



Universidad Nacional del Sur

Tesis en Doctor en Química

**Elucidación de la auto-organización de la
proteína gliadina y su péptido 33-mer *in*
*vitro***

María Georgina Herrera

Bahía Blanca

Argentina

2016

Prefacio:

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional de Sur y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química, Área II durante el período comprendido entre el 09 de Agosto de 2011 y el 18 de Noviembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. Verónica Dodero, Profesora Adjunto de Química Orgánica.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../....., mereciendo la calificación de..... (.....)

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional del Sur por admitirme como alumna y darme la posibilidad de realizar mis estudios en tan prestigiosa universidad. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas de Posgrado tipo I y tipo II que me otorgó para poderme dedicar a mis estudio Doctorales.

Gracias al Instituto de Química del Sur y sus miembros por darme un espacio en el cual pude desarrollarme profesionalmente.

A mi directora, la Dr. Verónica I. Dodero por sus enseñanzas, por las oportunidades que me brindó durante estos años. Gracias por confiar en mí y por permitirme crecer tanto personal como profesionalmente.

Gracias a la Dra. Soledad Celej, por recibirme amablemente en su grupo de investigación en el CIQUIBIC-UNC y transmitirme sus conocimientos. Me he llevado hermosos recuerdos de esa estancia.

Gracias a la Dra. Patricia Schilardi y a su grupo por abrirme las puertas de su laboratorio en el INIFTA-UNLP en tres ocasiones y permitirme obtener nuevos conocimientos.

Gracias al Dr. Marcelo Costabel de la UNS y los Dres. C. Lonez y J-M Ruysschaert de la Universidad Libre de Bruselas por colaborar en la realización de esta tesis. Y a los Prof. Dr. N. Sewald, Prof. Dr. T. Hellweg y Prof. Dr. A. Hütten de la Universidad de Bielefeld, por permitir el acceso a equipamiento sofisticado.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Alejandra Sequeira, Zulma Quirolo, Tania Veuthey, Luciano Benedini por ayudarme durante el desarrollo de mi tesis y siempre estar cuando los necesité.

Gracias a Estefanía Tenconi, Paula Costilla, Erika Smith, Vanesa Perillo, Anabella Fernández, Cintia Gómez, Zulma Quirolo, Alejandra Sequeira, Juliana Santiago Valtierra, Silvina Grioli, Marylin Graziano, Verónica Benito, Diego Vazquez, Pablo Yunes e Ignacio Gallea por brindarme su amistad y acompañarme en este camino.

Gracias a mis hermanas por acompañarme en esta etapa de mi vida. A mis primos Ignacio, Carolina, Diego u y mi tía Ana porque siempre estar. A Maxi por apoyarme en todo lo que emprendo.

Gracias a Mamá y Papá, porque sin su apoyo incondicional, su ayuda continua, no hubiese logrado nada de lo que conseguí. Gracias por siempre estar conmigo y por su amor incondicional. Los quiero profundamente.

Resumen

La Gliadina es una proteína presente en el trigo, avena, centeno y cebada, que no es completamente degradada durante el proceso de la digestión, produciendo varios péptidos, entre ellos el 33-mer. Este péptido se conoce por ser el principal inmuno-modulador de la patología celíaca, provocando un desbalance entre la tolerancia y auto-inmunidad. En esta tesis se presenta el estudio estructural y la elucidación de la auto-organización de la proteína gliadina y de su péptido 33-mer en medio acuoso y sobre superficies, mimetizando condiciones fisiológicas *in vitro*.

En primer lugar, se determinó que la proteína gliadina se auto-organiza espontáneamente formando agregados solubles a pH 3.0. Cuando se cambió el pH a 7.0, se observó una separación de fases, con disminución de la concentración y cambio en la composición aunque permanecieron ciertas nano-estructuras y agregados amorfos en solución. Si bien no se observaron modificaciones en la estructura secundaria a ambos pHs, se detectó una exposición diferencial de los residuos aromáticos como Tirosina y Triptófano, lo cual puede deberse a un cambio en la estructura terciaria. Por técnicas bioinformáticas, se determinaron probables sitios hidrofóbicos, residuos expuestos al solvente y regiones con capacidad de agregarse, los cuales podrían explicar los hallazgos experimentales observados. Por otro lado, el fluoróforo Rojo Nilo presentó una unión en el orden micromolar solo a pH 3.0, lo cual sugiere la presencia de sitios hidrofóbicos accesibles en los agregados solo a este pH. Estos resultados sugieren que a pH 3.0 el sistema se organiza en nano-estructuras tipo micelares, mientras que a pH 7.0, las estructuras presentaron una disminución de la carga neta de la superficie (desde + 13 a pH 3.0, a + 4 mV a pH 7), llevando a la formación de nano-partículas coloidales que no interactúan con el Rojo Nilo.

En segundo lugar, se evaluaron las características estructurales del péptido 33-mer mediante dicroísmo circular y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier -reflectancia total atenuada, se ha demostrado que el 33-mer se encuentra en un equilibrio conformacional random coil/PPII y PPII/ β paralela, dependiente de la concentración. Mediante dinámica molecular y distribución de cargas parciales fue posible observar que el péptido se comporta como una molécula anfifílica y es

capaz de asociarse formando al menos un dímero estable. En agua a pH 7.0 se observaron oligómeros manométricos y estructuras fibrilares por microscopia electrónica. La presencia de oligómeros en solución del péptido 33-mer fue confirmado mediante anisotropía y fluorescencia resuelta en el tiempo del residuo Tirosina y DLS-Correlación 3D, detectando que 33-mer es un sistema polidisperso dinámico con partículas de tamaños entre los nano y micrómetros en todo el rango de concentraciones analizado (125-610 μM). La microscopia de fuerza atómica del péptido 33-mer en función de la concentración sobre mica confirmó la capacidad de 33-mer de formar nano y micro-estructuras con diferentes morfologías. Se observó a bajas concentraciones clusters de nanoesferas. A concentraciones intermedias oligómeros esféricos asociándose en arreglos lineales, anulares y estructuras similares a placas. A altas concentraciones, se observaron filamentos y placas rodeadas por nanoesferas, con una disposición del tipo fractal. Este tipo de organización se produce mediante un mecanismo de Agregación Limitada por la Difusión.

Por otro lado, se evaluaron los oligómeros del péptido 33-mer sobre dos superficies hidrofóbicas miméticas al intestino, como el HOPG y el dióxido de silicio. En el HOPG se detectaron estructuras de morfología similar a las obtenidas en mica. En la superficie de dióxido de silicio, el auto-ensamblado del 33-mer fue dinámico y dependiente de las condiciones de preparación de la muestra, obteniéndose agregados a través de un mecanismo de percolación. Finalmente, la morfología de las nano-estructuras presentes a 600 μM se resolvió mejor utilizando un microscopio de ion Helio, detectando además de las estructuras mencionadas anteriormente, de nano-cilindros, los cuales se proponen como intermediarios en la formación de las fibras detectadas.

La capacidad de formación de nano-estructuras de variadas morfologías de la gliadina y de su péptido 33-mer *in vitro* y el hecho que estas posean una estructura secundaria característica podría ser un conocimiento fundamental en el estudio de las patologías relacionadas con el gluten

Abstract

Gliadin is a protein present in wheat, rye, and barley that undergoes an incomplete degradation during digestion, producing several peptides, including 33-mer. This peptide is known to be the most important immunomodulator peptide of celiac disease, producing an imbalance between tolerance and auto-immunity. In this PhD Thesis it is presented a structural and auto-organization elucidation of gliadin and its 33-mer peptide in aqueous medium and on surfaces, in physiological conditions *in vitro*.

Firstly, it was determined that gliadin self-assemble spontaneously at pH 3.0 forming spherical aggregates. When the pH was changed to 7.0 a phase separation, concentration diminution and a change on the composition was observed. However, soluble amorphous aggregates remained in solution. Although no difference in the secondary structure at both pHs were detected, differential exposition of Tyrosine and Tryptophan was observed, which could be caused by a tertiary structure change. By applying bioinformatics' tools, possible hydrophobic sites, residues exposed to the solvent and regions with capability to auto-aggregate were evaluated, they could explain the experimental results observed. In the other hand, Nile Red only bound to gliadin nanostructures in the micromolar order at pH 3.0, suggesting that hydrophobic sites were accessible at this pH. These results indicated that a pH 3.0, the system auto-organized as micelar nano-structures, meanwhile at pH 7.0 the nano-structures presented a diminution of the surface charge (from + 13 at pH 3.0 to + 4 mV a pH 7), inducing the formation of colloidal nano-particles that did not interact with Nile Red.

Secondly, the structural characteristics of 33-mer peptide were studied by Circular Dichroism and Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infra Red Spectroscopy, showed a conformational equilibrium between coil/PPII y PPII/ β paralell structures depending on concentration. By Molecular Dynamic Simulation and Partial Charge Distribution, it was observed that the peptide was an amphiphilic molecule and it is capable of associate at least as a stable dimmer. By Electron Microcopy the tendency to self-assemble of the peptide was detected. In water at pH 7.0, oligomers and fibrilar structures were observed. By Time Resolved Fluorescence of Tyrosine, Dynamic Light Scattering-

Correlation 3D in aqueous medium have determined that 33-mer peptide is a dynamic polydisperse system with particles of size between nano-micrometers in the range of concentration analyzed (125-610 μM). Studies done by Atomic Force Microscopy of 33-mer peptide depending on concentration on mica demonstrated that it could form nano and micro structures with different morphologies. It was observed at low concentration clusters of nano-spheres. At Intermediate concentrations spheric oligomers, annular and sheet like structures were observed. A high concentration, filaments and sheets surrounded by nanospheres, with a fractal disposition were detected. This kind of organization was produced by a Diffusion Limited Aggregation.

In the other hand, the auto-organization of 33-mer peptide on two hydrophobic surfaces that are mimetic to the gut surface as HOPG and Silicon dioxide were evaluated. On HOPG similar structures as the ones detected on mica were observed. On Silicon Dioxide the auto-organization of 33-mer was dynamic and dependent on the conditions in which samples were prepared, detecting aggregates that were formed by a percolation mechanism. Finally, the morphology of the aggregates at 600 μM where observed using a Helium Microscope, detecting the formation of nano-rods, which are proposed as the intermediaries in the Fibril formation phenomena.

Finally, the morphology of the aggregates at 600 μM where better resolved by an ion Helium Microscope, detecting the formation of nano-rods, which are proposed as the intermediaries in the fibril formation phenomena.

.The capability of Gliadin and its 33-mer peptide to generate nano-structures of different morphologies *in vitro* and the fact that they have a characteristic secondary structure may be a fundamental knowledge in the study of gluten related diseases.

Abreviaturas:

Símbolos:

\AA = Amstrong

Γ = Taza de relajación

λ = Longitud de onda

$\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ = Longitud de onda máxima

A,B y C:

AFM = Microscopia de Fuerza Atómica

ATR-FTIR = Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier -reflectancia total atenuada

BBM = Membranas de Borde en cepillo

Caco- 2 = Células de Carcinoma de Colon

CD = Dicroismo Circular

CH_3CN = Acetonitrilo

CXCR3 = Receptor de quemoquinas III

D, E, F, G:

D = Difusión

Da= Dalton

D_f = Dimensión fractal

DLA = Agregación Limitada por la Difusión

DLS = Dispersión de Luz Dinámica

EGFR = Receptor del factor de crecimiento epidermal

ESI-MS = Espectrometría de Masas de Ionización mediante Electro-espray.

FMWH = Ancho a la mitad de la altura máxima

GRAVY = Promedio general de Hidropatia.

H, I:

H_2O = Agua

HAADF = Detector angular anular de campo oscuro

HCl = Ácido Clorhídrico

HEPES = Ácido 4-(2-hidroxietyl) piperazina-1-etano sulfónico

HIM = Microscopía de Iones Helio

HLA= Antígeno Leucocitario Humano

HOPG = Grafito pirolítico altamente ordenado

HPLC-MS = Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas.

IA = Índice de Agregación
 IDP = proteína Intrínsecamente desordenada
 IFN- γ = Interferón Gama
 IgA= Inmunoglobulina A
 IgG = Inmunoglobulina G
 IL-15 = Interleuquina 15
 IL-18 = Interleuquina 18
 IL-1 α = Interleuquina 1 α
 IL-1 β = Interleuquina 1 β

J, K, L, M, N:

K_D = Constante de Disociación
 KDa = Kilo Dalton
 ME = Microscopia electrónica
 MYD88 = Gen de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88
 NaCl = Cloruro de Sodio
 NaOH = Hidróxido de Sodio

O, P, Q, R, S:

P = Prolina
 Phe = fenilalanina
 pI = Punto Isoeléctrico
 PPII = Poliprolina II
 q = Vector de dispersión
 r = Anisotropía
 RMN = Resonancia Magnética Nuclear
 rpm = revoluciones por minuto
 SAXS = Dispersión de rayos X de bajo ángulo
 SDS-PAGE = Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
 SEM = Microscopia electrónica e Barrido
 SiO₂ = Dióxido de Silicio
 STEM: = Microscopia electrónica de transmisión-barrido

T, U, V, W, X, Y Z:

TCSPP = Tiempo de Correlación mediante Conteo de un Solo Fotón
 TEM = Microscopia electrónica de transmisión
 TFA = Ácido Trifluoro acético

TGI = Tracto gastrointestinal

TNF- α = Factor de Necrosis Tumoral α

TRIF = Dominio TIR-que contiene el adaptador induciendo interferón- β

Trp = Triptófano

Tyr = Tirosina

UV-Vis = Espectroscopia Ultravioleta-visible

Índice

Resumen	i
Abstract	ii
Capítulo I: Introducción General	1
1.1. Gluten y sus patologías asociadas	2
1.2. Aminoácidos, polipéptidos y proteína.....	8
1.3. Estructura jerárquica de las proteínas.....	12
1.3.1. Estructura primaria.....	13
1.3.2. Estructura secundaria	14
1.3.2. a. Alfa-hélice	14
1.3.2. b. Láminas Beta.....	16
1.3.2. c. Poliprolina	17
1.3.2. d. Estructura del tipo aleatoria o desordenada.....	19
1.3.4. Estructura terciaria	20
1.3.5. Estructura cuaternaria:.....	22
1.4. Gluten y sus proteínas.	24
1.4.1. Gluteninas:	25
1.4.2. Gliadinas	25
1.4.3. Gliadina y el péptido 33-mer.Rol central en el desarrollo de las patologías relacionadas con el gluten.....	28
Capítulo II: Hipótesis y Objetivos	38
2.1 .Objetivos Generales	39
2.2. Objetivos particulares.....	39
Capítulo III: Resultados y Discusión del Sistema Gliadina	40
3.1. Introducción.	41
3.2. Caracterización de los sistemas de gliadina a pH 3 y 7.0, 10 mM NaCl por Espectroscopia UV-Visible, SDS PAGE, Fluorescencia intrínseca del aminoácido triptófano y Potencial Z	42
3.3. Evaluación de la morfología, estructura secundaria de los sistemas auto-organizado de gliadina a pH 3.0 y 7.0.....	50
3.3.1. Microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM)	50
3.3.2. Dicroísmo Circular (DC).....	55
3.4. Predicción de propiedades estructurales de la gliadina a través de métodos Bioinformáticos.....	56
3.4.1. Predicción de la existencia de regiones hidrofóbicas y regiones accesibles al solvente.	59
3.4.2 .Predicción de estructura de gliadina seleccionadas mediante el software I-TASSER.....	62
3.4.3 .Predicción de regiones con propensión a agregarse	66
3.4.4. Predicción de cortes por enzimas	68
3.5. Evaluación de la características de los sistemas organizados de gliadina pH 3.0 y 7.0 utilizando la sonda fluorescente Rojo Nilo.	70

