obtención del diagrama de distribución de carga y el valor del potencial z, y un diagrama que muestra la variación de voltaje/intensidad frente al tiempo que indica la diferencia de potencial que se está aplicando.

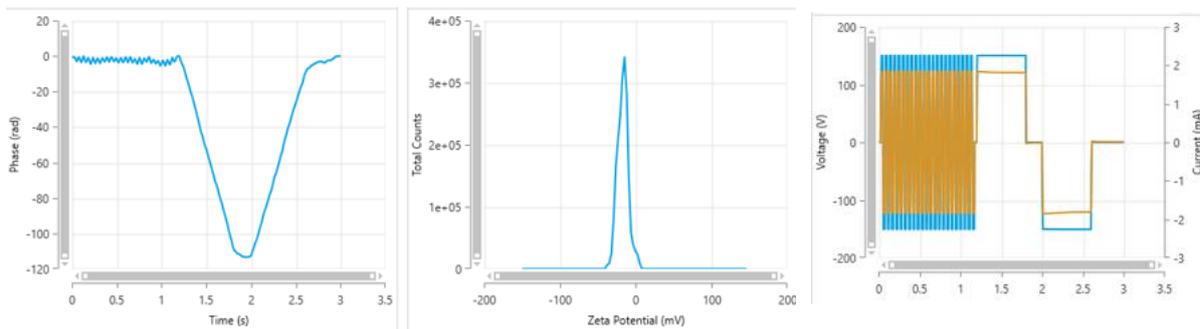


Figura 14. Diagramas obtenidos tras la medida del potencial Z de la partícula. A la izquierda se muestra el diagrama de fases, en el centro se muestra el diagrama de distribución de carga, y a la derecha se muestra el diagrama de la variación del potencial z.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO pET10NKKK

Para la bioproducción del polímero $3K(EI)_2$ se utilizaron técnicas de biología molecular e ingeniería genética. El primer paso es la construcción del plásmido con el gen insertado, EI_2 obtenido a partir del vector de expresión pET10 y proporcionado por el Grupo Smart Devices for NanoMedicine de la Universidad de Valladolid previo a la bioproducción del polímero. Este plásmido contiene el gen que se expresa para dar lugar al polímero de interés.

Para comprobar que la secuencia de nucleótidos del inserto es correcta se realiza una purificación del plásmido y se envía a secuenciar de forma automática. La purificación del plásmido se realiza con el kit de NucleoSpin® Plasmid/ Plasmid (NoLid) Mini kit for plasmid DNA purification (*apartado 4.2.8*). Una vez obtenido el DNA plasmídico se determina su concentración y pureza cuyos valores son: 106,5 ng/ μ L y unas ratios de pureza de A260nm/280nm de 1,94, y para la ratio de A260nm/230 nm de 1,85. Ambos valores se encuentran comprendidos en el rango de pureza óptima (*apartado 4.2.9, Tabla 5*) Estos valores de pureza permiten que se pueda secuenciar el plásmido (*Figuras 15 y 16*). La secuenciación se realiza del extremo 5' utilizando el primer comercial T7 y del extremo 3' con el primer comercial SP6. Se observa que las bases que codifican para las tres lisinas se encuentran al inicio antes de comenzar el bloque hidrofílico y leyendo desde el extremo opuesto la secuencia comienza por el bloque hidrofóbico donde se observa el codón de terminación en marco de lectura con dicho bloque, por lo que se puede afirmar que la secuencia de nucleótidos del gen es correcta.

la enzima *DpnI* se obtienen 21 fragmentos puesto que esta enzima degrada el plásmido entero excepto el inserto, por tanto, se puede ver el tamaño del inserto, 3415bp. Además, se comprueba también que ambas colonias contienen el plásmido al haberse obtenido resultados similares. Las calles #1 y #2 no han sufrido ningún tipo de digestión y únicamente aparece el pDNA con tres bandas que indican los diferentes isómeros topológicos que puede tomar, superenrollado, lineal y circular ¹⁹

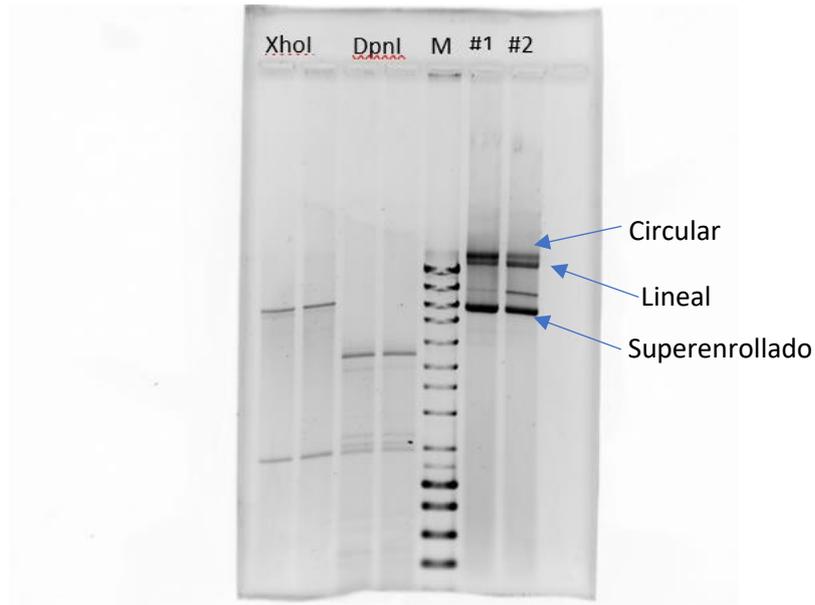


Figura 17. Gel de agarosa analítico del 10% (p/v) teñido con cloruro de cobre. A la izquierda, tras las bandas del marcador (M) de referencia, se muestra la digestión de los plásmidos obtenidos de dos colonias (#1 y #2) con las enzimas *XhoI* y *DpnI*. A la derecha, la digestión de las mismas colonias (#1 y #2) sin digerir.

5.2 BIOPRODUCCIÓN DEL POLÍMERO 3K(EI)₂

Tras la comprobación de la idoneidad del plásmido se comienza con la bioproducción del polímero 3K(EI)₂, cuyo peso molecular teórico es 93175 Da. Posteriormente se someterá a un proceso de purificación y caracterización mediante diferentes técnicas.

Para la expresión de la proteína, se utilizó una cepa de *E.coli* BLR (DE3) competent Cells (Novagen). Cepa utilizada principalmente para la expresión de proteínas cuya secuencia primaria es monótona y por tanto puede tender a su recombinación génica, además necesita unas condiciones y medios concretos para su correcto funcionamiento. Estos medios se diferencian en su composición y finalidad (*apartado 4.1.3.2*).

En primer lugar, se realiza una transformación bacteriana en una placa Petri (*apartado 4.2.1*). Tras la transformación, se realiza la siembra, para ello se seleccionan 8 colonias aisladas al azar, se inoculan sobre medio TB y antibiótico Kanamicina y se incuban durante 16 h a 37°C. Para la evaluación de la expresión se realiza una electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10 % (p/v) (*apartado 4.2.6*) donde se muestra cual de esas colonias es la más productora. Se seleccionan las colonias 1 y 4 para realizar un segundo screening de un subcultivo obtenido a partir de las dos colonias seleccionadas y escoger la mejor colonia para la bioproducción. En el segundo análisis se selecciona la colonia 4.3 (*Figuras 18 y 19*)

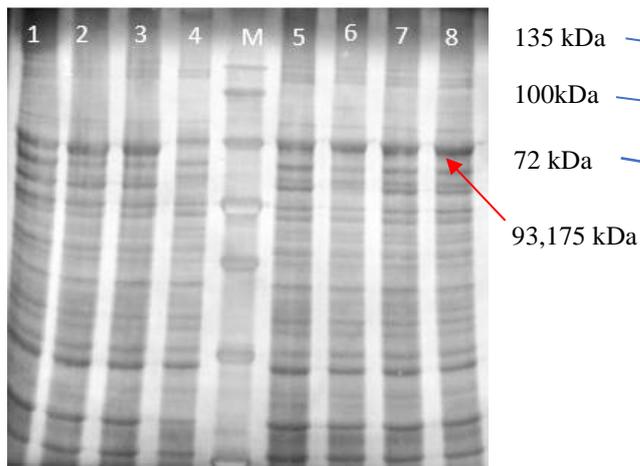


Figura 18. Análisis 1 del 3K(EI)₂. En las calles 1-8 se observan las colonias bacterianas. En la calle M se representa el marcador (Protein Molecular Weigh Marker). Señalado en azul la banda correspondiente al polímero. La banda de la proteína se encuentra indicado con una flecha roja.

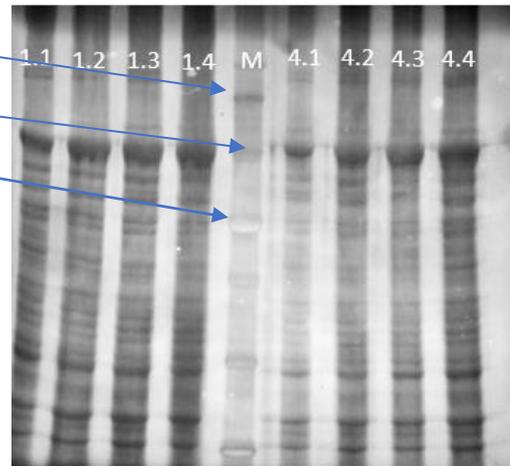


Figura 19. Análisis 2 del polímero 3K(EI)₂. Se muestran los pesos moleculares de las bandas cercanas al polímero. Con flechas azules se encuentran indicados tamaños de banda del marcador cercanos a la banda de la proteína.

A partir de la colonia seleccionada del segundo análisis se inicia el proceso de bioproducción (*apartado 4.2.3*), el cual se repite dos veces para obtener mayor producción. La producción inicial de 4,5 L se realiza en medio TB unido a medio LB AIM porque favorece en gran cantidad la expresión del gen. Antes de parar la producción se toman muestras desde primera hora y se va analizando la absorbancia (*Tabla 6*). Estas absorbancias indican si el crecimiento bacteriano ha llegado a su fin y es posible parar la producción para poder comenzar con la purificación o si necesitan seguir en la incubadora más tiempo, además que también dar una idea de la cantidad de células que han crecido según tenga valores más altos o no. La preparación de las muestras para la absorbancia viene explicada en el *apartado 4.2.3*.

Como se puede observar, el aumento de la absorbancia desde el inóculo hasta la última muestra tomada antes de parar la producción que sucede en un transcurso de 24 horas aproximadamente, indica que ha habido un crecimiento celular como se esperaba. En la segunda producción el crecimiento celular ha sido menor.