Capítulo IV: Resultados y Discusion del Estudio del péptido 33-mer de la proteína α-2 Gliadina	77
Sección I: Elucidación de la Estructura Secundaria del péptido 33-mer y su capacidad de auto-organizarse	78
4.1.1. Introducción	78
4.1.2. Evaluación del 33-mer mediante espectroscopia UV-Visible	78
4.1.3. Estudio de la estructura secundaria del péptido 33-mer en solución mediante Dicroísmo Circular	79
4.1.4. Estudio del péptido 33-mer mediante técnicas bioinformáticas y de modelado molecular	84
4.1.5. Visualización de los oligómeros de 33-mer por Microscopia Electrónica en agua y en buffer	86
4.1.5.1. Morfología del péptido 33 mer en agua a pH 7.0	86
4.1.5.2. Morfología del péptido 33 mer en Buffer (1 mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15 mM NaCl a pH 7.0)	91
Sección II: Caracterización de los oligómeros del péptido 33-mer	94
4.2.1. Introducción	94
4.2.2 Evaluación del 33-mer en solución mediante DLS- Correlación 3D	94
4.2.3. Evaluación de la estructura secundaria de los oligómeros del péptido 33-mer a través ATR-FTIR	100
4.2.4. Evaluación de los oligómeros de 33-mer mediante fluorescencia intrínseca del aminoácido Tirosina	104
4.2.4.1. Determinación de la anisotropía del péptido 33-mer	105
4.2.4.2. Tiempo de vida del péptido 33-mer	108
4.2.4.3. Evaluación de los decaimientos de anisotropía del 33-mer	114
Sección III: Elucidación del mecanismo de auto-organización del péptido 33-mer en la interfase aire/mica mediante Microscopía de Fuerza Atómica	118
4.3.1. Introducción	118
4.3.2. Caracterización de los oligómeros de 33-mer a 6 μ M	120
4.3.3. Caracterización de los oligómeros de 33-mer 60 μ m	122
4.3.4. Caracterización de los oligómeros de 33-mer a 250 μ M	125
4.3.5. Caracterización de los oligómeros de 33-mer a 610 μ M	127
4.3.6. Caracterización de los oligómeros de 33-mer en buffer HEPES	130
Sección IV: Elucidación de la auto-organización del péptido 33-mer en interfases hidrofóbicas	134
4.4.1. Introducción	134
4.4.2 Evaluación de la auto-agregación del péptido 33-mer sobre HOPG	135
4.4.2.1. Propiedades del HOPG	135
4.4.2.2. Evaluación de los oligómeros del péptido 33-mer sobre HOPG	136
4.4.3. Evaluación de los oligómeros del péptido 33-mer sobre dióxido de silicio en función de la concentración	140
4.4.3.1. Propiedades del dióxido de silicio y preparación de las muestras	140
4.4.3.2. Estudio del 33-mer en la concentración 80 μ M	142
4.4.3.3 Estudio del péptido 33-mer a la concentración 200 μ M	147

4.4.3.4. Evaluación del péptido 33-mer a la concentración 613 μM . Preparación de la muestra mediante secado a temperatura ambiente.	153
4.4.3.5. Evaluación del péptido 33-mer en presencia de un buffer salino a pH 7.0.	155
4.4.3.6. Evaluación de la agregación del péptido 33-mer cuando este es sometido a un estrés mecánico... 157	
4.4.3.7. Congelado y secado del péptido 33-mer a 613 μM	158
Capítulo V: Conclusiones	168
Conclusiones del Capítulo III	169
Conclusiones del Capítulo IV	172
Capítulo VI: Materiales y Métodos.	178
6.1. Materiales y Métodos del Capítulo III	179
6.1.1. Preparación de las muestras.	179
6.1.2. Espectroscopia UV-Visible.....	179
6.1.3. SDS-PAGE.....	180
6.1.4. Determinación del Potencial Z.....	180
6.1.5. Microscopías electrónicas	180
6.1.6. Análisis fractal	181
6.1.7. Dicroísmo Circular.....	181
6.1.8. Estudio Bioinformático de la gliadina.....	182
6.1.9. Espectroscopia de fluorescencia de estado estacionario	182
6.1.10. Evaluación de la interacción del colorante Rojo Nilo.....	182
6.1.11. Liberación de la sonda Rojo Nilo.....	183
6.2. Materiales y Métodos del Capítulo IV	184
6.2.1. Sección I: Elucidación de la Estructura Secundaria del péptido 33-mer y su capacidad de auto-organizarse	184
6.2.1.1. Espectroscopía UV-Visible	184
6.2.1.2. Dicroísmo Circular.....	185
6.2.1.3. Estudio Bioinformático del péptido 33-mer. Evaluación del péptido mediante dinámica molecular y determinación de la distribución de cargas parciales	185
6.2.1.4. Microscopía Electrónica.....	186
6.2.2. Sección II: Caracterización de los oligómeros del péptido 33-mer	187
6.2.2.1. DLS-Correlación 3D	187
6.2.2.2. Espectroscopia de infrarrojo (ATR-FTIR).....	189
6.2.2.3. Fluorescencia Intrínseca.....	190
6.2.2.3.a. Anisotropía de estado estacionario.....	190
6.2.2.3.b. Fluorescencia resulta en el tiempo	190
6.2.3. Sección III: Elucidación del mecanismo de auto-organización del péptido 33-mer en la interfase aire/mica mediante Microscopía de Fuerza Atómica	191
6.2.3.1. Microscopía de fuerza Atómica	191

6.2.4. Sección IV: Elucidación de la auto-organización del péptido 33-mer en interfaces hidrofóbicas	192
6.2.4.1. Preparación de las muestras	193
6.2.4.2. Microscopía de Fuerza atómica.....	194
6.2.4.3. Microscopías electrónica.....	194
6.2.4.4. Microscopio de iones Helio.....	195
Apéndice	196

Capítulo I:

Introducción

1.1. Gluten y sus patologías asociadas:

Desde los organismos más simples como las bacterias a los más complejos como el hombre, las células que los constituyen se encuentran conformadas por los mismos tipos de macromoléculas como ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y proteínas auto-organizadas. En particular, las proteínas poseen actividades muy diversas en las células tales como la actina y el colágeno cuya función es la de sostén. También algunas de ellas catalizan reacciones como las enzimas, entre las cuales se encuentran la DNA polimerasa, que actúa en la replicación del DNA y la 1-hexoquinasa, que cataliza la fosforilación de la glucosa en la primera etapa de la glucólisis. Otras proteínas como los anticuerpos, tienen función protectora frente a agentes externos mientras que las hormonas y factores de transcripción actúan en las vías de señalización inter- e intracelulares.¹ Para que estas moléculas cumplan su función, su disposición espacial específica o plegamiento, debe ser el adecuado. El plegamiento proteico inadecuado puede conducir a una pérdida de la actividad proteica y en ciertos casos generar la formación de **agregados proteicos, los cuales no pueden ser procesados por la célula**. Los errores en el plegamiento en proteínas endógenas, pueden llevar al desarrollo de patologías, tal como sucede en las enfermedades de Alzheimer², Parkinson³, amiloidosis sistémica⁴ y cáncer.⁵ En estas enfermedades además, se observa una respuesta inmune exacerbada contra las células afectadas, incrementando el daño en los tejidos afectados.⁶

Se ha demostrado también, que ciertas proteínas que ingresan al organismo, como los priones, son capaces de actuar como proteínas infectivas, afectando el correcto plegamiento de proteínas

¹ F. Geneser, 'Introducción', *Histología* (Editorial Panamericana., 2000).

² S. Sadigh-Eteghad et al, 'Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease' (2015) 24(1) *Med Princ Pract* 1.

³ L. Breydo, J. W. Wu y V. N. Uversky, 'Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease' (2012) 1822(2) *Biochim Biophys Acta* 261.

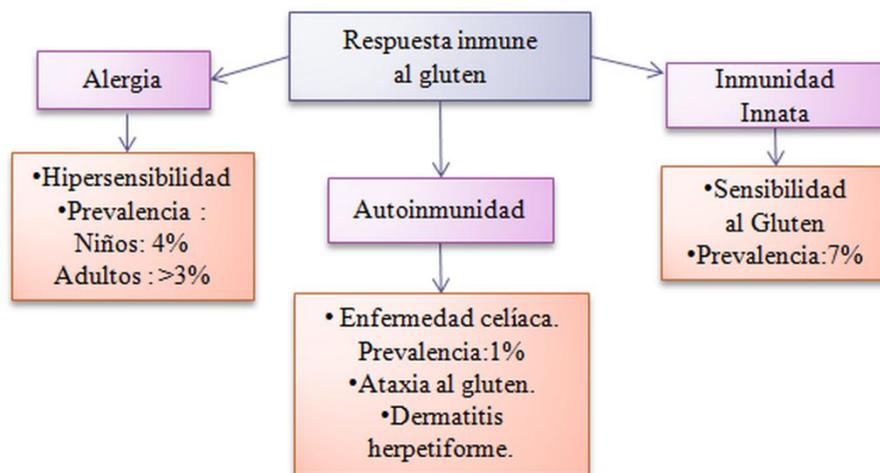
⁴ L. M. Blancas-Mejia y M. Ramirez-Alvarado, 'Systemic amyloidoses' (2013) 82 *Annu Rev Biochem* 745.

⁵ L. P. Rangel et al, 'The aggregation of mutant p53 produces prion-like properties in cancer' (2014) 8(1) *Prion* 75.

⁶ L. G Apostolova y J. L Cummings, 'The Pathogenesis of Alzheimer's Disease: General Overview' in Vladimir N Uversky and Anthony L Fink (eds), *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases* (Springer US, 2007) vol 6, 3-29.

endógenas y conduciendo al desarrollo de patologías conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles⁷ tales como la enfermedad Creutzfeldt-Jakob y encefalopatía espongiforme bovina.^{8,9}

Por otro lado, existen ciertas proteínas que se encuentran en el ambiente y especialmente en los alimentos, que normalmente no son tóxicas para un elevado porcentaje de la población, pero que pueden inducir al desarrollo de una enfermedad en ciertos individuos. Entre estas moléculas se encuentra el gluten, un complejo compuesto por las proteínas gliadina y glutenina, presente en harinas de trigo, cebada, centeno y avena. Se sabe que la proteína gliadina es capaz de inducir respuesta inmunológica inadecuada en ciertos individuos susceptibles.¹⁰ Dicha respuesta se puede clasificar en tres categorías, tal como se presenta en el Esquema 1.



Esquema 1. Espectro de patologías relacionadas con el Gluten (extraído de. *Sapone et al. BMC Medicine* **2012**, 10:13)

La **alergia** es una respuesta inmune inadecuada de ciertos individuos, los cuales presentan una reactividad inmunológica especial a componentes que se encuentran normalmente en el ambiente y alimentos, que se conocen como **alargenos**. Estos compuestos inducen al sistema inmune, en

⁷ J. R. Silveira et al, 'The most infectious prion protein particles' (2005) 437(7056) *Nature* 257.

⁸M. Beekes et al, 'Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method' (1995) 76 (Pt 10) *J Gen Virol* 2567.

⁹ E. D. Belay, 'Transmissible spongiform encephalopathies in humans' (1999) 53 *Annu Rev Microbiol* 283.

¹⁰ A. Fasano et al, 'Nonceliac gluten sensitivity' (2015) 148(6) *Gastroenterology* 1195.

particular, las células productoras de anticuerpos, a que expresen un tipo específico de estos, conocido como Inmunoglobulina E (IgE). Este es capaz de interactuar con el alérgeno específico que le dio origen, en una próxima exposición. Cuando esto ocurre, además de interactuar con este compuesto, las IgEs se unen a receptores específicos ubicados en la membrana de células del sistema inmune conocidas como mastocitos y basófilos. Esta interacción produce que estas células reaccionen liberando mediadores químicos que llevan a la producción de una respuesta inflamatoria característica conocida como **hipersensibilidad**. El gluten es un alérgeno capaz de producir síntomas como rinitis, el asma del panadero, dermatitis alérgica.^{11, 12} Las primeras dos patologías se caracterizan porque los individuos poseen sintomatología respiratoria patognomónica, producida por la exposición al gluten en el ambiente. La segunda patología se caracteriza porque luego de la ingestión de gluten se produce una manifestación dérmica, con enrojecimiento y picazón y en ciertos casos anafilaxia (una reacción inmune que afecta a varios sistemas: respiratorio, vascular y cardíaco y que puede comprometer la vida del paciente).¹¹ Se ha reconocido que entre las numerosas proteínas involucradas, la ω -5 gliadina¹³ y la secuencia peptídica Glutamina-Glutamina-Glutamina-Prolina-Prolina, son responsables de la alergia al gluten.

Las **enfermedades autoinmunes** relacionadas con la ingesta de gluten se pueden clasificar en tres grandes grupos:

1. Dermatitis herpetiforme: Es una entidad clínica en la cual se observa un picazón cutáneo intenso, con la aparición de depósitos de Inmunoglobulinas A en la piel y formación de lesiones cutáneas características. Se ha identificado la existencia de auto-anticuerpos frente a la proteína transglutaminasa 3 (anti-TG3, enzima que permite la formación de enlaces covalentes entre

¹¹ S. Tanabe, 'Analysis of food allergen structures and development of foods for allergic patients' (2008) 72(3) *Biosci Biotechnol Biochem* 649.

¹² S. Tanabe et al, 'A Major Wheat Allergen Has a Gln-Gln-Gln-Pro-Pro Motif Identified as an IgE-Binding Epitope' (1996) 219(2) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290.

¹³ M. Pietzak, 'Celiac disease, wheat allergy, and gluten sensitivity: when gluten free is not a fad' (2012) 36(1 Suppl) *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 68S.

moléculas proteicas), que estarían implicados en el desarrollo de esta patología. Muchos pacientes que poseen la enfermedad celíaca a su vez, sufren de esta patología.¹⁴

2. Ataxia: es una enfermedad autoinmune, en la cual el consumo de gluten produce una pérdida de la coordinación motora de las extremidades, dedos y de los movimientos oculares y de deglución. En estos pacientes, se observan anticuerpos contra la proteína gliadina y una reactividad cruzada entre las proteínas del gluten y moléculas presentes en las células de Purkinje (células del cerebelo). Además se observa un daño neurológico provocado por la deposición de anticuerpos anti-transglutaminasa en los vasos de tejidos del sistema nervioso.

3. Enfermedad celíaca: esta patología es la más conocida de los desórdenes relacionados con el gluten, afectando a 1-3 % de la población mundial y esta prevalencia se incrementa a un 10% en individuos que poseen un familiar con la enfermedad.¹⁵ Por otro lado, en estas últimas décadas se ha observado un incremento de la detección de esta patología en niños mayores de 2 años.¹⁶ Fue descrita por primera vez en el año 250 AD por Aretaeus de Cappadocia. Sin embargo no fue hasta el Siglo XVII que Baillie y especialmente Gee, reconocieron y describieron ampliamente esta patología. Más adelante, luego de la Segunda Guerra mundial, fue identificado al gluten como el componente proteico desencadenante de esta enfermedad, pudiéndose corroborar el daño en la mucosa intestinal, especialmente en niños.¹⁷

La **enfermedad celiaca** es una enteropatía, en la cual existe un daño crónico de la mucosa intestinal debido a una respuesta autoinmune frente a la gliadina y se genera en ciertos individuos genéticamente susceptibles. Se ha reconocido que un 95% de los pacientes, poseen el complejo mayor de Histocompatibilidad de clase II (MCH II), conocido en Humanos como Antígeno Leucocitario Humano (HLA), del tipo DQ2 y DQ8. Se ha demostrado que aproximadamente el 90%

¹⁴ A. Sapone et al, 'Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification' (2012) 10 *BMC Med* 13.

¹⁵ S. L. Vriezinga et al, 'Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease' (2014) 371(14) *N Engl J Med* 1304.

¹⁶ F. Zingone et al, 'Socioeconomic variation in the incidence of childhood coeliac disease in the UK' (2015) 100(5) *Arch Dis Child* 466.

¹⁷ A. Fasano, 'Surprises from celiac disease' (2009) 301(2) *Sci Am* 54.

de los pacientes poseen en genotipo DQ-2, mientras que el 5-10% el DQ8 y aproximadamente el 8% ambos genes.¹⁸ Sin embargo estas moléculas también se encuentran presentes en el 30% de los individuos sanos.¹⁹ No obstante, existen pacientes que no poseen estos complejos y que padecen la enfermedad, por lo que factores ambientales tales como la biota del intestino, alimentos, medicamentos, estrés y otros genes podrían influir en el desarrollo de esta patología.^{20, 21, 22} Por esta razón, en la última década se ha comenzado a hacer estudios genómicos amplios de asociación (GWAS), que ha permitido identificar otros genes no HLA involucrados en la enfermedad, los cuales tienen una influencia menor en el desarrollo de esta pero pueden influir en la presentación de la misma.²³

La manifestación de la enfermedad celiaca está relacionada normalmente con síntomas intestinales, tales como diarrea, distensión abdominal, pérdida de peso sin embargo existen además síntomas extra-intestinales como anemia, osteoporosis y desórdenes neurológicos. También, existen pacientes asintomáticos, que descubren este padecimiento a través de un examen inmunológico. Normalmente se observa la existencia de un daño intestinal con infiltrado de linfocitos en el intestino, atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas, junto con títulos altos de auto-anticuerpos específicos (Anticuerpos anti-transglutaminasa, anti-gliadina y anti-endomisio). La correcta identificación de esta enfermedad es prioritaria, ya que permite evitar secuelas crónicas como linfoma e infertilidad. Su diagnóstico se lleva a cabo cumpliendo cuatro de los siguientes criterios:

¹⁸ F. Megiorni y A. Pizzuti, 'HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing' (2012) 19 *J Biomed Sci* 88.

¹⁹ M. M. Pietzak et al, 'Stratifying risk for celiac disease in a large at-risk United States population by using HLA alleles' (2009) 7(9) *Clin Gastroenterol Hepatol* 966.

²⁰ Ø Molberg et al, 'Gliadin Specific, HLA DQ2-Restricted T Cells are Commonly Found in Small Intestinal Biopsies from Coeliac Disease Patients, but not from Controls' (Pt Blackwell Science Ltd) (1997) 46(3) *Scandinavian Journal of Immunology* 103.

²¹ K. E. Lundin et al, 'Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients', (Pt The Rockefeller University Press) (1993) 178(1) *The Journal of Experimental Medicine* 187.

²² M. M. Castro-Antunes et al, 'Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil' (Pt Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) (2011) 66(2) *Clinics* 227.

²³ K. E. Lundin y L. M. Sollid, 'Advances in coeliac disease' (2014) 30(2) *Curr Opin Gastroenterol* 154.

1. Sintomatología característica de la enfermedad.
2. Detección de niveles elevados de auto-anticuerpos.
3. Biopsia presentando daños intestinales característicos.
4. Genotipos HLA-DQ2 y DQ8.
5. Respuesta favorable a la dieta libre de gluten.

Se ha observado que la respuesta inmune anormal que se produce en la patología celíaca, se encuentra asociada al desarrollo de auto-anticuerpos contra diferentes órganos. Entre las enfermedades autoinmunes asociadas a la enfermedad celíaca, se encuentran la Diabetes Mellitus tipo I, Tiroiditis, enfermedades hepáticas y neurológicas.²⁴

La **sensibilidad** al gluten^{10, 13} se describió por primera vez en 1980, pero recientemente fue aceptada. Se estima que su prevalencia es de 7% de la población mundial. Esta patología se caracteriza por presentar sintomatología intestinal similar a la enfermedad celíaca, tales como dolor, distensión e inadecuada movilidad intestinal. También se presentan manifestaciones extra-intestinales como migrañas, fatiga crónica, depresión y anemia. Sin embargo no posee los marcadores característicos de la enfermedad celiaca, como es la atrofia vellositaria, la hiperplasia críptica ni los anticuerpos específicos. Su diagnóstico se realiza por exclusión, en el cual el paciente observa mejorías luego de una dieta libre de gluten, habiendo descartado la enfermedad celíaca y alergia al gluten. Hoy en día se considera que esta patología podría generarse por una respuesta innata al gluten, con producción de células y marcadores diferentes al resto de las patologías relacionadas con el gluten.

El tratamiento de todas patologías relacionada con el gluten se basa en el mantenimiento de una dieta libre de este componente. Además hoy en día existe un amplio campo de investigación dedicado a encontrar nuevas alternativas, que disminuyan la inmunogenicidad de los productos de estos cereales y que eviten que las personas desencadenen una respuesta inmunológica, entre ellos

²⁴ K. E. Lundin y C. Wijmenga, 'Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening' (2015) 12(9) *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 507.

se destacan acetato de larazotidina y endopeptidasas.²² Estas moléculas no han presentado una adecuada eficacia o se encuentran en su fase experimental. Sin embargo, es importante destacar que existe un escaso conocimiento sobre las características estructurales de las moléculas involucradas en las enfermedades relacionadas con el consumo de gluten. Es por ello que en esta sección se destacarán aspectos estructurales relevantes de las proteínas en general y del gluten en particular.

1.2. Aminoácidos, polipéptidos y proteínas.

Las proteínas son macromoléculas que se comportan como polímeros, ya que están conformadas por la repetición de unidades estructurales, más pequeñas conocidas como aminoácidos. Los aminoácidos se encuentran constituidos por un grupo ácido y un grupo amino unido a un carbono central o alfa. Este carbono se une a un hidrógeno y además a una cadena lateral (representada generalmente con la letra R). En la naturaleza se presentan 20 aminoácidos.²⁵

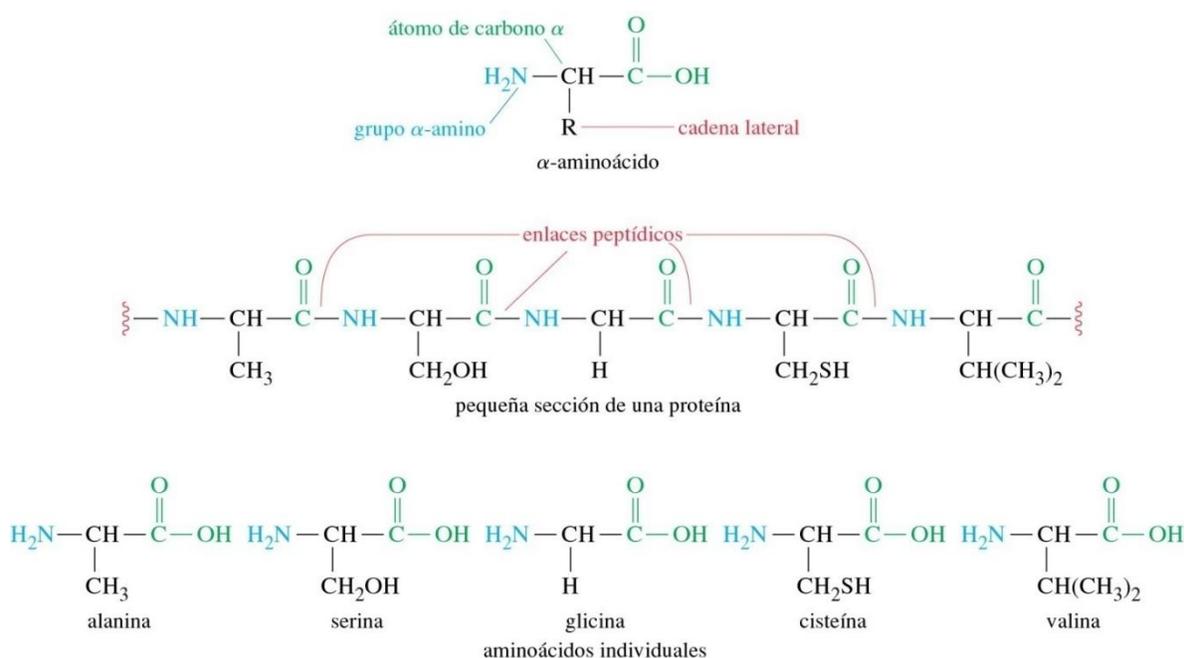


Figura 1. Representación esquemática de un aminoácido. En azul se encuentra el grupo amino, en verde el grupo ácido, en negro el carbono quiral o asimétrico y la letra R representa la cadena lateral, que varía entre cada aminoácido. También se representa un péptido de cinco residuos, generado mediante el enlace amida o peptídico y los aminoácidos que se unen para generar la cadena polipeptídica (Extraído de Wade, Química Orgánica, Quinta Edición).

²⁵ A. Blanco, *Química Biológica*, Panamericana, (2006).

Debido a que existen cuatro grupos unidos al carbono alfa, se genera un centro asimétrico, con actividad óptica. Es por eso que existen dos enantiómeros, conocidos como L, y D. En los mamíferos, solo se encuentran los aminoácidos con configuración L.

Teniendo en cuenta la polaridad y las características de los grupos funcionales presentes, los aminoácidos pueden ser divididos en cuatro grandes grupos, los cuales se presentan en la figura 2.

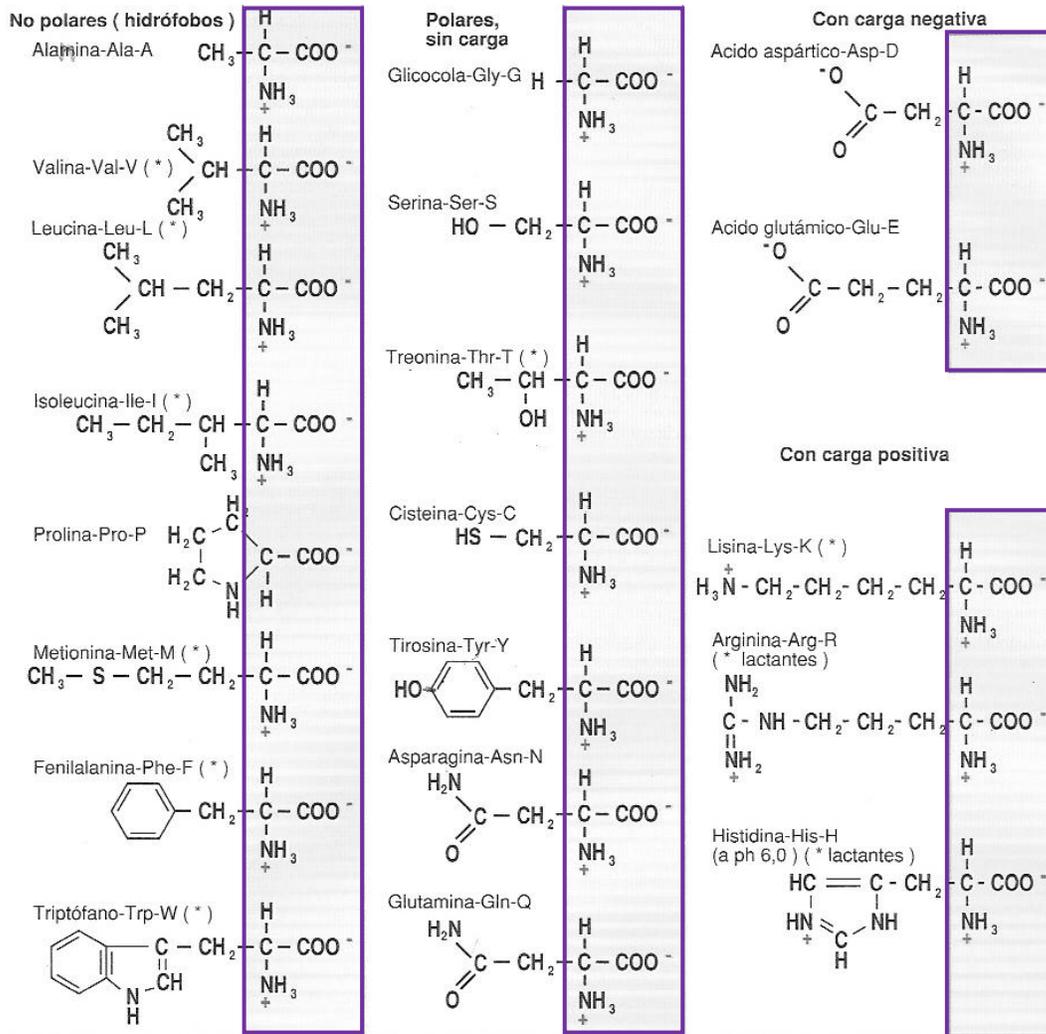


Figura 2. En esquema se presentan los 20 aminoácidos clasificados de acuerdo a las características de las cadenas laterales.

Teniendo en cuenta que en la estructura de los aminoácidos existe un grupo ácido y amino, la mayoría de los aminoácidos a pH neutro se encuentran en una forma de ión dipolar, con carga neta nula, conocido también como **ion zwitterion**.

Las células catalizan la formación de las proteínas, mediante un sistema complejo conocido como ribosoma. En este proceso, los aminoácidos se unen entre sí mediante un enlace amida que se produce entre los grupos ácido y los aminos de dos aminoácidos, con pérdida de una molécula de agua, constituyéndose de ese modo la **unión peptídica**. Este enlace posee dos estructuras resonantes, por lo que presenta un carácter de doble enlace parcial (Figura 3 A y B). Como consecuencia, la libre rotación del enlace C-N se encuentra restringida y los átomos unidos al carbono carbonílico y al nitrógeno, se encuentran en un mismo plano. Debido a estas características, el enlace peptídico puede presentar dos tipos de configuraciones, una configuración *trans*, donde los carbonos alfa asociados al enlace peptídico se encuentran opuestos al doble enlace o *cis*, que se encuentran del mismo lado. En las proteínas, la configuración *trans* se encuentra más favorecida debido a que los impedimentos estéricos son menores (Figura 3 C). Dentro de los veinte aminoácidos, la prolina posee características estructurales distintivas. La prolina es en realidad un iminoácido, ya que su cadena lateral es cíclica y está compuesta por 3 unidades de metileno; estos quedan unidos al carbono alfa y al grupo amino. Esta estructura, hace que este aminoácido tenga una capacidad restringida de rotación de sus enlaces simples. Esto genera una distorsión en la arquitectura de las cadenas polipeptídicas.

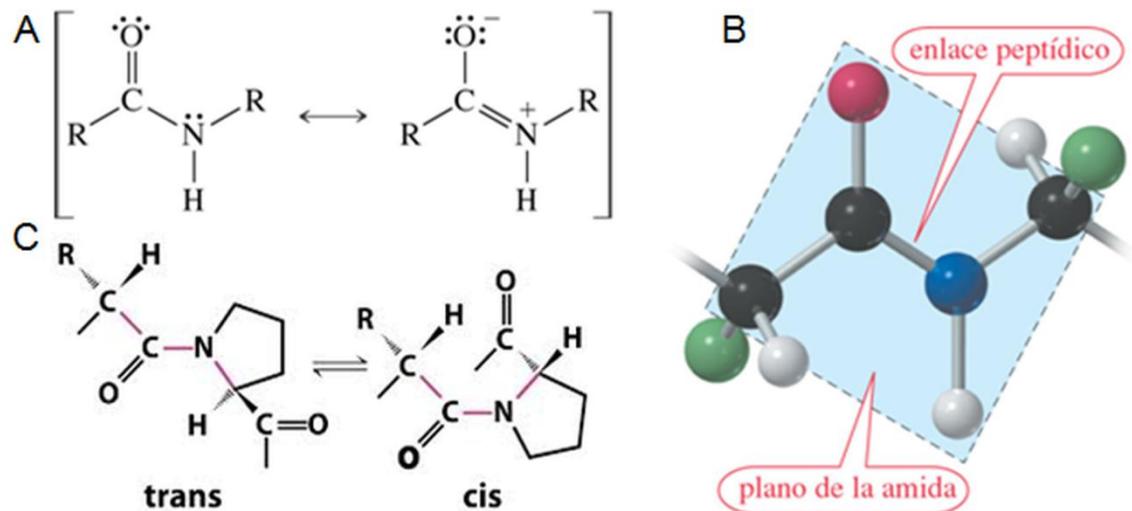


Figura 3 Representación del enlace amida. A) Estructuras resonantes de este enlace. B) Plano que este forma en la cadena polipeptídica. C) Esquema de la transición *cis-trans* de esta unión. (Extraído de Lehninger, Principio de Bioquímica, 4^{ta} Edición).

Por otro lado, el carbono alfa presenta enlaces sencillos, que permite la libre rotación de los enlaces adyacentes. Esto genera que los planos peptídicos adyacentes puedan rotar uno con respecto al otro. Los ángulos definidos entre estos enlaces simples se conocen como **ángulos diedros**. El ángulo definido entre el carbono alfa y el nitrógeno se lo conoce como *fi* (Φ), mientras que el definido entre el carbono alfa y carbonilo se conoce como *psi* (ψ). Además se encuentra un tercer ángulo, llamado *omega* (ω) el cual se define entre el carbono carbonílico y el nitrógeno. Generalmente este ángulo se caracteriza por poseer valores fijos de 0° o 180° , para las configuraciones *cis/trans* respectivamente. Los giros de estos ángulos definen la arquitectura de la cadena polipeptídica, ya que no todas las combinaciones angulares son posibles a causa de impedimentos estéricos. Los valores permitidos se grafican en un diagrama bidimensional conocido como **diagrama de Ramachandran**.²⁶

²⁶ J. M. Berg, L.; Tymoczko y L. Stryer J.L., *Bioquímica*. Reverté, 6ta ed, (2007).