Tabla 6. Valores de la absorbancia de las dos producciones.

	Absorbancia a 600 nm	
	Producción 1	Producción 2
Inóculo	2,1	1,7
Muestra 8:30	3,5	2,2
Muestra 9:00	3,7	3,5

5.3. PURIFICACIÓN DE 3K(EI)2

Una vez parada la producción se procede a realizar la recolección, lavado y ruptura celular (*apartado 4.2.4*) con el fin de eliminar el medio de cultivo y todo el medio intracelular que se ha secretado tras la ruptura. Se toman muestras tanto del sobrenadante del material sonicación como del debris celular para su posterior análisis por electroforesis. Es importante realizar todo el proceso anterior a una temperatura constante de 4°C para evitar que la proteína precipite, ya que se encuentra soluble a bajas temperaturas e interesa que se encuentre en el sobrenadante.

Una vez finalizado el proceso de lavado y ruptura comienza la purificación del polímero (*apartado 4.2.5*). La purificación del polímero se realiza mediante ciclos de transición inversa (ITC) gracias a la naturaleza termo-responsiva de estos materiales, que se originan aumentando y/o disminuyendo la temperatura, realizando cambios de pH y añadiendo sal.

5.3.1 PRIMERA ETAPA PURIFICACIÓN: PRECIPITACIÓN POR CAMBIO DE pH

En la primera etapa se realiza un cambio de pH a 4°C y se somete a una centrifugación separando el sobrenadante (fase líquida) del pellet (fase sólida). Posteriormente se realiza una electroforesis de proteínas para controlar la primera etapa de purificación (*Figura 20*). En este paso se quiere eliminar proteínas endógenas de la bacteria que sólo tienen carácter ácido y facilitar su precipitación al volverse más solubles porque han perdido la carga global puesto que se encuentran en el punto isoeléctrico y se vuelven neutras. Todo el proceso de acidificación se realiza a 4°C para facilitar la solubilidad del polímero y evitar su posible degradación proteolítica.

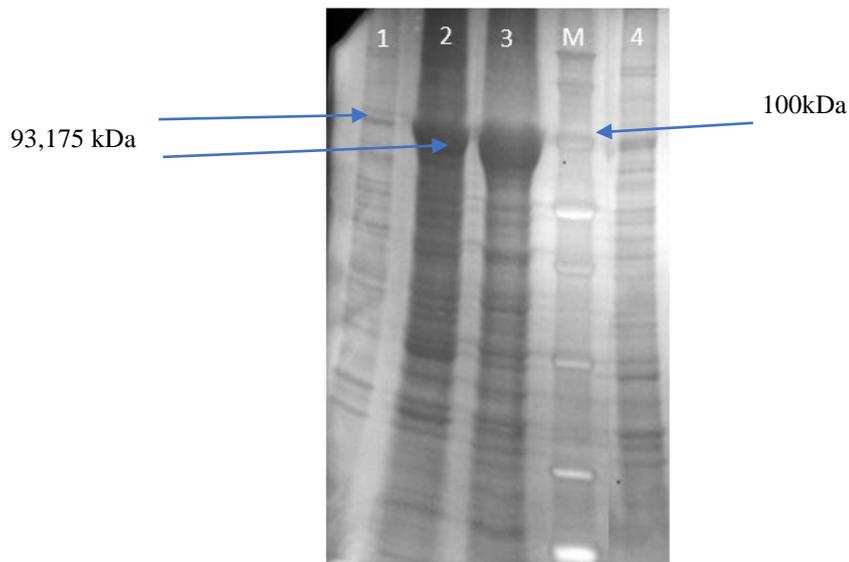


Figura 20. Electroforesis de proteínas tras la acidificación del 3K(EI)₂. En la calle 1 se encuentra el debris (fase sólida) obtenido tras la sonicación, en la calle 2 el sobrenadante obtenido tras la sonicación, en la calle 3 se encuentra el sobrenadante tras la acidificación, y en la calle 4 el pellet ácido tras la acidificación. La calle M representa el marcador (Molecular Weight Marker)

Se puede ver que la banda de la proteína con un peso molecular teórico de 93,175 kDa, a 100 kDa aproximadamente. Las calles 2 y 3 tienen una gran cantidad de la proteína que codifica para el polímero que se está purificando y las calles 1 y 4 no contienen prácticamente la proteína. Señal de que la proteína se encuentra en ambos casos en ambos sobrenadantes ya que posee temperatura de transición y además su PI no es el mismo que el de las otras proteínas.

Tras la separación de las fases se realiza un calentamiento a 42°C de la fase líquida durante 2 horas, se centrifuga y se añade tris-base a la fase sólida o pellet. Se mantiene en agitación durante 16 horas 4°C, se centrifuga separando las fases y se toma muestra de ambas para llevar un control de la purificación (*figura 21*).

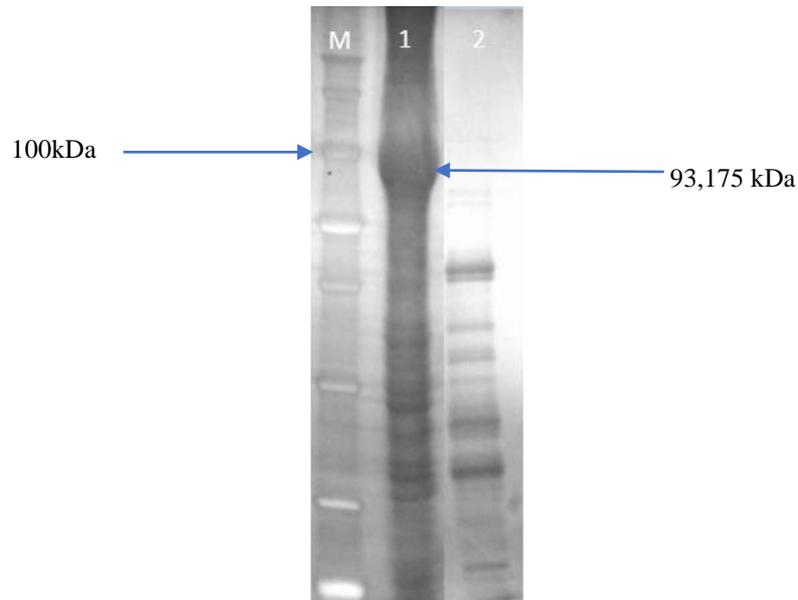


Figura 21. Electroforesis de proteínas tras el calentamiento y posterior resolubilización en tris-base del 3K(EI)₂. En la calle 1 se encuentra el sobrenadante obtenido tras la resolubilización a 4°C, en la calle 2 el sólido obtenido tras la resolubilización a 4°C La calle M representa el marcador (Molecular Weight Marker).

Se puede ver que la banda de la proteína con un peso molecular teórico de 93,175 kDa, a 100 kDa aproximadamente. La calle 1 posee una gran cantidad de la proteína difícilmente cuantificable y la calle 2 no contiene casi nada de la proteína, por lo que se puede concluir que el polímero se encuentra en la fase líquida. El resto de las proteínas al no poseer la temperatura de transición, a 4°C se encontrarán en la fase sólida (calle 2).

5.3.2 SEGUNDA ETAPA PURIFICACIÓN: PRECIPITACIÓN SALINA

Se realiza una segunda precipitación del polímero para continuar con su purificación. Para ello se añadió NaCl 1M a la disolución resultante de la solubilización en Tris-base (pH 8) a 4°C y se lleva a calentar 2 horas a 42°C. Para analizar el proceso de purificación se lleva a cabo una electroforesis de proteínas cuyo resultado se observa en la *Figura 22*

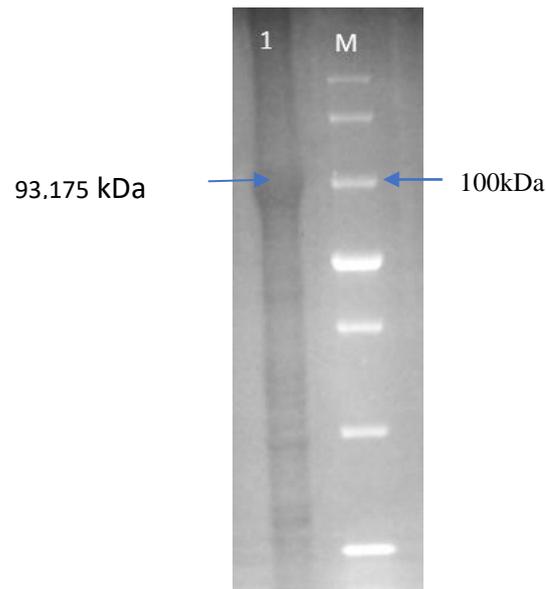


Figura 22. Electroforesis de proteínas tras la segunda precipitación del 3K(EI)₂. En la calle 1 se encuentra el precipitado obtenido tras el calentamiento a 42°C. La calle M representa el marcador (Molecular Weight Marker).

El polímero en la calle 1 debería encontrarse como líquido a esa temperatura y como se observa en la electroforesis se confirma que el polímero se encuentra en el precipitado, aunque aún posee una gran cantidad de proteínas endógenas que no se han conseguido purificar. El sobrenadante es sometido a dos ciclos más de enfriamiento-calentamiento para purificarlo. Una vez purificado, con un porcentaje de pureza aproximado del 96%, el polímero se procede a dializarlo para eliminar las sales que se han ido añadiendo durante la purificación. Una vez dializado se liofiliza para obtener el polímero purificado y seco y así se puede conocer el rendimiento del producto purificado (*Tabla 7*).

Tabla 7. Masas y rendimientos del polímero obtenidos tras el proceso de purificación de las dos producciones.

	Producción 1	Producción 2
Masa obtenida	0,027g	0,121g
Rendimiento	3,6 mg/L	16,12 mg/L

El rendimiento de la segunda producción fue mayor debido a la familiarización personal con las condiciones de trabajo, de todas formas, se considera inferior a los obtenidos anteriormente en el seno del grupo de investigación para polímeros similares lo cual puede deberse a la inclusión del bloque de lisinas en el extremo amino terminal¹¹.

5.4 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

El polímero obtenido se somete a una serie de caracterizaciones fisicoquímicas para determinar su peso y pureza además de comprobar la estabilidad de las moléculas en diferentes medios. Se han utilizado las técnicas de electroforesis SDS-PAGE, espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión dinámica de la luz (DLS) y RMN.

Las caracterizaciones fisicoquímicas se llevaron a cabo con la segunda producción puesto que la cantidad obtenida fue mayor.