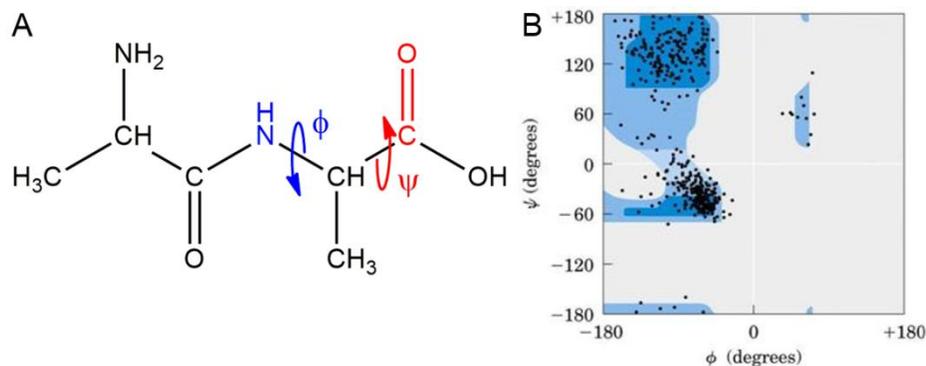


Figura 4. Rotación de los enlaces simples en una cadena peptídica. En A) se muestran los ángulos diedros alrededor del carbono alfa. En B) se presenta un diagrama de Ramachandran, las zonas azul oscuras responden a las combinaciones de ángulos más favorables, mientras que las regiones celestes corresponden a ángulos límites; los puntos representan esquemáticamente valores obtenidos para una proteína ejemplo.

La mayoría de las proteínas poseen entre 50 a 2000 residuos, con un peso molecular medio entre 5500 y 220000 Daltons (Da) (Un dalton equivale a una unidad de masa atómica). Sin embargo existen estructuras constituidas por un número menor de residuos y a estos se los denominan **oligopéptidos** o simplemente **péptidos**. Por convención, el extremo amino terminal o N-terminal se lo considera el comienzo de la cadena polipeptídica, mientras que el carboxilo terminal o el C-terminal, se lo considera el final. Debido a esto, a las proteínas se las nombran desde su extremo N-terminal al C-terminal.

Las cadenas polipeptídicas de los péptidos y las proteínas presentan polaridad de cargas, a pH neutro, el extremo amino libre, se encuentra cargado positivamente. Por otro lado, el extremo carboxilo, está cargado negativamente. A esta polaridad común a todas las estructuras, se le debe sumar la posibilidad de ionización que presentan algunas cadenas laterales de algunos residuos. Esto genera que algunas proteínas tengan regiones con distinta polaridad. Esta propiedad depende de la secuencia aminoacídica de cada proteína, la cual se encuentra determinada por el genoma.

1.3. Estructura jerárquica de las proteínas.

Los péptidos y proteínas no son moléculas rígidas y lineales, sino que tienden a plegarse, y generar estructuras tridimensionales cuando se exponen al medio celular. Este proceso está guiado

por fuerzas intermoleculares que favorecen un correcto plegamiento y la formación de una estructura tridimensional energéticamente más favorable, conocida como **conformación nativa**. Esta estructura es fundamental para la actividad de la proteína, su pérdida genera una molécula sin funcionalidad o bien que su función cambie.¹ Debido a la importancia de la secuencia aminoacídica y de la conformación tridimensional de las proteínas, se ha establecido un criterio jerárquico de organización de las mismas, constituido por las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

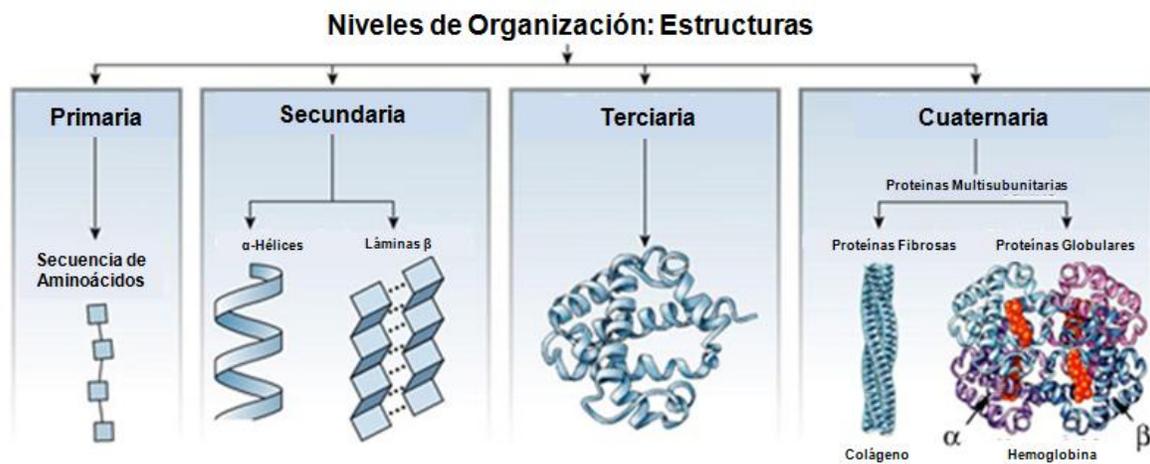


Figura 5. Representación jerárquica de las estructuras de las proteínas. Extraído de Alberts, Biología Molecular de la Célula, 5^{ta} Edición.

1.3.1. Estructura primaria:

La secuencia lineal de los residuos aminoacídicos que conforman a una proteína, se conoce como **estructura primaria**. La misma se encuentra definida por el enlace covalente establecido entre los aminoácidos, denominado como enlace peptídico. Esta estructura se encuentra codificada en la información genética contenida en el DNA de las células, que mediante los procesos de transcripción y transducción dan lugar a la formación de una proteína funcional.²⁶

La comparación de la secuencia de aminoácidos es una herramienta muy útil para poder predecir similitudes estructurales y funcionales de proteínas. Es así que proteínas que poseen secuencias similares en un alto porcentaje y han evolucionado de una misma secuencia de DNA (gen), se dice

que son **proteínas homólogas**. Se denominan **proteínas análogas**, cuando se asemejan secuencial y estructuralmente, pero estas no han evolucionado de un mismo gen común. Proteínas con la misma función en especies distintas pueden presentar sustituciones de un aminoácido por otro con propiedades similares. A esto se lo conoce como **sustitución conservada**, y se puede observar en proteínas como la insulina, donde existen estas variaciones entre especies, manteniendo la misma funcionalidad. Los aminoácidos que se encuentran siempre en la misma posición, y que no se modifican entre especies, se conocen como **residuos invariables**. Se denomina **sustitución no conservada**, cuando se produce un cambio por otro aminoácido de polaridad distinta, esto puede producir ningún cambio en la proteína, así como la pérdida o adquisición de una funcionalidad. Esto depende de la región de la proteína afectada. Un ejemplo de pérdida de funcionalidad, se observa en la anemia falciforme. En esta enfermedad se produce una sustitución de un ácido glutámico por una valina, en la hemoglobina. Esta proteína pierde su estructura funcional, polimerizando y generando una deformación en los glóbulos rojos haciendo que los mismos tengan una vida media en el torrente sanguíneo menor. ¹

1.3.2. Estructura secundaria:

La estructura secundaria es el arreglo espacial que presenta un segmento del esqueleto peptídico, en el cual no se considera la conformación que adquieren las cadenas laterales ni la relación de estas con otros segmentos de la proteína. Esta estructura se encuentra definida por la presencia de puentes de hidrógenos intracatenarios que se generan entre los grupos amino y carbonilo que participan en los enlaces peptídicos. Esto define un plegamiento tridimensional local de la cadena polipeptídica. Existen diversas estructuras secundarias, que se encuentran definidas por ángulos diedros Φ y ψ característicos, que se repiten en toda la estructura. A continuación se presentan los tipos más relevantes.

1.3.2. a. Alfa-hélice:

La alfa hélice es una estructura secundaria muy abundante, en la cual el esqueleto peptídico se dispone de, manera helicoidal. Cada giro o vuelta de hélice involucra a 3,6 aminoácidos, cuyas

cadena lateral se ubican hacia el exterior de la estructura. La estabilización de la estructura se encuentra determinada por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO. En particular el grupo CO forma un puente de hidrógeno con un grupo NH ubicado cuatro residuos más adelante en la cadena principal. Cada residuo se relaciona con el siguiente con un incremento del paso de la hélice de 1.5 Å, y un giro de 100°. El paso de hélice (p), definido como el producto entre el número de residuos aminoácidos por vuelta y la distancia entre los carbonos, medida paralelamente al eje de la hélice, es de 5.4 Å. Los ángulos diedros característicos son $\Phi = -57$ y $\psi = -47$. Las alfa hélices pueden ser dextrógiras (con giro en sentido de las agujas del reloj) o levógiras (con un giro en el sentido contrario a las agujas del reloj). Sin embargo, mediante los diagramas de Ramachandran, se puede determinar que las hélices dextrógiras son más favorables desde el punto de vista energético, ya que existe menos impedimento estérico entre las cadenas laterales y el esqueleto. Una consideración importante es que las cadenas que presentan prolina en su estructura no pueden dar lugar a una hélice alfa.

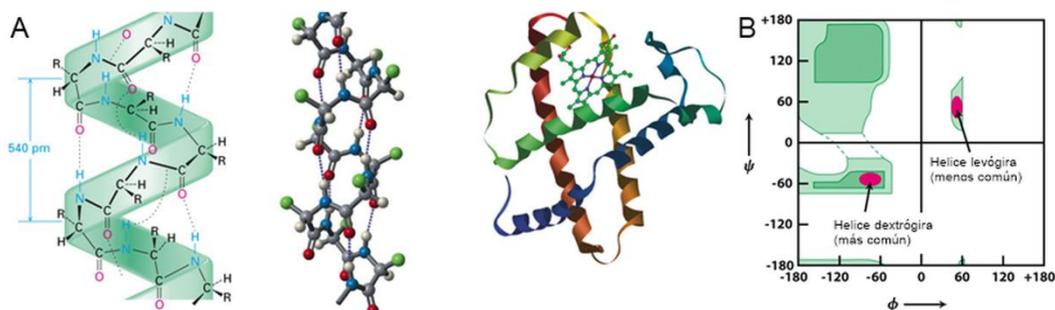


Figura 6. A) Representaciones esquemáticas de hélices alfa y de una proteína constituida mayoritariamente por este tipo estructura. B) Diagrama de Ramachandran presentando los ángulos diedros probables en esta conformación secundaria. (Extraído de Lehninger, Principios de Bioquímica, 5^{ta} y Styer, Bioquímica 5^{ta} Edición)

El porcentaje de alfa hélice en las proteínas puede ser muy variable, por ejemplo, la ferritina, proteína que almacena hierro, presenta un 75 % de su estructura en alfa hélice. Otras proteínas como la miosina y tropomiosina del músculo y la fibrina que compone los coágulos sanguíneos,

posee una estructura de 100 % alfa hélice.²⁷

1.3.2. b. Láminas Beta:

Las **cadena del tipo β** se caracterizan por estar formadas por 5-10 residuos, en la cual el esqueleto peptídico se dispone de manera extendida, con un ángulo de torsión $C\alpha-C-N$ de 120° . En esta estructura secundaria, las cadenas laterales se encuentran por encima y por debajo del plano definido por el esqueleto polipeptídico, de manera alternada. Generalmente estas cadenas del tipo beta se asocian, generando **láminas u hojas β** .

La lámina beta es una estructura secundaria muy abundante, que se caracteriza porque dos regiones de la cadena polipeptídica se disponen de manera lineal, paralelas o antiparalelas entre sí, interactuando mediante enlaces de puente hidrógeno. Las cadenas se ubican de manera más extendida, donde cada aminoácido ocupa una distancia de 3.5 Å. En la lámina beta paralela, cada aminoácido presenta su grupo NH formando un puente hidrógeno con el CO del aminoácido enfrente en la cadena adyacente, mientras que su grupo CO forma otro puente hidrógeno con un grupo NH, situado dos residuos más lejos en la cadena paralela. En las antiparalelas todos los puentes hidrógeno se producen entre residuos enfrentados entre las cadenas adyacentes. Las láminas paralelas poseen ángulos diedros de $\Phi = -119$ y $\psi = 113$, mientras que las antiparalelas $\Phi = -139$ y $\psi = 135$.

Las láminas beta esta formadas normalmente por 4 o 5 cadenas, pero a veces hasta 10 o más. Estas pueden ser totalmente paralelas o antiparalelas o combinaciones de estas. De manera esquemática, las hebras beta se representan con flechas, y la dirección de las puntas de estas indica que tipo de hoja forman.

Las láminas beta poseen una variabilidad estructural mayor que las hélices alfa, ya que pueden ser relativamente planas o presentar una estructura más plegada. Este motivo estructural se encuentra en una gran diversidad de proteínas, entre ellas proteínas que unen ácidos grasos²⁸ y los

²⁷ T.M. Devlin, *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Wiley, (2010).

²⁸ J. C. Sacchettini, J. I. Gordon y L. J. Banaszak, 'Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding

oligómeros y fibras de proteínas amiloidogénicas como la alfa-sinucleína^{29 30} y el péptido beta amiloide.³¹

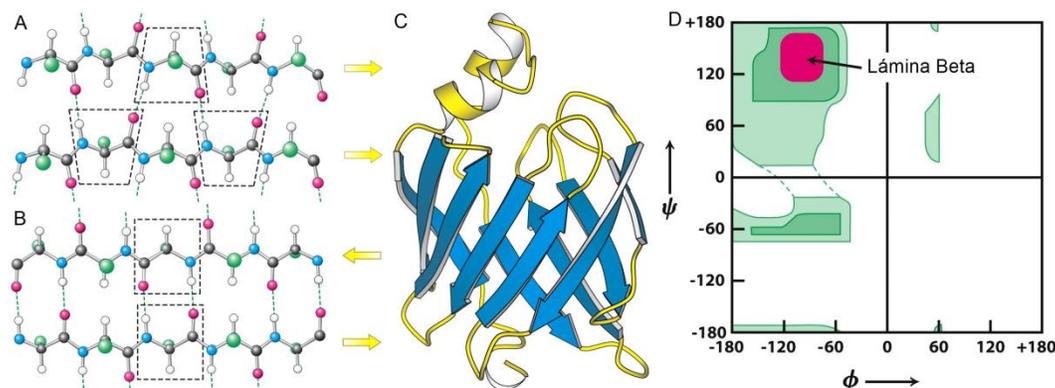


Figura 7. Representación esquemática de láminas beta: A) paralelas, B) Antiparalelas. C). Proteína que presenta un alto porcentaje de láminas beta. D) Diagrama de Ramachandran mostrando los ángulos diedros probable en estas estructuras. (Extraído de Stryer, Bioquímica, 5^{ta} Edición).

1.3.2. c. Poliprolina:

Este motivo estructural se encuentra en un alto porcentaje, luego de las estructuras de hélice alfa y lámina beta. Existe una elevada cantidad de motivos secuenciales capaces de adquirir esta estructura. Sin embargo se ha reconocido que aquellos con un alto contenido en prolina poseen una mayor capacidad de formar esta estructura secundaria.³² Como se comentó anteriormente, la prolina posee características especiales, ya que presenta en su estructura un ciclo pirrolidina por lo que el grupo NH no es capaz de formar puentes de hidrógeno. Además existen restricciones en la libre rotación de los enlaces simples, generando que el ángulo Φ sea cercano a -70° , mientras que ψ puede presentar una mayor variación. Esta variabilidad se encuentra asociada con la capacidad de este aminoácido de presentar transiciones *cis/trans* mucho más probables que en otros aminoácidos.

protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate' (1989) 208(2) *J Mol Biol* 327.

²⁹ M. S. Celej et al, 'Toxic prefibrillar alpha-synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel beta-sheet structure' (2012) 443(3) *Biochem J* 719.

³⁰ M. Vilar et al, 'The fold of alpha-synuclein fibrils' (2008) 105(25) *Proc Natl Acad Sci U S A* 8637.

³¹ E. Cerf et al, 'Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide' (2009) 421(3) *Biochem J* 415.

³² B. Bochicchio y A. M. Tamburro, 'Polyproline II structure in proteins: identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions' (2002) 14(10) *Chirality* 782.

Esto se debe a que ambos estados poseen energías similares, por lo que dicha conversión es energéticamente favorable. La combinación de impedimentos estéricos producidos por este grupo y la incapacidad de formar puentes de hidrógeno generan una distorsión en la estructura secundaria, que favorece la formación de este tipo de hélices. Existen dos tipos de estructurales de poliprolina:

- *Poliprolina I (PPI)*: Esta estructura secundaria se caracteriza por presentar 3.3 residuos por vuelta y todos los enlaces peptídicos se encuentran en *cis*, con ángulos diedros $\varphi = -75^\circ$ y $\psi = +160^\circ$. Esta estructura se encuentra favorecida en presencia de alcoholes alifáticos.
- *Poliprolina II (PPII)*: es una de las hélices más abundantes presentes en diversas proteínas, luego de las hélices alfa. Sin embargo, esta era confundida, hasta hace un tiempo atrás, con estructuras del tipo desordenadas.³² Se caracteriza por ser una hélice levógira con un paso de hélice de 3.20 Å y todos sus enlaces peptídicos se encuentran en *trans*: $\varphi = -75^\circ$, $\psi = +145^\circ$, $\omega = 180^\circ$. Esta estructura se encuentra favorecida en agua.

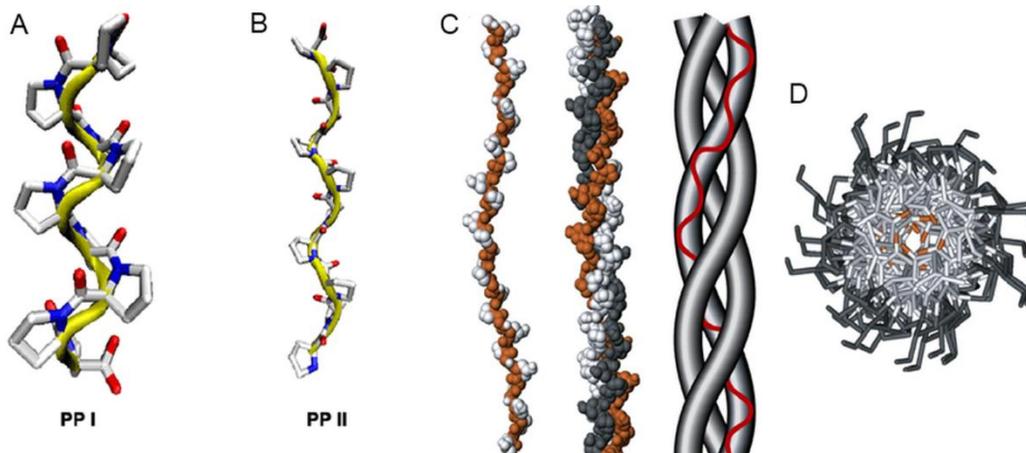


Figura 8. Representaciones esquemáticas de estructuras secundarias de Poliprolina. A) Poliprolina tipo I (PPI). B) Poliprolina tipo II (PPII). C) Organización jerárquica de hélices de colágeno, las cuales poseen estructura del tipo PPII. Estas se asocian para generar fibras de colágeno. D) Vista Superior de una fibra de colágeno.

Existen diversas proteínas que adoptan una estructura de PPII. Una de las más importantes es el colágeno, proteína estructural ampliamente distribuida en el tejido de mamíferos. Esta se encuentra formada por tres hélices de colágeno que se asocian mediante puentes hidrógeno.²⁶ También se ha

descrito la presencia de este motivo estructural en proteínas de diversos orígenes como la zeína³³, la proteína E7 del virus de papiloma Humano³⁴ y la alfa-sinucleína, proteína prion y las correspondientes a la familia Tau, estas dos últimas proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer respectivamente.^{35,36} Por otro lado, esta estructura se ha reconocido en participar en interacciones proteína-proteína involucradas en vías de señalización inter- e intracelular. Es así que proteínas con dominios SH3³⁷ y el complejo mayor de Histocompatibilidad de clase II, interactúan con péptidos que poseen esta estructura³⁸. Además, el motivo PPII ha sido reconocido como un estado presente en intermediarios conformacionales y procesos de desnaturalización.³⁹ Estos reportes ponen de manifiesto el rol protagónico del motivo PPII en vías de señalización fisiológicas pero también patológicas.

1.3.2. d. Estructura del tipo aleatoria o desordenada.

En algunas proteínas existen regiones en las cuales el esqueleto polipeptídico no es capaz de establecer interacciones que estabilicen una conformación espacial específica. Esto genera que la cadena polipeptídica se disponga al azar, por lo que se conoce a esta estructura como **aleatoria o desordenada**.

Diversos autores han intentado describir las características de este tipo de estructuras. *Tanford et al*⁴⁰ consideró que una estructura aleatoria en un polímero es aquella en la cual los enlaces simples

³³ M. J. Kogan et al, 'Supramolecular properties of the proline-rich gamma-Zein N-terminal domain' (2002) 83(2) *Biophys J* 1194.

³⁴ M. G. Noval et al, 'Conformational dissection of a viral intrinsically disordered domain involved in cellular transformation' (2013) 8(9) *PLoS One* e72760.

³⁵ C. D. Syme et al, 'A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins' (2002) 269(1) *Eur J Biochem* 148.

³⁶ A. C. Gill et al, 'Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure in vivo' (2000) 19(20) *EMBO J* 5324.

³⁷ X. Wu et al, 'Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk' (1995) 3(2) *Structure* 215.

³⁸ L. J. Stern et al, 'Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide' (1994) 368(6468) *Nature* 215.

³⁹ A. A. Adzhubei, M. J. Sternberg and A. A. Makarov, 'Polyproline-II helix in proteins: structure and function' (2013) 425(12) *J Mol Biol* 2100.

⁴⁰ C. Tanford, 'Protein Denaturation' in M. L. Anson John T. Edsall C.B. Anfinsen and M. Richards Frederic (eds), *Advances in Protein Chemistry* (Academic Press, 1968) vol Volume 23, 121-282.

pueden rotar libremente, tal como se produciría en una molécula pequeña. Sin embargo, esta rotación no es de manera aleatoria, ya que existen ángulos que son preferidos debido a la presencia de restricciones energéticas. Para *Shortle*,⁴¹ una estructura de este tipo, es un estado bien definido, en el cual no se producen interacciones entre las cadenas laterales. En esta estructura los ángulos Φ y ψ de un residuo, son independiente a la de otros residuos, por lo que no existen interacciones locales. Por otro lado, *Flory*⁴² ha presentado un modelo teórico que estudia a las proteínas que poseen este motivo estructural como polímeros. A través de ésta teoría, se puede predecir parámetros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de proteínas desestructuradas.

Diversas proteínas poseen regiones desestructuradas y se las denominan **Proteínas Intrínsecamente desordenadas (PIDs)**. Recientemente, se ha comenzado a destacar la importancia que poseen estas regiones desestructuradas en el normal funcionamiento de las proteínas y el desarrollo de patologías.⁴³

1.3.4. Estructura terciaria

La estructura terciaria de una proteína describe la conformación tridimensional que adopta la misma en el espacio. Esta se encuentra determinada por las *interacciones intermoleculares* que se producen entre las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos, tales como puentes de hidrógeno, enlaces disulfuro, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Existen proteínas en las que predomina un solo motivo de estructura secundaria. Estas proteínas se caracterizan por formar fibras, por lo que se las denomina **fibroproteínas**.²⁶

Otras proteínas presentan varios tipos de estructuras secundarias, las cuales se encuentran conectadas mediante regiones del tipo desordenadas. Estas cadenas polipeptídicas adoptan una estructura espacial compacta y redondeada y se las que denomina comúnmente como **globulares**.

⁴¹ D. Shortle, 'The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability' (1996) 10(1) *FASEB J* 27.

⁴² L. J. Smith et al, 'The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins' (1996) 1(5) *Fold Des* R95.

⁴³ G. W. Daughdrill et al, 'Natively Disordered Proteins', *Protein Folding Handbook*, 275-357, Wiley-VCH Verlag GmbH, (2008).

Debido a ello, estas presentan ciertas regiones con un plegamiento local más estructurado e independiente, al que se denomina **dominio**. Un dominio generalmente está constituido por aproximadamente 100-150 aminoácidos y poseen un centro hidrofóbico con una región exterior polar. Generalmente están asociados con alguna función especializada dentro del polipéptido, por lo que un incorrecto plegamiento tridimensional puede llevar a que una proteína pierda su funcionalidad. Sin embargo, en muchos casos es posible eliminar una parte de la molécula sin afectar la integridad y función de la cadena polipeptídica. También es posible trabajar con péptidos aislados provenientes de una proteína, los cuales en algunos casos pueden presentar la misma estructura secundaria que la proteína. De esta manera es posible estudiar diversos procesos, tales como el plegado e interacciones proteína-proteína a través de un sistema más sencillo.

La funcionalidad de una proteína no solo depende del adecuado plegado de la misma. Además de ello, es necesario que se produzca una correcta distribución de las cargas en dicha estructura. Por lo tanto, la electrostática y la geometría poseen un rol preponderante en la actividad biológica de una proteína. Para el estudio detallado de las propiedades electrostáticas y la interacción con el solvente, se aplican modelos matemáticos que resuelven la **ecuación de Poisson-Boltzmann**. A través de la resolución de la misma, es posible describir la distribución de aminoácidos polares y cargas en una proteína, que no son evidentes a través de la estructura primaria de la misma. Un ejemplo de esto ocurre en la proteína acetilcolinesterasa.⁴⁴ Esta proteína posee una región cargada negativamente en el borde del sitio activo, que no es evidente en la representación espacial de la misma. Este patrón observado se debe a la profundidad del sitio activo, que genera una discontinuidad en la constante dieléctrica. Esta propiedad permite que la enzima pueda unir a su sustrato y así llevar a cabo su actividad. Por otro lado, regiones neutras también tienen una elevada importancia en el adecuado funcionamiento de ciertas proteínas. Es así que la proteínas Src-SH2, posee una región central hidrofóbica que corresponde a su sitio activo, flanqueada por otra zona de

⁴⁴ J. L. Sussman et al, 'Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein' (1991) 253(5022) *Science* 872.

cargas positivas, que permite la unión a su ligando.⁴⁵ Por lo tanto, en el estudio de la estructura y funcionalidad de una proteína, es de fundamental relevancia el conocimiento de la disposición espacial de las cadenas peptídicas y de las propiedades electrostáticas que esta estructura tridimensional posee.⁴⁶

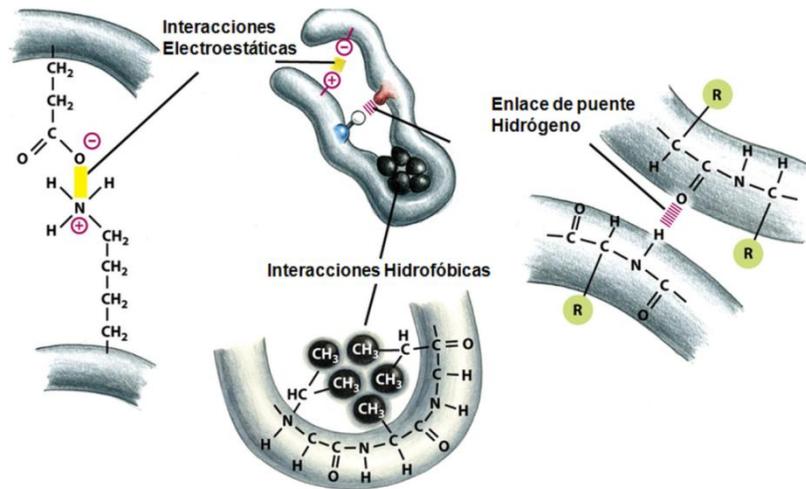


Figura 9. Esquema representando algunas de las interacciones relevantes en la determinación de la estructura tridimensional de una proteína.

1.3.5. Estructura cuaternaria:

La estructura cuaternaria de una proteína se genera cuando existen varias cadenas polipeptídicas que se pliegan en conjunto para dar lugar a la formación de una proteína. Cada cadena peptídica se la denomina como **subunidad**, y a la proteína se la considera como proteína **multi-subunitaria** (varias subunidades). En esta estructura se considera el arreglo espacial de cada subunidad y el ensamblado e interacciones que se producen entre cada subunidad sin importar la geometría interna de cada componente. Generalmente la asociación de dichas cadenas, se produce a través de enlaces no covalentes en una conformación específica que es requerida para el funcionamiento de la proteína. Las cadenas que componen a la proteína pueden ser iguales (homo -multímeros) o

⁴⁵ G. Waksman et al, 'Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms' (1993) 72(5) *Cell* 779.

⁴⁶ B. Honig y A. Nicholls, 'Classical electrostatics in biology and chemistry' (1995) 268(5214) *Science* 1144.

distintas (hetero-multímeros), dependiendo de la proteína. Ejemplos de estas proteínas son la hemoglobina, polimerasas y canales iónicos.²⁶

La estructura cuaternaria es dinámica, ya que la funcionalidad de la proteína generalmente está asociada a cambios conformacionales de una de las regiones de una subunidad, produciendo luego una variación en las demás cadenas. En muchos casos, la funcionalidad de las proteínas se encuentra determinada con la interacción de estas con moléculas de bajo peso molecular, denominadas **ligandos**. Un ejemplo es la hemoglobina, la cual se une al oxígeno se produce a través de un proceso de interacción de carácter **cooperativo**. Esto se produce debido a que la interacción de una de las cadenas con el oxígeno, incrementa la afinidad del resto. En este caso, el proceso ocurre a través de un mecanismo cooperativo positivo, ya que incrementa la afinidad de esta proteína a su ligando.^{12, 26, 24} Otros ligandos pueden actuar generando una disminución de la actividad de la proteína a través de un mecanismo cooperativo negativo. Esto se ha observado en la enzima 3'-5'-adenosin monofosfato-cíclico fosfodiesterasa, que presenta este efecto al unirse al AMP cíclico. En este caso se observa un cambio conformacional inducido por la unión de una segunda molécula de adenosin monofosfato cíclico a la proteína, conduciendo a la disminución en la actividad catalítica de esta enzima.⁴⁷

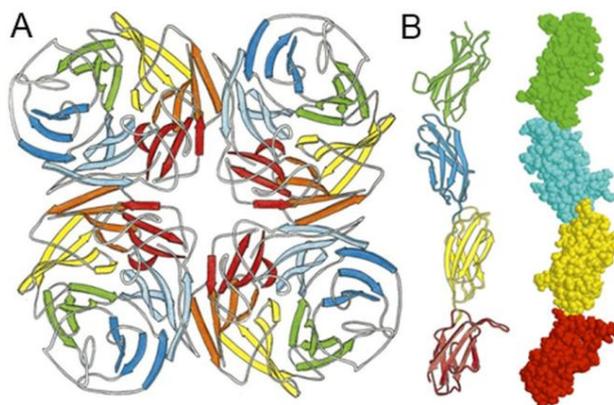


Figura 10. A) Representación estructural de la proteína neuraminidasa, proteína viral relacionada con la infectividad del virus de la gripe. La misma consiste en cuatro proteínas que se asocian para generar la enzima

⁴⁷ N. Popovych et al, 'Dynamically driven protein allostery' (2006) 13(9) *Nat Struct Mol Biol* 831.

funcional. B) Esquema tridimensional de la proteína fibronectina, componente de la matriz extracelular. (Extraído de Alberts, Biología Molecular de la Célula, 5^a Edición).