5.4.1 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR APARENTE POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Se realiza una electroforesis SDS-PAGE del polímero a distintas cantidades tras la liofilización (*Figura 23*). En ella pueden observarse las bandas más anchas pertenecientes al polímero 3K(EI)₂ y otras bandas de menor intensidad y menor tamaño molecular que al parecerse tanto entre sí puede ser debido productos de la propia degradación del polímero. Con el programa informático del equipo de visualización Gel Doc EZ se ha calculado el peso molecular.

El polímero 3k(EI)₂ tiene un peso molecular aparente de 98,028 kDa, que se asemeja al peso molecular teórico 93,175 kDa. La diferencia de peso entre ambos se debe al retraso electroforético que sufren este tipo de polímeros debido a su hidrofobicidad por la presencia del bloque de isoleucinas, y en este caso es del 18 %.

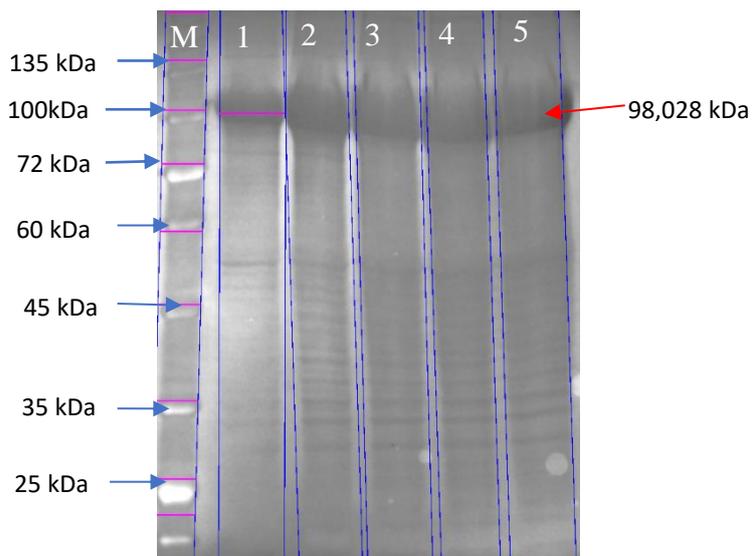


Figura 23. Electroforesis de $3K(EI)_2$ obtenido tras la liofilización. Las calles 1,2,3,4 y 5 contienen 1mg/60 mL de polímero añadiendo en cada calle 5 μ L, 10 μ L, 15 μ L, 17 μ L Y 20 μ L respectivamente. La calle M representa el marcador (Molecular Weight Marker). En rojo el peso molecular aparente del polímero

5.4.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)

El espectro de masas obtenido (*figura 24*) con MALDI-TOF (*apartado 4.2.11.4*) aparece un pico mayoritario a 92434 Da que se corresponde con el ión molecular de $3K(EI)_2$. Al comparar con el peso molecular teórico, 93414 Da hay un 1% de error que puede deberse al error de la propia técnica y al gran tamaño del polímero. Hay otros picos a 46146 Da que se supone que se corresponden con su segunda ionización, 34165 Da con su tercera ionización y 24647 Da con la cuarta ionización del $3K(EI)_2$. Por otro lado, hay unas señales minoritarias alrededor de 30020 Da que puede corresponderse con la posible degradación del polímero como se ha visto en el análisis por electroforesis SDS-PAGE.

Finalmente, al comparar los pesos moleculares teóricos, los pesos moleculares aparentes obtenidos con SDS-PAGE y los pesos moleculares esperados obtenidos con MALDI-TOF se puede ver que prácticamente coinciden.

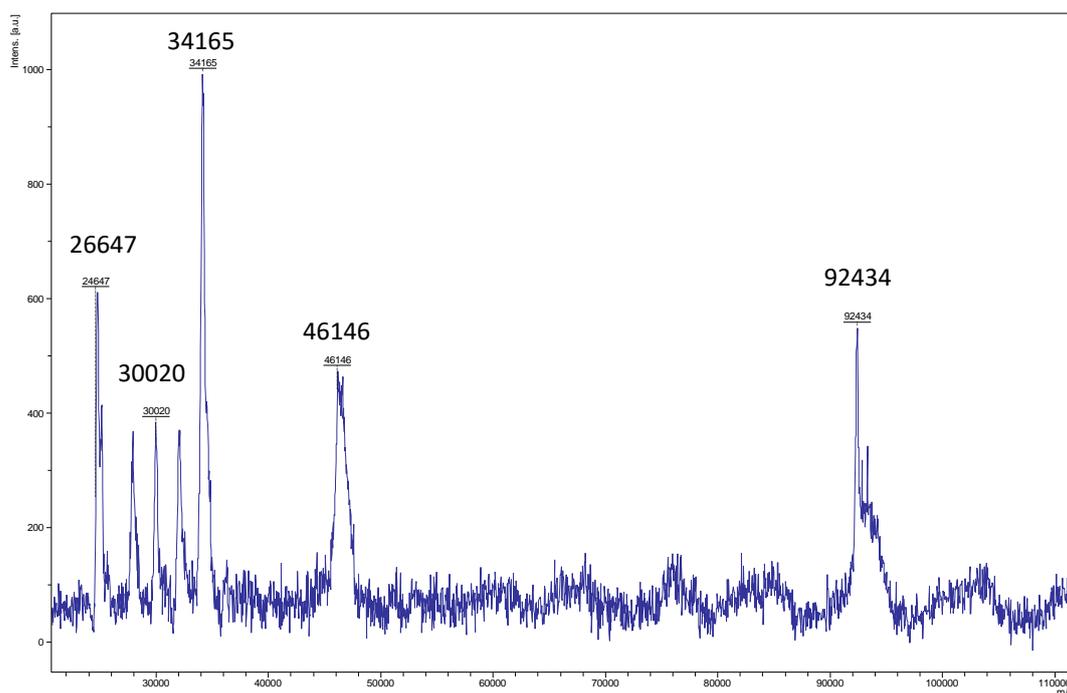


Figura 24. Espectro de Masas de $3K(EI)_2$ obtenido con MALDI-TOF en agua desionizada.

5.4.3 RMN

El espectro de 1H -RMN obtenido del $3K(EI)_2$ (*anexo 3*) sirve para comprobar que el número de hidrógenos experimentales coincide con el número de hidrógenos teóricos, y que, por tanto, su estructura es correcta. Estos datos se comparan en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Clasificación de los protones de $3K(EI)_2$.

Tipos de Hidrógenos	Experimentales	Teóricos
CH_3	849.0	849.0
CH_2 y CH	1040,52	1214,7
NH	-	28,7

Como se muestra en los resultados de la *Tabla 8*, al normalizar la señal de los grupos metilo el resto de las señales adquieren valores similares a los calculados teóricamente. Analizando el resto de las señales se observa son similares. Los grupos NH están presentes porque aparecen en el espectro, pero la cuantificación de los grupos amino es imposible hacerla puesto que los protones sufren equilibrios con los deuterios presentes en el agua deuterada y con el tiempo terminan desapareciendo. El hecho de que haya una diferencia entre los valores teóricos y experimentales, siendo mayor el número de hidrógenos teóricos se debe a que las predicciones teóricas son más precisas dado que el polímero que se está caracterizando es

una macromolécula de grandes dimensiones y la estimación del desplazamiento de los protones con esta técnica conlleva a error.

5.4.4 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

La caracterización física se inicia con el análisis del diámetro hidrodinámico y la carga superficial (Potencial Z) (*apartado 4.2.12.3*) a diferentes temperaturas y grados de agregación. Dada su naturaleza anfifílica, estos polímeros deben ser capaces de formar nanopartículas, evitando así que el bloque hidrofóbico de isoleucina entre en contacto con el agua mientras que el bloque hidrofílico rodea el núcleo formando una corona que está en contacto con el agua. Para estudiar el tamaño y carga superficial de estas micelas se realizaron medidas por debajo y por encima de la temperatura de transición del polímero ^{2,10}y poder analizar el paso de moléculas a agregados. En las medidas del tamaño de la partícula es importante observar también el índice de polidispersidad (PDI) que presentan. Si es cercano a 0,1 indica que la partícula es fundamentalmente monodispersa y la distribución es uniforme, si, por el contrario, es mayor de 0,1 sugiere que puede haber otros agregados en la disolución.

El potencial z se encarga de medir la carga superficial de la partícula, por tanto, es una forma de predecir la estabilidad de la dispersión y la vida media de la partícula. Se considera que cuanto mayor sea el valor absoluto del potencial z, mayor será la estabilidad de la partícula. Se comienza analizando el diámetro hidrodinámico midiendo a 4°C y a 42°C, que es una temperatura superior a la temperatura de transición descrita anteriormente (*figura 25*).

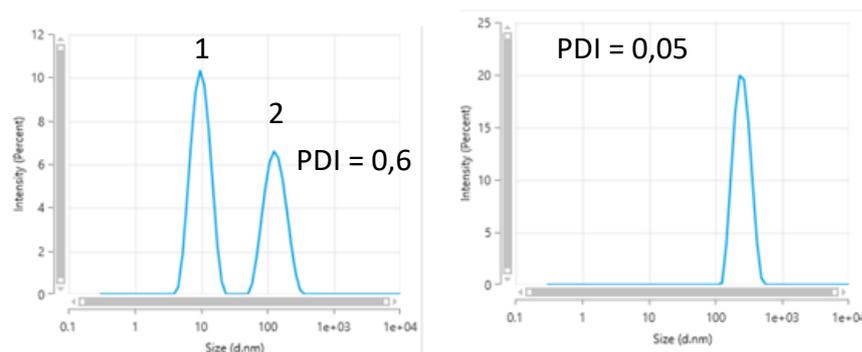


Figura 25. Gráficas de distribución del tamaño de la partícula de 3K(EI)₂ a 4°C a la izquierda y a 42°C a la derecha.

Se puede observar que a baja temperatura aparecen dos distribuciones diferentes de tamaño, lo que indica que se encuentra en forma de molécula con un tamaño de 10 nm el pico 1 y en forma agregada formando micelas ^{12,20} con un tamaño de 137 nm, el pico 2, esto provoca que tenga un índice de polidispersidad alto (0,6). Sin embargo, a 42°C únicamente se ve una

distribución con un tamaño de 256,5 nm y un índice de polidispersidad muy bajo (0,05). El hecho de presentarse agregados a bajas temperaturas es un comportamiento no esperable pues por debajo de la Tt debería encontrarse únicamente en su forma molecular no agregada.. Además, también se observa un aumento del diámetro del agregado al encontrarse a 42°C respecto a su forma agregada a 4°C. Quizás es debido a que al encontrarse a altas temperaturas los agregados dejan de ser tan compactos como se veían a 4°C adquiriendo una estructura algo más abierta.

Posteriormente se realiza una medida del potencial z (*Figura 26*) a 42°C y dado que este análisis puede ser potencialmente destructivo, se realizó una medida del tamaño de partícula antes y después para comprobar si la muestra se había degradado. Además, se añadió un medio ligeramente salino (NaCl 10 mM) con el fin de permitir que la distribución de cargas se estabilice al provocar un apantallamiento de la partícula y facilitar la conductividad de la muestra.

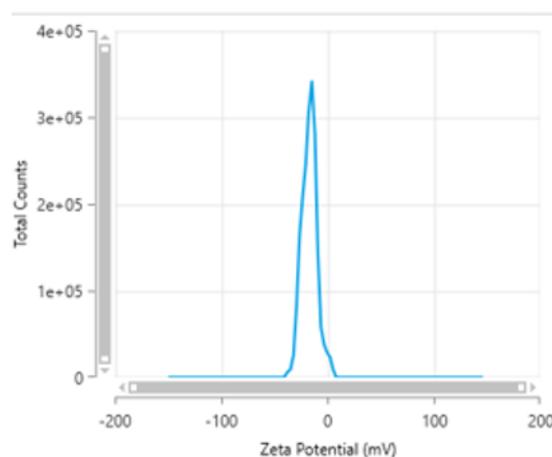


Figura 26. Gráfica de distribución de carga del potencial z del 3K(EI)₂

Tras la medida, el tamaño y la distribución de muestra no cambió (*figura 27*) y el potencial z obtenido fue de -16,92 mV en su superficie. Potencial negativo lo suficientemente alto para poder predecir que la partícula es estable²¹ y no va a interactuar consigo misma.

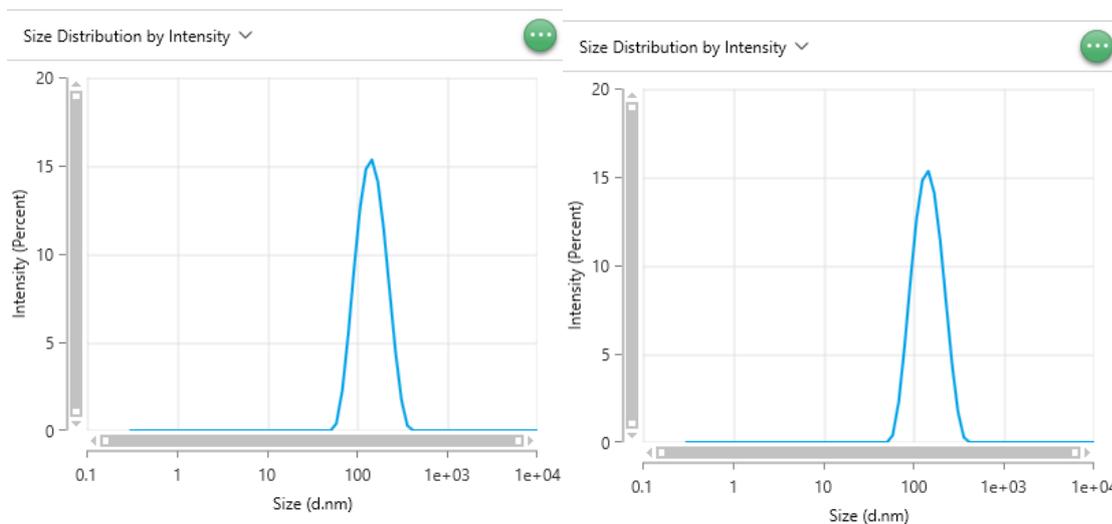


Figura 27. Gráficas de distribución de tamaño del 3K(EI)₂ a 42°C. A la izquierda antes de medir el potencial Z, a la derecha tras medir el potencial Z.

Por último, se realizó el análisis del tamaño hidrodinámico mientras se ejecutaba una rampa de temperaturas. Para ello se analizaron temperaturas entre 4 y 42°C para poder encontrar la temperatura de transición del polímero y estudiar el cambio de conformación (*anexo 4*). Como el polímero ya tenía dos distribuciones inicialmente, se analizó la intensidad de las distribuciones y así poder comprobar el posible cambio de intensidad con la temperatura (La intensidad dependerá del número de partículas que haya en la disolución y también del tamaño de las mismas).

Tras la finalización de la rampa puede observarse que las dos distribuciones iniciales a 4°C no desaparecen en ningún momento, sino que varían según sus intensidades, por tanto, se puede hacer una relación entre ambas intensidades (*Figura 28*) y observar que a 30°C se produce un salto entre intensidades indicando que a esa temperatura el polímero ha sufrido la transición y habrá agregados en mayor proporción que partículas dispersas en disolución. Es una temperatura lejos de lo esperado al analizarla con esta técnica, ya que, en este tipo de polímeros, el bloque hidrofóbico suele sufrir la transición a temperaturas entre 16-20°C² mientras que el bloque hidrofílico tendría una Tt superior a 70°C considerando el pH neutro de la disolución.

También se comprueba que al ir aumentando la temperatura gradualmente y no de forma brusca el agregado que inicialmente tenía un tamaño de 111,16 nm a 4°C terminó con un tamaño de 47,4 nm a 42°C, es decir, que las micelas se compactan con el paso del tiempo y el aumento de la temperatura.

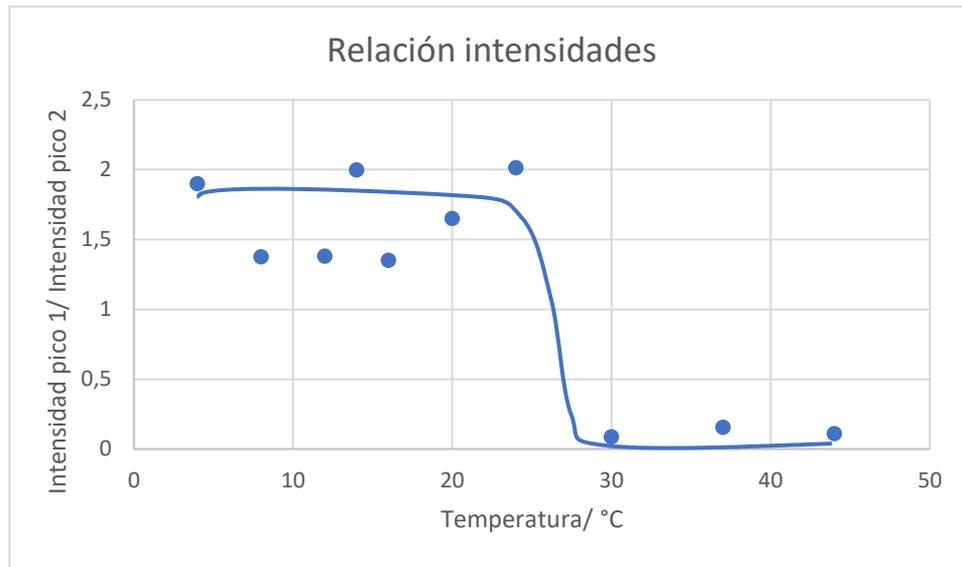


Figura 28. Gráfica que muestra la relación de intensidades de ambas distribuciones durante la rampa de temperaturas.

5.4.4.1 ESTABILIDAD PARTÍCULA 3K(EI)₂

Se analiza la capacidad de una partícula del polímero de formar agregados estables en distintos medios a lo largo de un periodo de tiempo en condiciones fisiológicas.

Se prepararon tres soluciones disolviendo 2mg/mL del polímero en frío. Una en medio salino PBS (pH 7,4), otra en agua MQ y una tercera en PBS que contenía la proteína BSA, principal proteína sanguínea, con una concentración de 0,125 mg/mL. Se filtraron a 4°C usando un filtro de jeringa de PVDF de 0,45µm²² y posteriormente se calentaron a temperatura fisiológica de 37°C. La presencia de la proteína BSA nos permite analizar la estabilidad de la nanopartícula en condiciones semejantes a las fisiológicas en medio sanguíneo donde se encuentran otras proteínas similares.

Las muestras se incubaron durante 10 semanas a 37°C. A lo largo de ese periodo de tiempo se fueron realizando medidas (*Figura 29*) para seguir la evolución de las nanopartículas. Como se puede ver en la *figura 29*, cuando el polímero se encuentra en agua MQ a temperaturas por encima de su Tt, los agregados que se forman, en este caso micelas, tienden a aumentar a

medida que van pasando las semanas adquiriendo un tamaño mayor desde 149,2nm hasta 317,7nm donde se estabiliza. No pierde su estabilidad puesto que siguen siendo nanopartículas, pero se observa un movimiento de apertura en cada medida. Sin embargo, en PBS se puede observar que el polímero se contrae debido al efecto solvador de las sales y se mantiene estable a lo largo del tiempo sin sufrir apenas cambios, partiendo de 35,12nm hasta 34,63nm. En ambas condiciones el bajo PDI nos indica que las poblaciones son monodispersas y estables.

En cambio, cuando la muestra de polímero se analizó en presencia de BSA se obtuvieron dos distribuciones (*anexo 5*) a 6,33nm y 133,9nm. Una posibilidad es que una de las distribuciones podía ser el diámetro de la nueva proteína introducida en la muestra. Se realizó una medida con la proteína BSA disuelta en PBS (*figura 30*) y se obtuvieron unos diámetros similares a los de una de las distribuciones (pico 1 y línea gris de la Figura 29) de la muestra con el polímero (*anexo 5*), confirmando así que una de las distribuciones pertenecía al BSA y otra al polímero (pico 2 y línea amarilla de la Figura 29) y que el BSA tiene comportamiento molecular sin formar agregados.

Volviendo al análisis de la muestra de polímero incubado con BSA en PBS, se puede ver que el BSA ha afectado al polímero a lo largo del tiempo evitando que la partícula llegue a compactarse del todo y se encuentre un poco más abierta. Esto puede ser debido a que el BSA está probablemente interactuando con el polímero y posiblemente se encuentre recubriendo las nanopartículas derivadas de este.