1.4. Gluten y sus proteínas.

El gluten es aquel componente que le da las características de elasticidad, viscosidad, cohesividad y la capacidad de absorber agua a la masa panaria obtenida a partir de harinas de trigo, avena, centeno y cebada. Se aísla luego de realizar un lavado de la harina, con el objetivo de eliminar los gránulos de almidón. Está constituido por lípidos, proteínas y algunos carbohidratos, sin embargo las proteínas son los componentes principales y las responsables de sus propiedades. Se ha determinado que el consumo promedio de gluten diario en la población mundial es de 50 g al día.¹⁴

A las proteínas que constituyen el gluten proveniente de la harina de trigo se lo divide en cuatro clases de acuerdo a su solubilidad de acuerdo a *Osborne*⁴⁸ en:

1. Albuminas: solubles en agua y soluciones salinas diluidas.
2. Globulinas: solubles en soluciones salinas de concentración moderada.
3. Gliadinas: solubles en soluciones acuosas de alcoholes.
4. Gluteninas: solubles en bases y ácidos diluidos, detergentes, agentes disociantes y reductores.

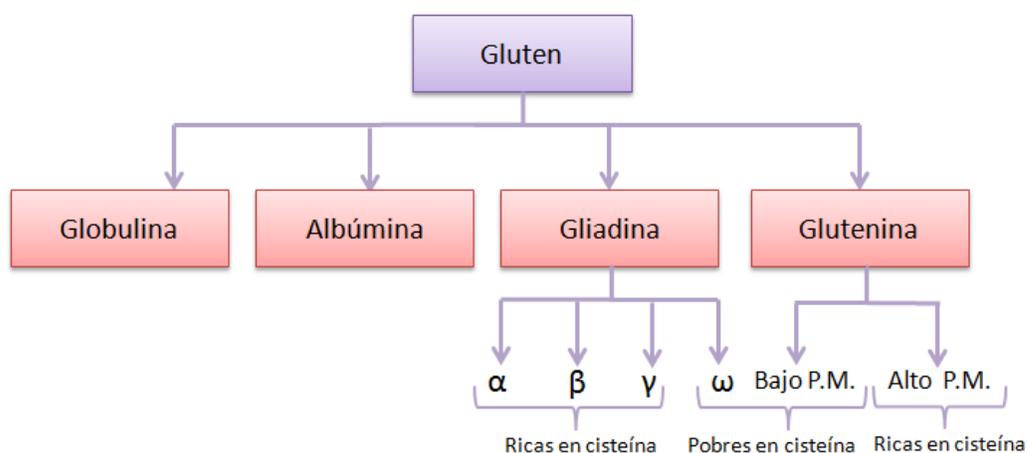


Figura 11. Esquema representando las diferentes fracciones del gluten. (Extraído y adaptado de Shewry, P. R,

⁴⁸ T. Osborne, 'The proteins of the wheat kernel' (1907), Washington, D.C. :Carnegie Institution of Washington

et al, The Classification and Nomenclature of Wheat Gluten Proteins: A Reassessment., Journal of Cereal Science, 1986.)

De estos cuatro grupos, las gliadinas y gluteninas son conocidas como prolaminas, debido a su alto contenido de aminoácidos prolina y glutamina.⁴⁹ Estas actúan como fuente de aminoácidos en los granos de estos cereales, durante el proceso de germinación y se sintetizan en el retículo. Son almacenadas en los denominados cuerpos de inclusión.^{50 51} De ambas proteínas, se ha reconocido a la gliadina como la principal responsable de las patologías relacionadas con el gluten.⁵² Esta proteína se caracteriza por no ser totalmente digerida, produciendo péptidos que también son capaces promover una respuesta inmune.⁵³

1.4.1. Gluteninas:

Las gluteninas son proteínas que tienen la capacidad de auto-organizarse, generando agregados, cuyos pesos moleculares varían desde 500.000 a 10 millones de Da. Teniendo en cuenta la estructura primaria de estas, se pueden dividir en dos grandes grupos: las gluteninas de alto peso molecular, entre 67-88 KDa y las de menor peso, entre 32-35 KDa. Ambas clases de proteínas interactúan entre sí para dar lugar a la formación de un polímero ramificado que le da elasticidad al gluten.⁵²

1.4.2. Gliadinas:

La gliadina es una proteína monomérica que conforma aproximadamente el 50 % del gluten. La misma se encuentra conformada por cuatro tipos de isoformas que se clasifican de acuerdo a su movilidad electroforética en α (25-35kDa), β (30-35kDa), γ (35-40kDa) y ω (55-75kDa).⁵⁴ Estas

⁴⁹ H. Wieser, 'Chemistry of gluten proteins' (2007) 24(2) *Food Microbiol* 115.

⁵⁰ N. Rosenberg et al, 'Wheat (*Triticum aestivum* L.) [γ]-Gliadin Accumulates in Dense Protein Bodies within the Endoplasmic Reticulum of Yeast' (1993) 102(1) *Plant Physiology* 61.

⁵¹ J. S. D. Graham et al, 'Protein Bodies and Protein Synthesis in Developing Wheat Endosperm' (1962) 196(4858) *Nature* 967.

⁵² H. Wieser, 'Relation between gliadin structure and coeliac toxicity' (Pt Blackwell Publishing Ltd) (1996) 85 *Acta Paediatrica* 3.

⁵³ L. Shan et al, 'Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue' (2002) 297(5590) *Science* 2275.

⁵⁴ S. Quester, M. Dahesh y R. Strey, 'Microcellular foams made from gliadin' (2014) 292(9) *Colloid Polym Sci* 2385.

proteínas comparten una estructura primaria similar, conformada por un dominio N-terminal, un dominio central hidrofóbico rico en prolina y glutamina y fenilalanina y una región no repetitiva que incluye cisteínas. Las α y β gliadinas poseen entre 250-300 residuos aminoacídicos, con una estructura y secuencia muy similar, por lo que normalmente se las agrupan juntas. Además las α/β y las γ gliadinas contienen seis y ocho residuos de cisteína, respectivamente, ubicados en una posición conservada. La ω -gliadina posee 350 aminoácidos es globalmente más polar que el resto de las isoformas y no contiene en su composición el aminoácido cisteína, por lo que no es capaz de presentar un crosslinking a través de puentes disulfuro.^{55,56} Además se caracteriza por poseer un alto contenido en prolina y glutamina, las cuales se encuentran ubicadas en secuencias repetitivas características como PQQPFPQQ.^{57,58} Todas poseen escasos aminoácidos cargados positivamente.

A pesar que este grupo de proteínas se ha estudiado extensamente, el conocimiento de la estructura secundaria y terciaria de la misma es escaso. Estas proteínas no se han podido cristalizar en condiciones ambientales normales aunque si se ha podido en un ambiente microgravimétrico.⁵⁹ Debido a su alto peso molecular y su elevado contenido en prolina, se ha dificultado la realización de estudios estructurales a través de técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, diversos estudios se han llevado a cabo para conocer la estructura de esta a través de diversas técnicas espectroscópicas. *Blanch et. al* demostraron utilizando la técnica de espectroscopia Raman que las α - gliadinas poseen un alto contenido de estructura α , y en menor porcentaje β y PPII a pH 3.5. Las ω -gliadinas-poseen una estructura de PPII bien definida con

⁵⁵ J. A. Bietz y T. Burnouf, 'Chromosomal control of wheat gliadin: analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography' (Pt Springer-Verlag) (1985) 70(6) *Theoretical and Applied Genetics* 599.

⁵⁶ P. R. Shewry y A. S. Tatham, 'Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins' (1997) 25(3) *Journal of Cereal Science* 207.

⁵⁷ P. R. Shewry y A. S. Tatham, 'The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution' (1990) 267(1) *Biochem J* 1.

⁵⁸ F. M. DuPont et al, 'Characterization of the 1B-Type ω -Gliadins from *Triticum aestivum* Cultivar Butte' (Pt Scientific Societies) (2000) 77(5) *Cereal Chemistry Journal* 607.

⁵⁹ S. Aibara, 'Crystallization of wheat γ -gliadin under a microgravity environment using space station MIR' (1995) 155(3-4) *Journal of Crystal Growth* 247.

algunos giros a pH 2.6.⁶⁰ Por otro lado, *Tatham et al* comprobaron mediante dicroísmo circular (CD) que en soluciones acuosas-etanólicas (70% v/v) las α , β y γ gliadinas, contienen entre un 36-37% α hélice, 11-12% de láminas β y un 52-53% de estructura desordenada y giros β . Además estos autores establecieron que las α , β y γ gliadinas estabilizan su estructura a través de puentes de hidrógeno y puentes disulfuro, mientras que las ω -gliadinas lo hacen por efectos hidrofóbicos.⁶¹ Recientemente, *Rasheed et al* realizaron una extracción de gliadinas utilizando diferentes condiciones como presencia de alcoholes, detergentes, agentes reductores. A continuación dichas fracciones fueron estudiadas mediante espectroscopia de infrarrojo- transformada de Fourier, rayos X de amplio y bajo ángulo (SAXS). Mediante estas técnicas, determinó que la gliadina posee un alto contenido de estructuras desordenadas, hélice α y escasas láminas β . Sin embargo, cuando estas se exponen a glicerol, adquieren mayor contenido de hélices α y láminas β .⁶² Estos hallazgos muestran que estas proteínas poseen una estructura secundaria que es sensible al medio en el cual se encuentran.

En cuanto a la morfología de estas proteínas, se ha propuesto que soluciones de gliadina disueltas en agua / etanol, generan estructuras del tipo elipsoide de 3,5 nm de diámetro con un 15-20 nm de largo.⁶³ Recientemente *Sato et. al.* realizó estudios de rayos X de bajo ángulo (SAXS) de soluciones acuosas de gliadina, demostrando que en este medio, esta proteína genera estructuras del tipo elipsoide, con un radio mayor de 11.3 nm y uno menor de 2.5 nm. Además a bajas concentraciones menores al 0.5% p/v, la gliadina se encuentra fundamentalmente en forma de monómeros, coexistiendo con algunos oligómeros. Cuando la concentración se incrementa en el

⁶⁰ E. W. Blanch et al, 'New insight into the solution structures of wheat gluten proteins from Raman optical activity' (2003) 42(19) *Biochemistry* 5665.

⁶¹ A. S. Tatham y P. R. Shewry, 'The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of α -, β -, γ - and ω -Gliadins' (1985) 3(2) *Journal of Cereal Science* 103.

⁶² F. Rasheed et al, 'Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization' (Pt The Royal Society of Chemistry) (2014) 4(4) *RSC Advances* 2051.

⁶³ N. H. Thomson et al, 'Small angle X-ray scattering of wheat seed-storage proteins: α -, γ - and ω -gliadins and the high molecular weight (HMW) subunits of glutenin' (1999) 1430(2) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 359.

rango de 0.5%-1% p/v, se observan agregados solubles y cuando esta es mayor a 15% p/v, la gliadina se torna insoluble.⁶⁴ En esta última concentración se ha determinado que los agregados se acercan entre sí formando una red, sin perder sus características estructurales. Estudios de *Rasheed et al* realizados mediante SAXS, en el cual la gliadina se encontraba en medios de etanol-propanol-agua, han demostrado que en estas condiciones estas proteínas poseen una estructura en el espacio del tipo amorfa. Sin embargo cuando esta solución es tratada con glicerol, adopta una estructura del tipo hexagonal compacta.⁶²

La posibilidad que posee estas proteínas de presentar cambios en su estructura desde desordenada a una estructura compacta y de agregarse en medios acuosos de acuerdo a la concentración, de acuerdo a las condiciones del medio, estaría relacionada con el rol que tienen las gliadinas en las plantas de trigo. Inicialmente, las gliadinas son fuente de almacenamiento proteico en las células, mientras que una modificación en el entorno celular, como cambios en el pH, deshidratación, fuerza iónica, podrían generar un cambio estructural.⁶⁵ Esto permitiría que esta proteína se encuentre disponible para una posterior hidrólisis. Estudios previos han demostrado que la hidrólisis de esta proteína ocurre preferentemente cuando la semilla se encuentra seca y a un pH~ 5.7, donde las carboxipeptidasas presentan su máxima actividad. Luego de esta primera degradación, la gliadina posee una mayor disponibilidad para posteriores proteólisis, dejando disponibles aminoácidos necesarios para el proceso de germinación.^{66,67}

1.4.3. Gliadina y el péptido 33-mer. Rol central en el desarrollo de las patologías relacionadas con el gluten.

⁶⁴ N. Sato et al, 'Molecular Assembly of Wheat Gliadins into Nanostructures: A Small-Angle X-ray Scattering Study of Gliadins in Distilled Water over a Wide Concentration Range' (2015) *J Agric Food Chem*.

⁶⁵ A. K. Dunker et al, 'Intrinsic disorder and protein function' (2002) 41(21) *Biochemistry* 6573.

⁶⁶ Y. E Dunaevsky, S. T. Sarbakonova y M. A. Belozersky, 'Wheat Seed Carboxypeptidase and Joint Action on Gliadin of Proteases from Dry and Germinating Seeds' (1989) 40(12) *Journal of Experimental Botany* 1323.

⁶⁷ L. Bigiarini et al, 'Hydrolysis of Gliadin during Germination of Wheat Seeds' (1995) 147(2) *Journal of Plant Physiology* 161.

Como se mencionó, la gliadina es una proteína que presenta un alto contenido de prolinas y glutaminas en su secuencia, especialmente en ciertos dominios. En particular, las α -gliadinas poseen cinco dominios. El denominado I correspondiente a la región N-terminal (residuos 1-95), rico en residuos aromáticos, glutaminas y prolinas, en el cual se repite aproximadamente 5 veces la secuencia QPQPFPPQPYP. Luego el dominio II (residuos 96-113) y el IV (residuos 183-190) se caracterizan por poseer una secuencia rica en glutaminas. El dominio III (residuos 114-182) y el V (residuos 191-266) no poseen secuencias repetidas y su contenido en prolina y glutaminas es menor.

⁶⁸ Las gliadinas y en especial la isoforma 2α , son proteínas resistentes a la proteólisis enzimática ⁶⁹ y los fragmentos peptídicos resistentes inducen una respuesta inmune en ciertos individuos susceptibles (Figura 12). Entre estos fragmentos, el péptido 33-mer (56-89), ejerce la respuesta inmunomoduladora más importante, ya que en su secuencia posee seis regiones inmunogénicas, las cuales se encuentran ubicadas en tres secciones repetidas en la secuencia del péptido:

LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF ⁵³

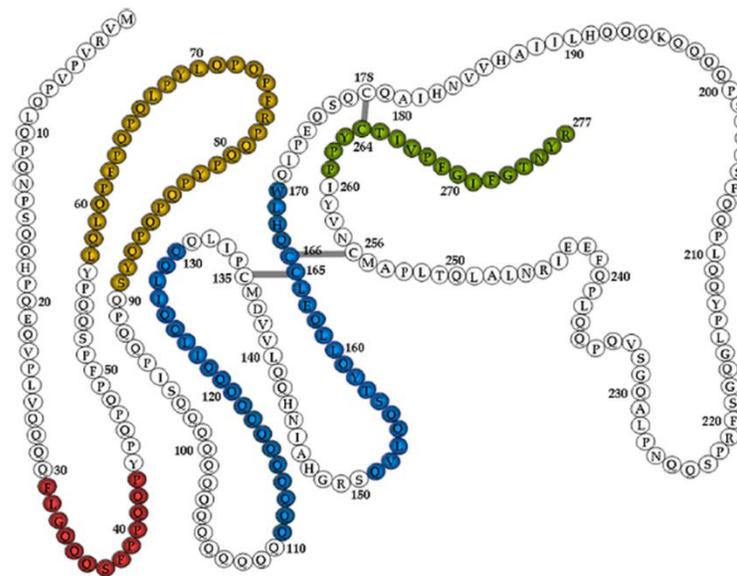


Figura 12. Mapeo de los sitios inmunogénicos de la alfa-2 gliadina. En rojo se presentan los péptidos que

⁶⁸ D. D. Kasarda et al, 'Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of alpha-type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*)' (1984) 81(15) *Proc Natl Acad Sci U S A* 4712.

⁶⁹ F. Hausch et al, 'Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides' (2002) 283(4) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* G996.

producen citotoxicidad, en amarillos aquellos que producen una inmunomodulación, en azul aquellos que producen una liberación de zonulinas y aumento de la permeabilidad celular y en verde los péptidos que inducen incremento de IL-8. Extraído de Sapone, *et al* 2012.