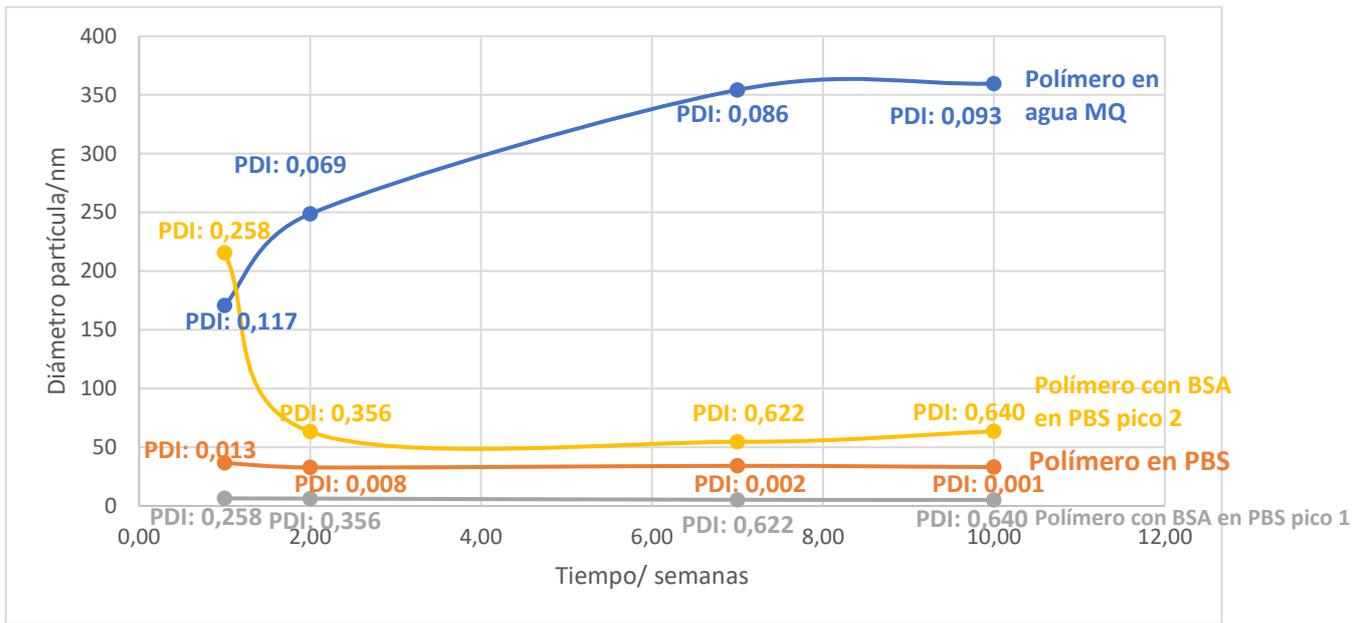


Figura 29. Representación del diámetro de las nanopartículas de las diferentes muestras con polímero en diferentes medios y una de control con BSA disuelto en PBS frente al tiempo (semanas) a una temperatura de 37°C.

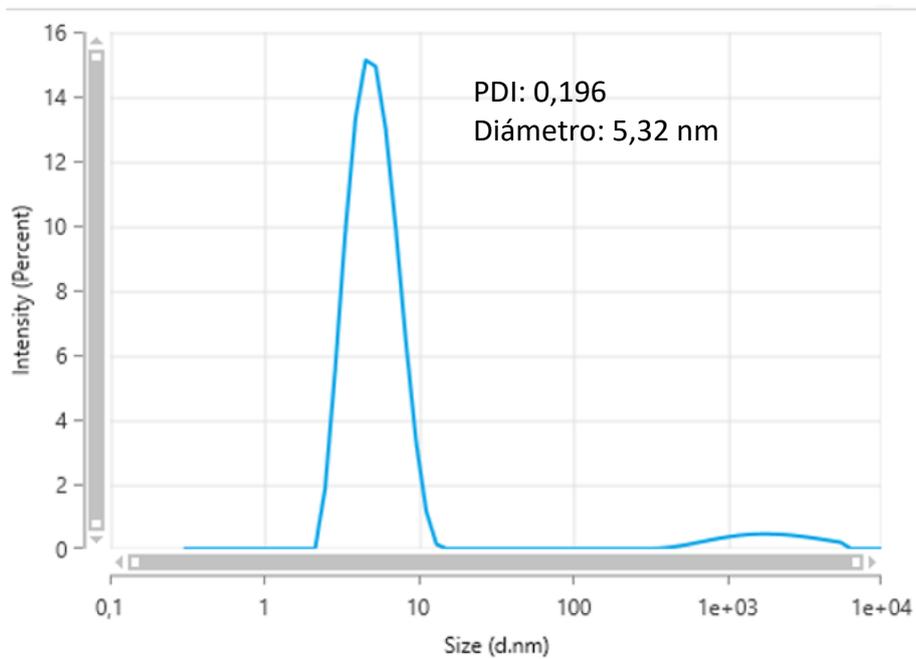


Figura 30. Gráfica de distribución del tamaño de BSA disuelto en PBS a 37°C.

Analizando los valores de PDI (*Tabla 9*), se puede decir que no existe una gran variación en el tamaño de los agregados en agua MQ o PBS, ya que valores $<0,1$ se consideran óptimos para concluir que la población en su mayoría es homogénea. Los valores de PDI en la muestra con BSA no se encuentra en un rango óptimo debido a la aparición de las dos distribuciones.

Tabla 9. Valores de PDI y diámetro de las partículas de las diferentes muestras.

	SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 7		SEMANA 10	
	PDI	Diámetro nm	PDI	Diámetro nm	PDI	Diámetro nm	PDI	Diámetro nm
Polímero en agua MQ	0,117	170,6	0,069	248,7	0,085	354,3	0,093	360,4
Polímero en PBS	0,013	36,65	0,008	32,72	0,002	34,07	0,003	33,74
Polímero en BSA Y PBS pico 1	0,259	6,369	0,356	6,220	0,622	5,110	0,640	5,096
Polímero en BSA Y PBS pico 2		215,5		63,23		54,54		63,45

Estos resultados son muy favorables puesto que permite concluir que las nanopartículas de este polímero permanecen estables a lo largo de 10 semanas en condiciones similares a las fisiológicas

6. CONCLUSIONES

1-Se ha bioproducido en *Escherichia coli* el polímero 3K(EI)₂ a partir de su gen correspondiente (EI)₂ contenido en un plásmido de expresión. Los rendimientos obtenidos en las dos producciones no fueron satisfactorios comparados con otros trabajos experimentales, posiblemente debido a la inclusión de las 3 lisinas en su extremo aminoterminal.

2-Se ha purificado el biopolímero mediante ciclos de transición inversa comprobando que es un método rápido y sencillo y que permite purificar este tipo de polímeros considerando su estructura primaria y su Tt

3-Las técnicas empleadas para la caracterización fisicoquímica del polímero indican que posee las composiciones y características esperadas, excepto las posibles degradaciones observadas en electroforesis SDS-PAGE pero que no se han visto en espectrometría de masas MALDI-TOF

4-Se ha comprobado la capacidad para formar nanopartículas del polímero en diferentes medios y su estabilidad a lo largo del tiempo.

5-En un medio semejante a las condiciones fisiológicas con BSA, no muestra cambios significativos del tamaño de la partícula a lo largo del tiempo por lo que sería interesante su posterior estudio en seres vivos.

6- Sería interesante en próximos estudios analizar la funcionalidad química de las lisinas del 3K(EI)₂.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) BOE-A-2015-8343 Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. <https://www.boe.es/eli/es/rdlg/2015/07/24/1/con> (accessed 2023-10-29).
- (2) Girotti, A. Desarrollo de Una Plataforma Biotecnológicas Para La Obtención de Polímeros Recombinantes Tipo Elastina. **2007**, 1.
- (3) Ratner, B. D.; Bryant, S. J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027> **2004**, 6, 41–75. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOENG.6.040803.140027>.
- (4) Cooper, G. M. and H. R. E. *La Célula*; Marban, Madrid, 2014; Vol. 6a ed.
- (5) Miao, M.; Bellingham, C. M.; Stahl, R. J.; Sitarz, E. E.; Lane, C. J.; Keeley, F. W. Sequence and Structure Determinants for the Self-Aggregation of Recombinant Polypeptides Modeled after Human Elastin. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (49), 48553–48562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308465200>.
- (6) Kowalczyk, T.; Hnatuszko-Konka, K.; Gerszberg, A.; Kononowicz, A. K. Elastin-like Polypeptides as a Promising Family of Genetically-Engineered Protein Based Polymers. *World J Microbiol Biotechnol* **2014**, 30 (8), 2141–2152. <https://doi.org/10.1007/S11274-014-1649-5/FIGURES/2>.
- (7) Reiersen, H.; Clarke, A. R.; Rees, A. R. Short Elastin-like Peptides Exhibit the Same Temperature-Induced Structural Transitions as Elastin Polymers: Implications for Protein Engineering. *J Mol Biol* **1998**, 283 (1), 255–264. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1998.2067>.
- (8) Mithieux, S. M.; Weiss, A. S. Elastin. *Adv Protein Chem* **2005**, 70, 437–461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9).
- (9) Rodríguez-Cabello, J. C.; Girotti, A.; Ribeiro, A.; Arias, F. J. Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials. *Methods in Molecular Biology* **2012**, 811, 17–38. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-388-2_2/FIGURES/5_2.
- (10) Urry, D. W. Entropic Elastic Processes in Protein Mechanisms. II. Simple (Passive) and Coupled (Active) Development of Elastic Forces. *J Protein Chem* **1988**, 7 (2), 81–114. <https://doi.org/10.1007/BF01025240>.
- (11) Rodríguez-Cabello, J. C.; Girotti, A.; Ribeiro, A.; Arias, F. J. Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials. *Methods in Molecular Biology* **2012**, 811, 17–38. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-388-2_2/FIGURES/5_2.
- (12) Girotti, A.; González-Valdivieso, J.; Alonso-Sampedro, I.; Escalera-Anzola, S.; Ramos-Díez, S.; Arias, F. J. Elastin-like Polymers as Nanovaccines: Protein Engineering of Self-Assembled, Epitope-Exposing Nanoparticles. *Methods Mol Biol* **2022**, 2465, 41–72. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2168-4_3.
- (13) Roberts, S.; Dzuricky, M.; Chilkoti, A. Elastin-like Polypeptides as Models of Intrinsically Disordered Proteins. *FEBS Lett* **2015**, 589 (19PartA), 2477–2486. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2015.08.029>.
- (14) Dreher, M. R.; Liu, W.; Michelich, C. R.; Dewhirst, M. W.; Chilkoti, A. Thermal Cycling Enhances the Accumulation of a Temperature-Sensitive Biopolymer in Solid Tumors. *Cancer Res* **2007**, 67 (9), 4418–4424. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4444>.

- (15) Gonzalez-Valdivieso, J.; Girotti, A.; Schneider, J.; Arias, F. J. Advanced Nanomedicine and Cancer: Challenges and Opportunities in Clinical Translation. *Int J Pharm* **2021**, *599*, 120438. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120438>.
- (16) Manouchehri, S.; Zarrintaj, P.; Saeb, M. R.; Ramsey, J. D. Advanced Delivery Systems Based on Lysine or Lysine Polymers. *Mol Pharm* **2021**, *18* (10), 3652–3670. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.1C00474/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MP1C00474_0012.GIF.
- (17) *Thermo Fisher Scientific - ES*. <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html> (accessed 2023-10-29).
- (18) Pierna Álvarez, M. New Strategies to Develop Bioactive Cell-Harvesting Systems Based on Elastin like Recombinamers. **2013**. <https://doi.org/10.35376/10324/4093>.
- (19) Tolmasky, M. E. ; A. J. C. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*; 2015.
- (20) Fernández-Colino, A.; Quinteros, D. A.; Allemandi, D. A.; Girotti, A.; Palma, S. D.; Arias, F. J. Self-Assembling Elastin-Like Hydrogels for Timolol Delivery: Development of an Ophthalmic Formulation Against Glaucoma. *Mol Pharm* **2017**, *14* (12), 4498–4508. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.7B00615/SUPPL_FILE/MP7B00615_SI_001.PDF.
- (21) Por, P.; Vallejo, R.; Para Optar Al Grado De, V.; Javier, F.; Vallejo, A.; Rodríguez, S.; Mercedes, R.; García, S. Encapsulation of Hydrophobic Drugs with Elastin-like Recombinamers by Supercritical Antisolvent Process for Advanced Biomedical Applications. **2022**. <https://doi.org/10.35376/10324/52897>.
- (22) Gonzalez-Valdivieso, J.; Vallejo, R.; Rodriguez-Rojo, S.; Santos, M.; Schneider, J.; Arias, F. J.; Girotti, A. CD44-Targeted Nanoparticles for Co-Delivery of Docetaxel and an Akt Inhibitor against Colorectal Cancer. *Biomaterials advances* **2023**, *154*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2023.213595>.
- (23) Bruce Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*, 6th edn.; 2014.
- (24) Le, D. H. T.; Sugawara-Narutaki, A. Elastin-like Polypeptides as Building Motifs toward Designing Functional Nanobiomaterials. *Mol Syst Des Eng* **2019**, *4* (3), 545–565. <https://doi.org/10.1039/C9ME00002J>.
- (25) *Crecimiento bacteriano: curva, fases, factores*. <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/> (accessed 2024-01-12).
- (26) *Aislamiento de ADN plásmido de 96 pocillos*. <https://www.gbiosciences.com/Molecular-Biology/GET-Plasmid-DNA-96-Well> (accessed 2023-11-01).

8.ANEXO

ANEXO 1. ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre completo
aa	Aminoácidos
Bp/pb	Pares de bases
β -Me	beta-mercaptoetanol
BSA	Albúmina Sérica Bovina
cfu	Unidad formadora de colonias (Colony forming unit)
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELP	Polímero tipo elastina (Elastin-Like Polymer)
H ₂ O MQ	Agua ultrapura
ITT	Transición inversa de la temperatura
ITC	Ciclos de transición inversa
kD	Kilo Dalton

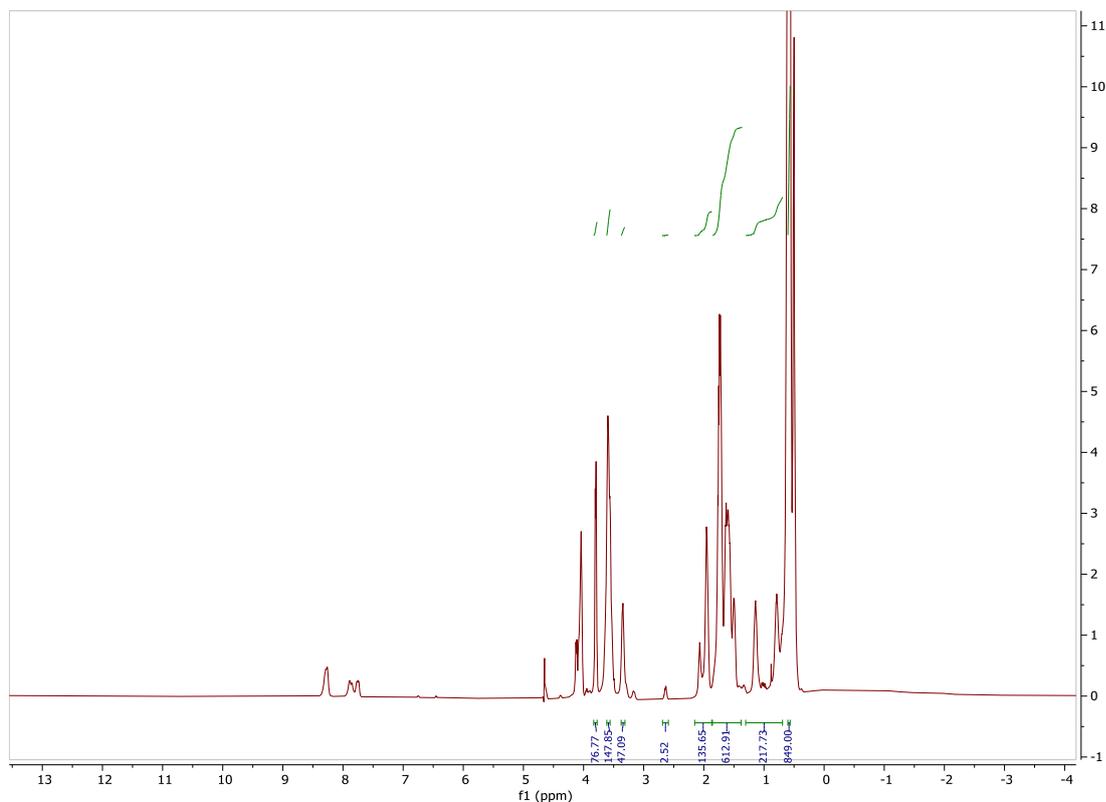
LB	Lysogeny Broth
mL	Mililitros
MALDI-TOF	Desorción/Ionización por Láser asistida por una matriz con detector de tiempo de vuelo
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
PBS	Tampón fosfato salino
PDI	Índice de polidispersidad
pDNA	DNA plasmídico
PI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilsulfonilmetano
PSA	Persulfato amónico
PVDF	Poli(difluoruro de vinilideno)
Rf	Factor de retraso
RMN	Resonancia Magnético Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de poliacrilamida
S.O.C	Super Optimal Broth

TAE	Tris ácido acético-EDTA
TB	Terryfic Broth
Tt	Temperatura de transición
TEMED	Tetrametiletilendiamida
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
μL	Microlitros

ANEXO 2. CÓDIGO DE REPRESENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS

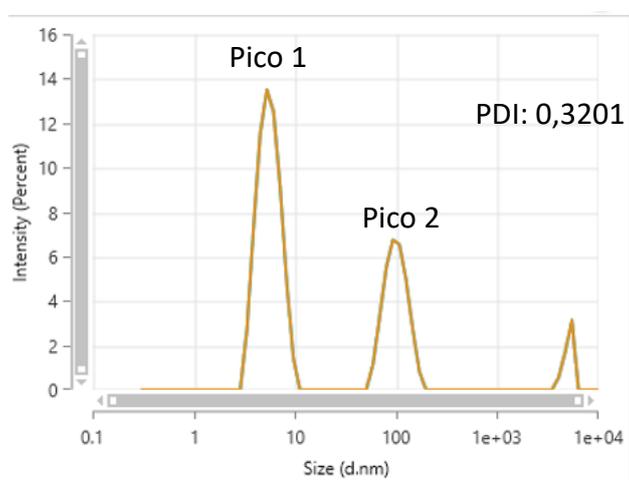
Nombre	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido Glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser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

ANEXO 3. ESPECTRO DE RMN DEL POLÍMERO 3K(ED)₂



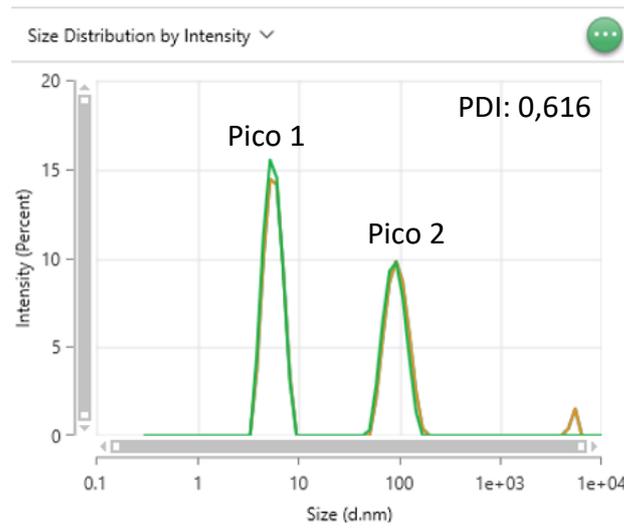
ANEXO 4. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS DEL POLÍMERO A DISTINTAS TEMPERATURAS

4°C



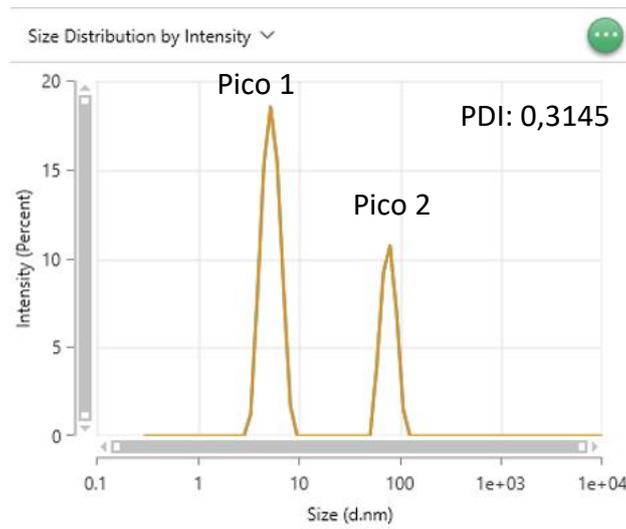
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 4°C.

8°C



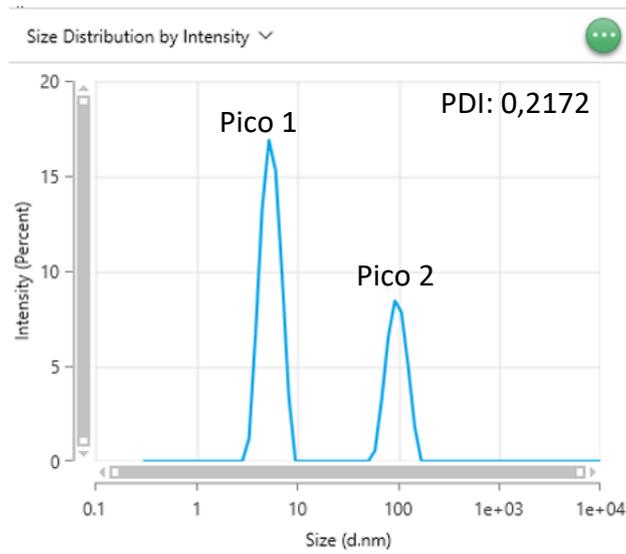
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 8°C.