Se ha demostrado que las gliadinas producen cambios histopatológicos específicos en tejidos, tales como atrofia vellositaria, hiperplasia de las criptas intestinales e infiltración intra-epitelial de linfocitos.⁷⁰ *Hekkens et al* demostraron que la gliadina es enterotóxica para pacientes celíacos, que luego de ser tratados con una dieta libre de gluten presentan una histología normal.⁷¹ *Fasano* ha demostrado que tanto la gliadina y como su digesto incompleto, son capaces de inducir un incremento en la permeabilidad celular, especialmente en células de pacientes celíacos. Esto se debe a producción de **zonulina**, molécula cuya expresión aumentada se encuentra asociada a desórdenes autoinmunes.⁷² La gliadina induce la expresión de esta proteína a través de la interacción con el receptor de quemoquina 3 (CXCR3).⁷³ Una vez expresada la zonulina, actúa sobre receptores celulares específicos como el del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor acoplado a proteínas G denominado PAR₂. Mediante la activación de ambos receptores, se produce una reorganización del citoesqueleto que lleva a una disrupción de las uniones estrechas. Estas uniones regulan el pasaje de moléculas por la vía paracelular, es decir entre las células, favoreciendo el pasaje de antígenos a la lámina propia (tejidos que se encuentran debajo de las células epiteliales del intestino).⁷⁴ Sin embargo, es importante destacar que la proteína gliadina también es capaz de inducir este mismo efecto a través de la activación directa de EGFR, sin la intervención de las

⁷⁰ D. Stepniak y F. Koning, 'Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity' (2006) 67(6) *Hum Immunol* 460.

⁷¹ W. T. J. M. Hekkens.; A. J. C. Haex y R. G. J. Willighagen, 'Some aspects of gliadin fractionation and testing by a histochemical method.' (Paper presented at the Coeliac Disease: Proceedings of the Second International Coeliac Symposium.

⁷² A. Fasano, 'Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases' (2012) 1258 *Ann N Y Acad Sci* 25.

⁷³ K. M. Lammers et al, 'Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3' (2008) 135(1) *Gastroenterology* 194.

⁷⁴ A. Fasano, 'Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer' (2011) 91(1) *Physiol Rev* 151.

zonulinas.⁷⁵ Curiosamente entre el ligando de este receptor y la gliadina no existe relación estructural, por lo que se desconoce a través de que mecanismo ocurre esta activación.

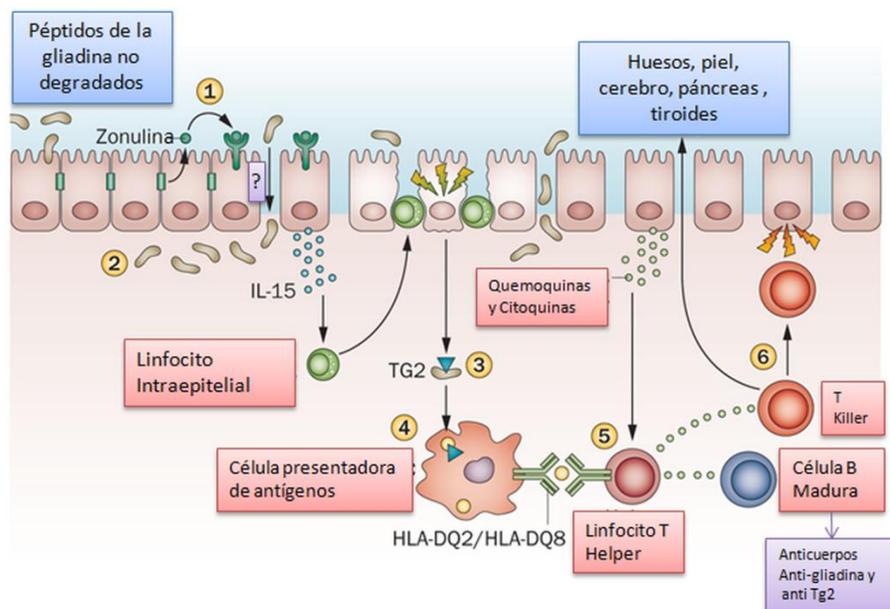


Figura 13. Representación de los eventos moleculares que ocurren en el desarrollo de la patología celíaca. 1) Los fragmentos no digeridos del gluten inducen a una liberación de zonulinas, produciendo una pérdida de las uniones estrechas. 2) Sin embargo por un mecanismo no establecido, los péptidos del gluten, entre ellos el 33-mer atraviesa la mucosa intestinal, llegando a la lámina propia. Allí se produce la liberación de la Interlequina-15 (IL-15) por las células intestinales. Esta citoquina pro-inflamatoria induce a una respuesta inmune innata, con el reclutamiento de linfocitos intra-epiteliales en la mucosa. 3) La enzima transglutaminasa (TG2) que se libera de las células entéricas dañadas, desamida los péptidos que atraviesan la mucosa intestinal, generando que estos puedan ser presentados en las moléculas de histocompatibilidad HLA-DQ2/DQ8, que se expresan en las células presentadoras de antígenos. 4) Estas células presentan este antígeno a las células T helper. 5) Los linfocitos T helper establecen interacciones con otros linfocitos y liberan citoquinas. Por un lado, se recluta a linfocitos T killers (células citotóxicas), que inducen la muerte de las células entéricas. Además, se induce a la activación de células B, las cuales producen anticuerpos específicos. Debido a esta respuesta, las células inflamatorias migran hacia esta región intestinal, induciendo una respuesta inflamación responsable de los síntomas intestinales e extra-intestinales observados. Adaptado de **Leffler, D. A.** et al. (2015), Extra-intestinal manifestations of coeliac disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*

Por otro lado, se ha observado que la gliadina y sus péptidos, son capaces de producir diversos efectos nocivos sobre la función de las células entéricas. Se ha detectado que estas proteínas y sus

⁷⁵M. V. Barone et al, 'Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease' (2007) 56(4) *Gut* 480.

péptidos son capaces de producir un desbalance en el metabolismo oxidativo.⁷⁶ Se ha determinado que digestos de gliadina son capaces de producir una remodelación de citoesqueleto de actina en líneas de Células de Carcinoma de Colon (células Caco-2), interfiriendo en procesos de transporte en el borde en cepillo de las células entéricas (BBM). Debido a esto, se observó una alteración de la composición de lípidos y proteínas en la BBM.⁷⁷ Además se ha observado que estas fracciones son capaces de inducir muerte celular de líneas Caco-2, cuando el tiempo de exposición es de 48 horas. Además se ha observado un incremento en la producción de IL-15 e IFN- γ por las células epiteliales. Estas citoquinas inhiben la diferenciación de los linfocitos T reguladores.⁷⁸ En consecuencia, se podría hipotetizar que estas moléculas serían intrínsecamente tóxicas para las células del intestino, induciendo en las mismas eventos apoptóticos.⁷⁹

Desde el punto de vista inmunológico, se sabe que el daño producido en la mucosa intestinal es inducido por el sistema inmune adaptativo, con la producción de anticuerpos y células citotóxicas. Se ha demostrado que la gliadina presenta secuencias que son presentadas en las Moléculas Histocompatibilidad (HLA-DQ2y DQ-8), estimulando a los receptores de los linfocitos T, que modulan este tipo de respuesta.⁷¹ Por otro lado las células T que expresan la molécula CD4, estimulan a que los linfocitos B se transformen en células productoras de anticuerpos. Estos anticuerpos del tipo IgA y del tipo IgG pueden además favorecer al daño en la mucosa intestinal. Esto se produce debido a que los primeros son capaces de permitir el pasaje de péptidos mediante transcitosis,^{80, 81} mientras que las IgG pueden inducir complejos inmunes que pueden inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias.⁸²

⁷⁶ R. Rivabene, E. Mancini y M. De Vincenzi, 'In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease' (1999) 1453(1) *Biochim Biophys Acta* 152.

⁷⁷ Y. Reinke, K. P. Zimmer y H. Y. Naim, 'Toxic peptides in Frazer's fraction interact with the actin cytoskeleton and affect the targeting and function of intestinal proteins' (2009) 315(19) *Exp Cell Res* 3442.

⁷⁸ B. Jabri y L. M. Sollid, 'Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease' (2009) 9(12) *Nat Rev Immunol* 858.

⁷⁹ C. Giovannini et al, 'Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides' (2000) 145(1) *Toxicology* 63.

⁸⁰ M. Heyman y S. Menard, 'Pathways of gliadin transport in coeliac disease' (2009) 1165 *Ann N Y Acad*

Recientemente se ha comenzado a destacar la influencia directa de la inmunidad innata en el desarrollo de la patología.⁷⁸ Se demostró la importante influencia de la IL-15 como mediadora del daño producido en la mucosa intestinal a través de linfocitos citotóxicos y favoreciendo a la pérdida de la tolerancia a la gliadina mediante la inhibición inducida sobre linfocitos reguladores.⁸³ Además se ha demostrado que la gliadina induce la expresión de un tipo de molécula de histocompatibilidad HLA-E, ligando de receptores de células citotóxicas Natural Killers (NK), que inhibe la inducción de la muerte celular de Células Presentadoras de Antígeno que reconocen a los péptidos inmunogénicos de la gliadina. De esta manera se favorecería una respuesta inmune y la pérdida de tolerancia.⁸⁴

Por otro lado, se ha determinado que la gliadina produce diferentes efectos directos sobre las células de la inmunidad innata. Entre estas células se destacan las Células Dendríticas, que actúan como presentadoras de antígenos a los linfocitos. Se ha demostrado que la migración de estas células es inducida por fragmentos provenientes de la digestión de la gliadina, en una manera dependiente de la concentración. En estas se ha observado una remodelación del citoesqueleto, inducción de receptores para citoquinas y de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual produce mediadores inductores de migración. Se ha demostrado que la gliadina incrementa la producción de Interleuquina-8 (IL-8) y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), en líneas celulares de macrófagos (líneas THP1 y U-937), demostrando que la respuesta depende del estadio de maduración cuanto más madura es la línea celular, mayor es la respuesta que producen, y esto ocurre a través de un mecanismo Factor Nuclear kB (NFkB).⁸⁵ Se ha propuesto que la activación de los macrófagos y

Sci 274.

⁸¹ T. Matysiak-Budnik et al, 'Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease' (2008/01/02) (2008) 205(1) *J Exp Med* 143.

⁸² F. Nimmerjahn y J. V. Ravetch, 'Fc-receptors as regulators of immunity' (2007) 96 *Adv Immunol* 179.

⁸³ M. V. Barone, R. Troncone y S. Auricchio, 'Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa' (2014) 15(11) *Int J Mol Sci* 20518.

⁸⁴ G. Terrazzano et al, 'Gliadin regulates the NK-dendritic cell cross-talk by HLA-E surface stabilization' (2007) 179(1) *J Immunol* 372.

⁸⁵ L. Jelinkova et al, 'Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB' (2004) 571(1-3) *FEBS Lett* 81.

que este péptido es resistente a las enzimas degradativas presentes en BBM, permaneciendo remanente en la mucosa intestinal. Por otro lado, se sabe que el péptido 33-mer es capaz de atravesar la mucosa intestinal de individuos con patología celíaca, aunque el mecanismo por el cual esto ocurre no se ha establecido.⁸⁸ Este mismo comportamiento se ha observado en experimentos con primates sensibles al gluten, demostrando la capacidad de este péptido de atravesar la mucosa intestinal en estas patologías.⁸⁹ Schumann *et. al.* propusieron que el péptido es capaz de realizar este proceso en monocapa de células Caco-2 a través de un mecanismo de transcitosis mediante Rab-5 y siendo este pasaje favorecido por incremento de IFN- γ .⁹⁰ Bethune *et. al.* demostraron que este péptido es capaz de atravesar una monocapa de célula T84 y que este pasaje no se produciría por vías endocíticas clásicas, sino que ocurriría por un mecanismo paracelular o de endocitosis fluida. Sin embargo los autores destacan que este proceso ocurre en mayor medida cuando las células se encuentran expuestas a elevada concentración de IFN- γ , citoquina inducida debido a la inflamación que aumenta la permeabilidad celular.⁹¹ Por otro lado Heyman *et. al.* y Mattysiak -Budnik *et. al.*, demostraron que el péptido 33-mer unido a las Ig A secretorias, puede ser transportado a través de los enterocitos en biopsias de pacientes celíacos. Estas inmunoglobulinas serían reconocidas por el receptor de transferrina (CD 71), el cual se sobre-expresa en individuos celíacos, y serían endocitadas, inhibiendo la degradación del péptido y permitiendo que este llegue al interior del intestino.^{80, 81}

Al atravesar la mucosa intestinal, se ha demostrado que este péptido y fragmentos sintéticos de este pueden ser presentados por las células presentadoras de antígenos sin mayores modificaciones químicas. Además demostró presentar una unión de elevada afinidad a las moléculas HLA-DQ2,

⁸⁸ S. Friis et al, 'Gliadin uptake in human enterocytes. Differences between coeliac patients in remission and control individuals' (1992) 33(11) *Gut* 1487.

⁸⁹ K. Mazumdar et al, 'Visualization of Transepithelial Passage of the Immunogenic 33-Residue Peptide from α -2 Gliadin in Gluten-Sensitive Macaques' (Pt Public Library of Science) (2010) 5(4) *PLoS ONE* e10228.

⁹⁰ M. Schumann et al, 'Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue' (2008) 57(6) *Gut* 747.

⁹¹ M. T. Bethune et al, 'Interferon-gamma released by gluten-stimulated celiac disease-specific intestinal T cells enhances the transepithelial flux of gluten peptides' (2009) 329(2) *J Pharmacol Exp Ther* 657.

por lo que este péptido generaría un elevado efecto inmuno-modulador. Por otro lado, el péptido 33-mer es un sustrato de gran afinidad de la enzima Transglutaminasa-2 (TG-2). Esta enzima es capaz de generar una reacción de des-amidación, produciendo la transformación de tres glutaminas en la secuencia a ácido glutámico. El péptido generado por esta reacción, es presentado por el complejo HLA, induciendo una exacerbada respuesta inmune.⁹²

Además se conoce que 33-mer es capaz de inducir una respuesta inmune innata, induciendo la activación de macrófagos⁹³, aunque no ejerce un efecto estimulante de la migración sobre las células dendríticas.⁹⁴ Por otro lado se ha demostrado que genera un incremento de la producción de interleuquinas proinflamatorias tales como IL-15⁹⁵, y una respuesta del tipo adaptativa, con presentación de fragmentos de este péptido en el complejo mayor histocompatibilidad HLA-DQ2/DQ8 a linfocitos T-CD4.⁹²

Finalmente, desde el punto de vista estructural, solo se ha realizado un único experimento de Dicroísmo Circular, demostrando que 33-mer tiene una estructura PPII.⁵³ Análogos de este péptido de menor longitud han demostrado el mismo comportamiento mediante RMN y CD.⁹⁶

⁹² S. W. Qiao et al, 'Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion' (2004) 173(3) *J Immunol* 1757

⁹³ K. E. Thomas et al, 'Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease' (2006) 176(4) *J Immunol* 2512.

⁹⁴ B. Chladkova et al, 'Gliadin fragments promote migration of dendritic cells' (2011) 15(4) *J Cell Mol Med* 938.

⁹⁵ D. Bernardo et al, 'Is gliadin really safe for non-coeliac individuals? Production of interleukin 15 in biopsy culture from non-coeliac individuals challenged with gliadin peptides' (2007) 56(6) *Gut* 889.

⁹⁶ I. Parrot, P. C. Huang y C. Khosla, 'Circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of immunogenic gluten peptides and their analogs' (2002) 277(47) *J Biol Chem* 45572.

Capítulo II:

Hipótesis y Objetivos

En la actualidad existe un amplio conocimiento sobre la fisiopatología y manifestaciones clínicas que se observan en las enfermedades relacionadas con el consumo de gluten. No obstante, el conocimiento sobre los disparadores moleculares que dan lugar a los eventos inflamatorios iniciales, no se han establecido. Teniendo en cuenta el alto consumo diario de gluten y la importancia que posee el 33-mer como péptido inmuno-modulador, se hipotetiza que la gliadina y su péptido 33-mer tienen un rol protagónico en el equilibrio que se establece entre tolerancia y enfermedad. Considerando que el péptido 33-mer posee una inusual resistencia a la proteólisis y que su capacidad de atravesar la mucosa intestinal por un mecanismo no establecido tanto en líneas celulares como en pacientes, se propone evaluar el comportamiento de la proteína gliadina y su fragmento 33-mer *in vitro*, mimetizando condiciones fisiológicas. A través de este estudio se busca aportar nuevos conocimientos sobre los eventos moleculares iniciales, que llevarían al desarrollo de estas patologías. En este contexto se considera que la elucidación estructural de ambos sistemas es un punto esencial en la comprensión y la búsqueda de tratamientos de esta clase de patologías.