12°C



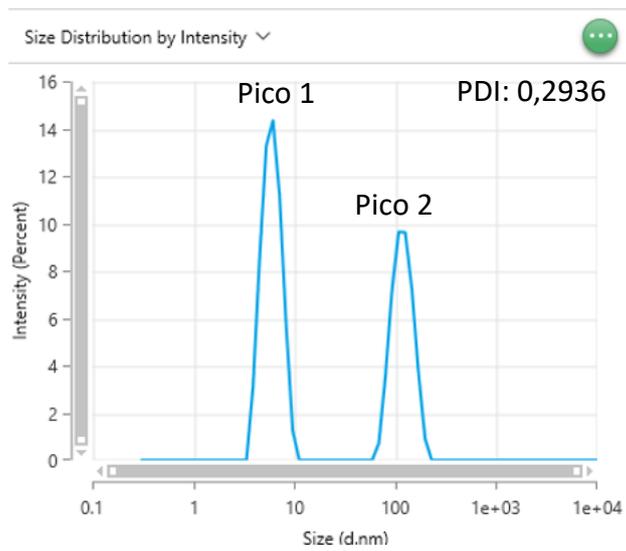
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 12°C.

14°C



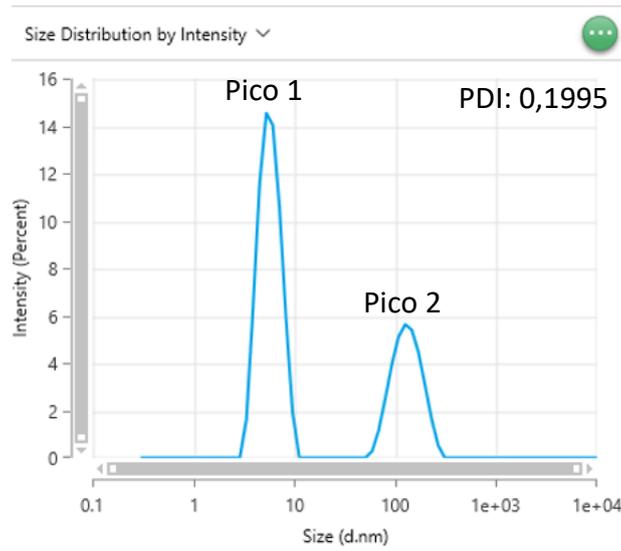
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 14°C.

16°C



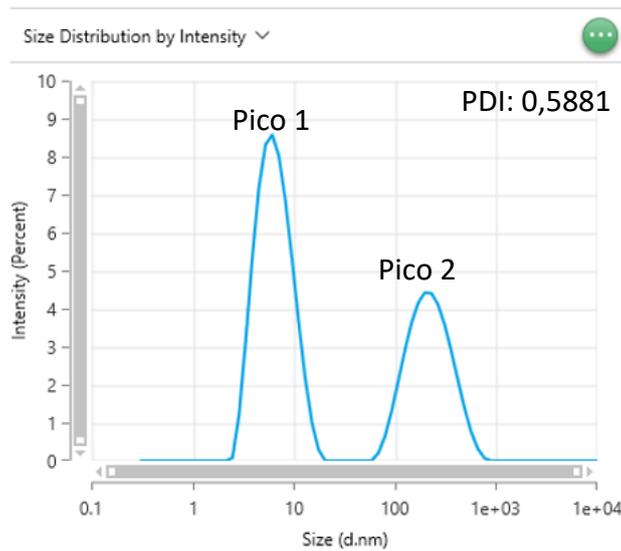
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 16°C.

20°C



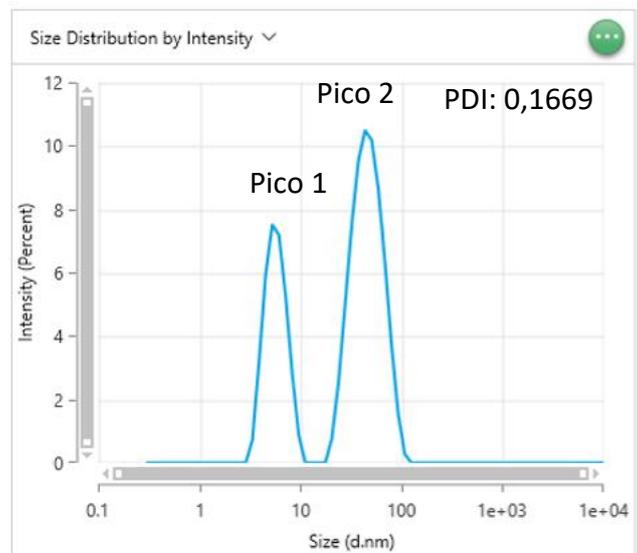
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 20°C.

24°C



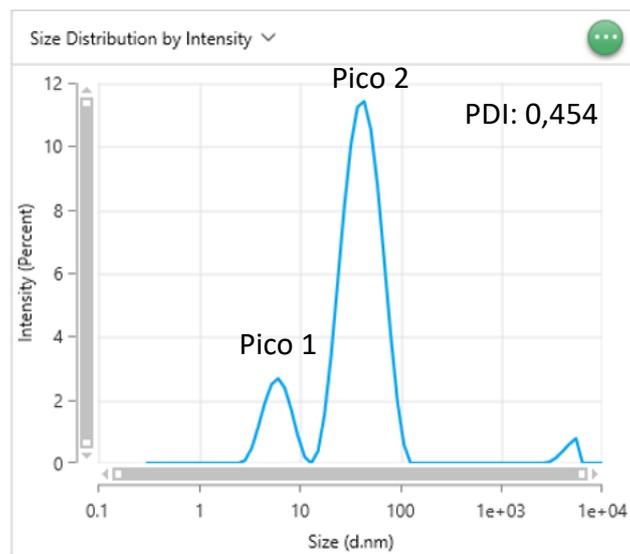
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 24°C.

30°C



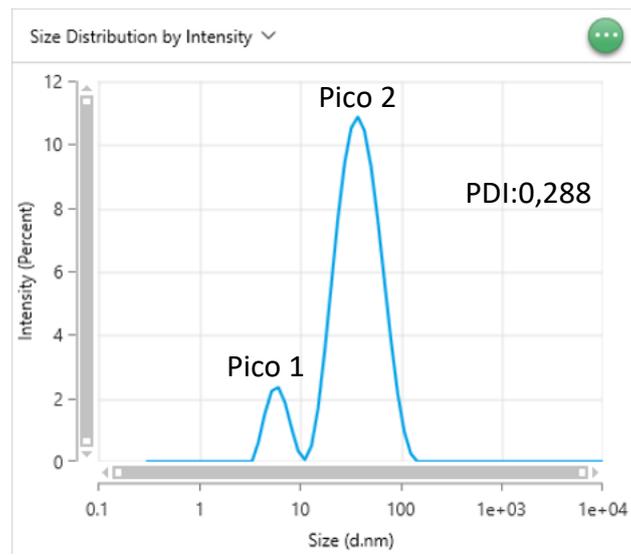
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 30°C.

37°C



Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 37°C.

44°C

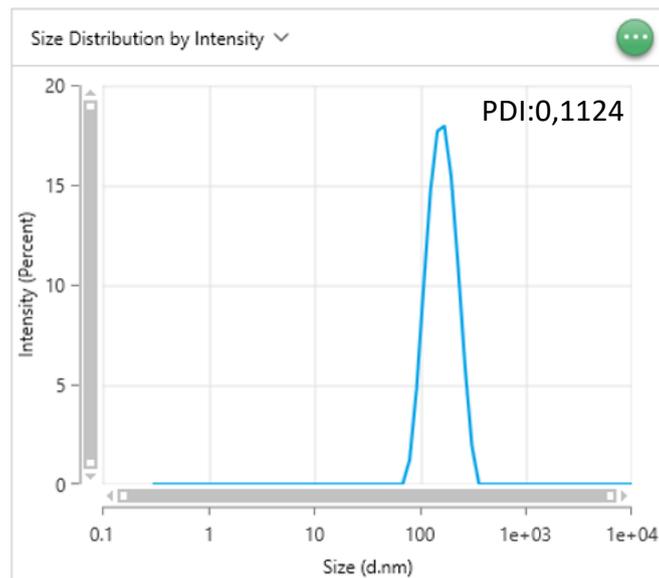


Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 44°C.

ANEXO 5. DISTRIBUCIÓN TAMAÑO POLÍMERO EN DIFERENTES MEDIOS

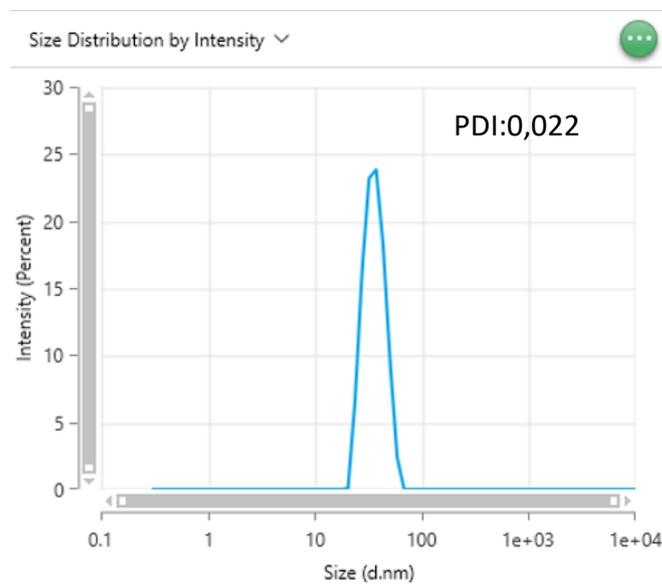
SEMANA 1

POLÍMERO EN AGUA MQ



Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 37°C.

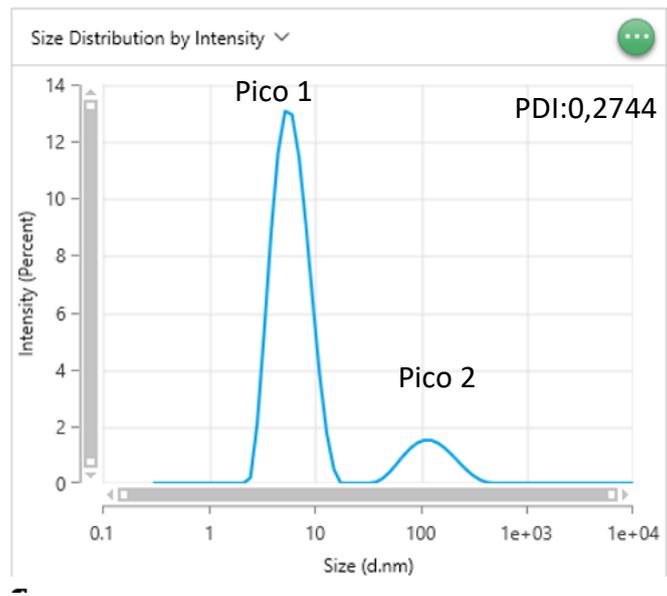
POLÍMERO EN PBS



¶

Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en PBS a 37°C.

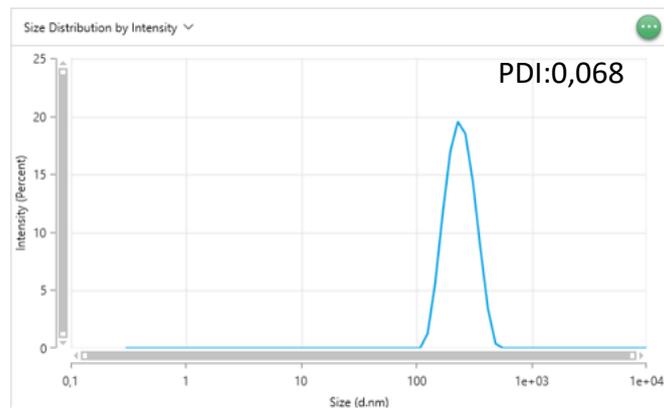
POLÍMERO CON BSA EN PBS



Gráfica de distribución del tamaño de polímero con BSA disuelto en PBS a 37°C.

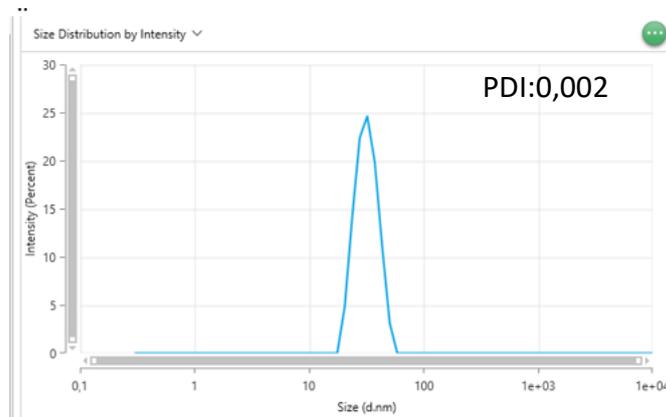
SEMANA 2

POLÍMERO EN AGUA MQ



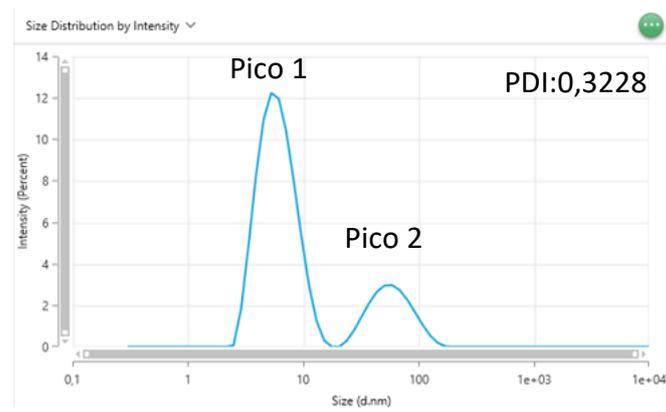
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 37°C.

POLÍMERO EN PBS



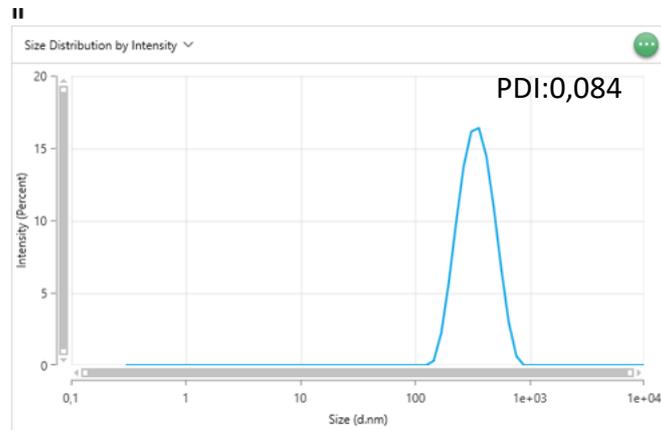
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en PBS a 37°C.

POLÍMERO CON BSA EN PBS



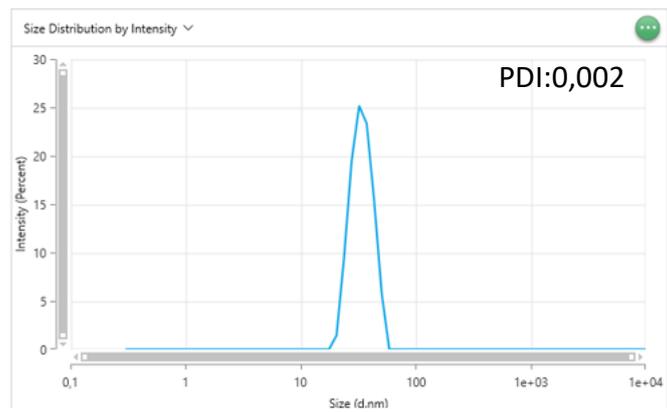
Gráfica de distribución del tamaño de polímero con BSA disuelto en PBS a 37°C.

SEMANA 7
POLÍMERO EN AGUA MQ



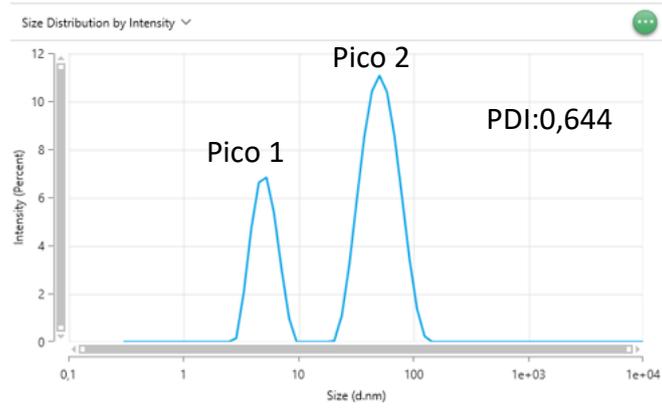
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 37°C.

POLÍMERO EN PBS



Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en PBS a 37°C.

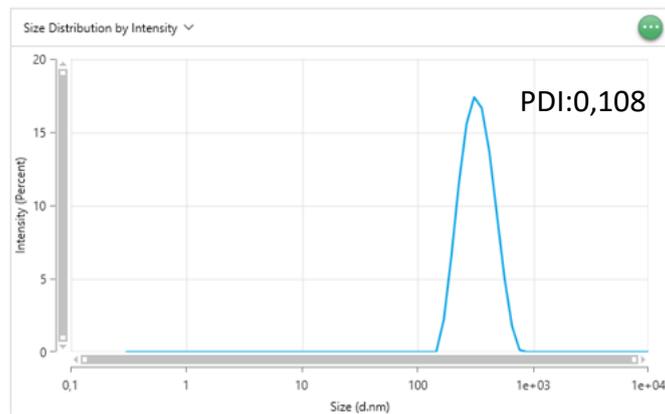
POLÍMERO CON BSA EN PBS



Gráfica de distribución del tamaño de polímero con BSA disuelto en PBS a 37°C.

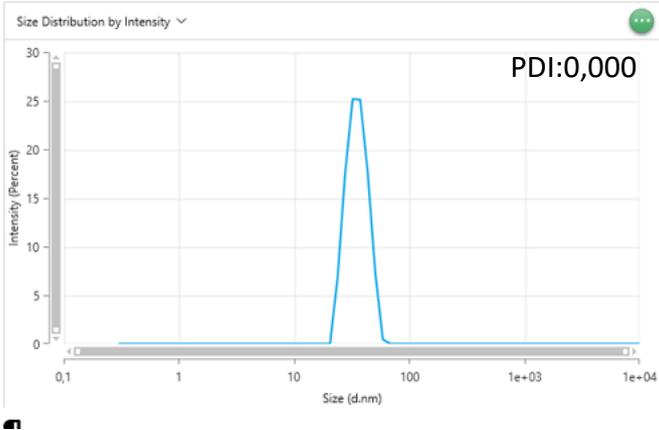
SEMANA 10

POLÍMERO EN AGUA MQ



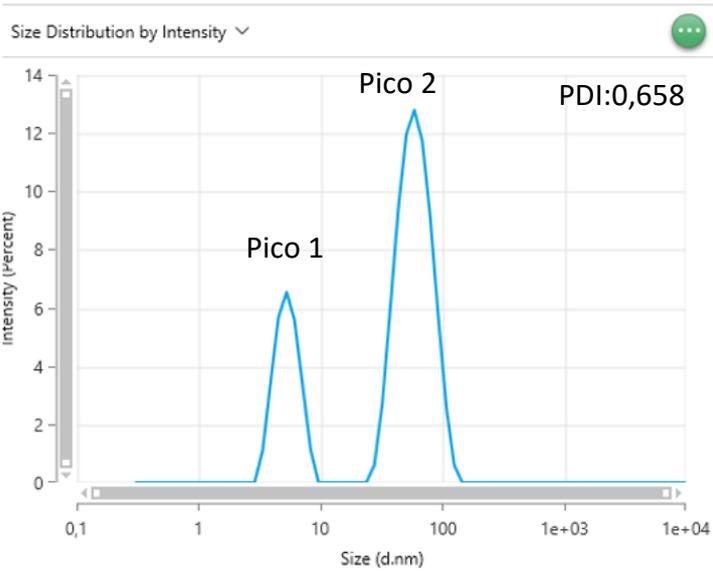
Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en agua desionizada a 37°C.

POLÍMERO EN PBS



Gráfica de distribución del tamaño de polímero disuelto en PBS a 37°C.

POLÍMERO CON BSA EN PBS



Gráfica de distribución del tamaño de polímero con BSA disuelto en PBS a 37°C.