2.1 .Objetivos Generales.

Para comprobar esta hipótesis general, se propone evaluar el comportamiento de la proteína gliadina y su fragmento 33-mer, derivado de la isoforma α -2 en medio acuoso *in vitro*, mimetizando condiciones fisiológicas. Para ello, planeamos utilizar la combinación de técnicas espectroscópicas, de dispersión de luz, y de visualización microscópica, así como también de técnicas bioinformáticas y de dinámica molecular simples.

2.2. Objetivos particulares.

- 1- Evaluar el comportamiento fisicoquímico de la proteína gliadina en agua a pH 3.0 y pH 7.0 a con el propósito de mimetizar las condiciones de pH presentes en el ambiente estomacal e intestinal, respectivamente.
- 2- Elucidar las propiedades estructurales del péptido 33-mer y evaluar la capacidad de esta molécula de auto-organizarse en medio acuoso *in vitro*.

Capítulo III:

Estudio del Comportamiento Supramolecular de la Proteína Gliadina en agua, a pHs fisiológicos relacionados con el proceso de digestión

3.1. Introducción.

La proteína gliadina es capaz de auto-ensamblarse en diferentes condiciones, principalmente en mezclas agua: solvente orgánico. *Kasarda et al*, demostró que la proteína α -gliadina, es capaz de auto-asociarse en fibrillas de 0.8 nm de diámetro, a pH 5.0 en ácido acético con una fuerza iónica de 0.005.⁹⁷ Otros autores han demostrado que las gliadinas pueden formar esferas cuando las mismas son tratadas mediante el proceso conocido como desolvatación. Este proceso se basa en tratar a una solución de la proteína con un solvente precipitante, favoreciendo así la formación de nanopartículas. Mediante este método se han obtenido partículas esféricas que poseen un diámetro medio de entre 100-500 nm^{98,54,99} Recientemente se ha descrito que la proteína gliadina en agua destilada (probablemente pH 6 o 7), está conformada por monómeros de tipo cilíndrico cuyo largo es de 11.3 nm y ancho de 2.5 nm, sin embargo también se ha observado baja concentración de proteína la presencia de oligómeros por experimentos de SAXS y de experimentos de sedimentación.⁶⁴ Sin embargo no se determinó la morfología y características de estos oligómeros.

Teniendo en cuenta la asociación directa de la proteína gliadina con desordenes inmunológicos y el alto consumo diario¹⁴, consideramos evaluar la capacidad de esta proteína de auto-asociarse en agua, en condiciones que mimeticen, de una forma simple, el ambiente gastrointestinal. Recientemente se ha descrito como las características del tracto gastrointestinal (TGI) de mamíferos, modulan la absorción de diferentes nano-materiales alimenticios de gran relevancia.¹⁰⁰ Un parámetro importante a tener en cuenta es el pH, el cual puede variar en el TGI desde 2 a 8. En la boca, el pH es cercano a 7.0 y el periodo en el cual se encuentra el alimento allí es reducido. Al llegar al estómago, el pH puede alcanzar valores cercanos a 1. Sin embargo, durante la ingesta, el

⁹⁷ D. D. Kasarda, J. E. Bernardin y R. S. Thomas, 'Reversible Aggregation of alpha-Gliadin to Fibrils' (1967) 155(3759) *Science* 203.

⁹⁸ C. Duclairoir et al, 'Formation of gliadin nanoparticles: Influence of the solubility parameter of the protein solvent' (Pt Steinkopff-Verlag) (1998) 276(4) *Colloid and Polymer Science* 321.

⁹⁹ I. J. Joye, V. A. Nelis y D. Julian McClements, 'Gliadin-based nanoparticles: Fabrication and stability of food-grade colloidal delivery systems' (2015) 44(0) *Food Hydrocolloids* 86.

¹⁰⁰ S. Bellmann et al, 'Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials' (2015) 7(5) *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 609.

efecto amortiguador que producen los alimentos, puede producir que el pH llegue a valores \approx 2.0-6.0.¹⁰¹ A continuación, en el intestino el pH se va incrementando por la secreción pancreática de una base, llevando al mismo a un valor es entre 5.0-8.0.¹⁰¹ Debido a esto, se ha elegido evaluar el comportamiento fisicoquímico de la proteína gliadina en agua a pH 3.0 y pH 7.0 utilizando una fuerza iónica de 10 mM de NaCl a modo de mimetizar el ambiente estomacal e intestinal, respectivamente. Encontramos que en estas condiciones era posible solubilizar y estabilizar la proteína en medio acuoso sin la necesidad de agregar co-solventes.

3.2. Caracterización de los sistemas de gliadina a pH 3 y 7.0, 10 mM NaCl por Espectroscopia UV-Visible, SDS PAGE, Fluorescencia intrínseca del aminoácido triptófano y Potencial Z.

Para mimetizar las condiciones estomacales, la gliadina fue solubilizada en HCl 0.001 M, NaCl 10 mM, pH 3.0 con agitación. Considerando que la gliadina no es totalmente degradada en el estómago y llega al duodeno, donde el pH llega a ser cercano a 7, una alícuota de la muestra fue llevada a este pH. Al llegar a este valor, se observó macroscópicamente el aspecto de las soluciones totales obtenidas. La solución total a pH 7.0 presentaba una turbidez apreciable, debido a la presencia de agregados macroscópicos, mientras que esto no fue observado a pH 3.0. Estos hallazgos se correlacionan con los de *Thewissen et al*¹⁰², que reportó una mayor solubilidad de esta proteína en medios acuosos a pH básico y ácido extremos. La solubilidad a pH neutro se encuentra disminuida, ya que este pH se encuentra cercano al Punto Isoeléctrico (PI) de la misma, que es 7.8.¹⁰³ En consecuencia, la disminución de cargas produce que las repulsiones electroestáticas sean menores, favoreciendo la interacción de las moléculas y la formación de agregados, observándose una separación de fase.⁹⁹ En base a estas observaciones macroscópicas, se realizó una centrifugación

¹⁰¹ E. M. Quigley y L. A. Turnberg, 'pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. Studies in control subjects and in duodenal ulcer patients' (1987) 92(6) *Gastroenterology* 1876.

¹⁰² B. G. Thewissen et al, 'Foaming properties of wheat gliadin' (2011) 59(4) *J Agric Food Chem* 1370.

¹⁰³ Y. V. Wu y R. J. Dimler, 'Hydrogen Ion Equilibria of Wheat Glutenin and Gliadin' (1963) 103 *Arch Biochem Biophys* 310.

a 14.000 rpm de ambos sistemas, obteniéndose una solución límpida. Con estas soluciones se realizaron los experimentos que se presentan en esta sección.

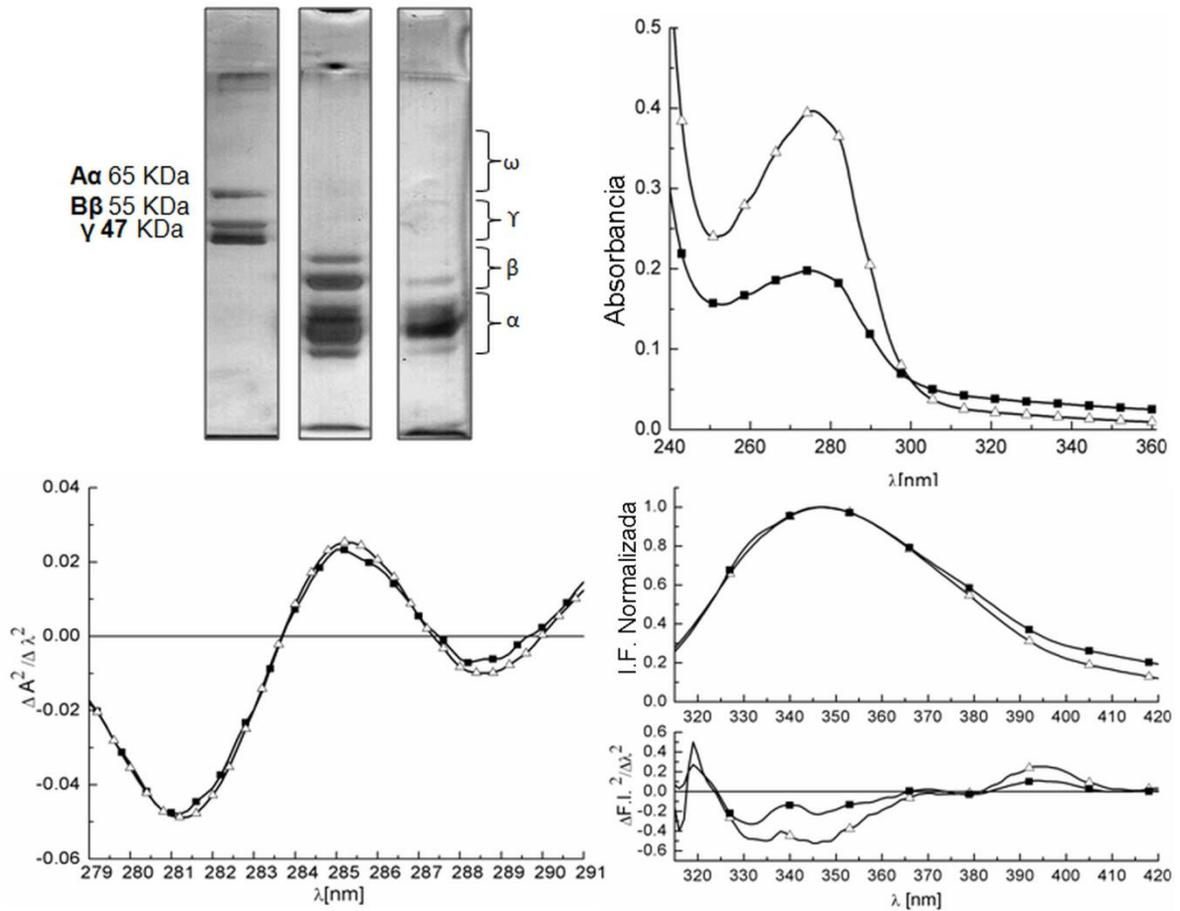


Figure 15. A) SDS-PAGE de las soluciones de Gliadina a pH 3.0 (calle 2) y luego de llevar la solución a pH 7.0 (calle 3). Se utilizó Fibrinógeno como marcador de peso molecular. (calle 1); B) Espectro UV-Visible de las soluciones de gliadina a pH 3.0 (Δ) y luego de alcanzar el pH 7.0 (\blacksquare). C) Derivada Segunda del espectro UV-Visible de las solución a pH 3.0 (Δ) y 7.0 (\blacksquare) presentando las región entre 280-292nm (Zona de absorción de los aminoácidos Tirosina y Triptófano). D) Espectros de Emisión de Fluorescencia normalizados de las soluciones de gliadina y sus correspondientes derivadas segundas a pH 3.0 (Δ) y 7.0 (\blacksquare). Las medidas de fluorescencia fueron realizadas excitando las muestras a 295 nm a 25°C.

Las fracciones presentes en cada solución fueron identificadas mediante SDS-PAGE (Figura 15). En ambos casos, se obtuvieron bandas similares a las reportadas previamente para las fracciones α y

β .^{104,105} La disminución en la intensidad de las bandas, es posible asociarla con la disminución de la concentración de la proteína soluble.

Teniendo en cuenta la complejidad del sistema, se decidió obtener una visión global del sistema mediante espectroscopia UV-Visible. Aunque las soluciones de gliadina eran visiblemente claras, se detectó la presencia de una señal a longitudes de onda > 320 nm, lo cual indica la presencia de agregados.¹⁰⁶ Este tipo de resultados ha sido previamente observado en proteínas multiméricas generadas por procesos de fibrilación, polimerización y gelación.^{107,108,109} Teniendo en cuenta las características de los espectros UV-Visibles en la región 350-400 nm, se calculó el índice de agregación (I.A%) de cada sistema. Este es calculado considerando la relación de absorbancias: A_{350}/A_{280} (ver Materiales y Métodos). Cuando no hay proteínas agregadas, este índice se encuentra entre 0-2, entre 2-5 indica hay agregados en solución y cuando es mayor a 5, se observa una agregación apreciable. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1. Estos resultados permiten considerar que la gliadina es capaz de auto-organizarse de manera diferente, a pH 3.0 se sugiere que la agregación es moderada, sin separación de fases, mientras que a pH 7.0 se observa una mayor agregación.¹⁰³ El mayor IA a pH 7.0 puede ser atribuido al incremento de las fuerzas atractivas sobre las repulsivas en cercanías del punto isoelectrico, lo cual induce a la formación de agregados en las proteínas en general y en particular en la gliadina y otras proteínas como por ejemplo la caseína y la seroalbúmina humana.^{110, 111}

¹⁰⁴ I. Ezpeleta et al, 'Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid' (1996) 131(2) *International Journal of Pharmaceutics* 191.

¹⁰⁵ K. A. Caldwell, 'A Comparative Study of Disulphide-Bonding and Molecular Weights of Purified Fractions from Secalin, Gliadin, and Hordein' (1983) 34(11) *Journal of Experimental Botany* 1411.

¹⁰⁶ R. Esfandiary y C. Russell Middaugh, 'Ultraviolet Absorption Spectroscopy', *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals* (John Wiley & Sons, Inc., 2012) 169-200.

¹⁰⁷ P. D. Yurchenco et al, 'Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity' (1985) 260(12) *J Biol Chem* 7636.

¹⁰⁸ G. Jiang et al, 'Anthrax vaccine powder formulations for nasal mucosal delivery' (2006) 95(1) *J Pharm Sci* 80.

¹⁰⁹ G. Marx, 'Divalent cations induce protofibril gelation' (1988) 27(2) *Am J Hematol* 104.

¹¹⁰ M. ;Babaei Jahanshahi, Z. 7: 4926–4934., 'Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery. Vehicles ' (2008)(7) *African Journal of Biotechnology* 4926.

¹¹¹ K. Langer et al, 'Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA)

Aunque la espectroscopia UV-Visible es una técnica de baja resolución, provee información de cambios en el entorno del ambiente de los aminoácidos Tirosina (Tyr) y Triptófano (Trp), relacionados con el proceso de plegado y desplegado y la formación de agregados. Este método es especialmente útil para el estudio de sistemas complejos tales como las proteínas que se encuentran en los alimentos, permitiendo conocer características estructurales de todo el sistema.^{112,106} En particular, las gliadinas poseen un alto contenido del aminoácido Tyr, y solo algunas de las proteínas de la isoforma α poseen Trp. En primer lugar, se determinó la relación Tyr / Trp, utilizando la metodología propuesta por *Bencze, et.al.*¹¹³ Esta técnica espectroscópica ofrece ventajas sobre los métodos químicos que no requiere que la muestra sea hidrolizada, lo cual puede llevar a la descomposición de los aminoácidos. En este caso, se determinó que la solución de gliadina a pH 3.0 poseía una relación Tyr/ Trp de 2.26:1, mientras que al alcanzar el pH 7.0 esta fue de 1.86:1 (Tabla 1). Estos resultados se encuentran en concordancia con reportes previos que describen relaciones similares en muestras de gliadina empleando para métodos colorimétricos y gravimétricos.^{114,115} Además este resultado coincide con los reportados por *Ewart et al*, quien describió una relación que se encuentra entre 2.8:1 y 3.6:1, dependiendo del origen de la gliadina (variedades de trigo Wichita, Conley, Cappelle y Elite).

Gliadina	Tirosina/Triptófano	I.A.%
pH 3.0	2.26	3.8
pH 7.0	1.86	17.2

Tabla 1. Relación Tyr / Trp e índices de agregación de las soluciones de gliadina a pH 3.0 y luego de llevarla a pH 7.0.

nanoparticles' (2003) 257(1-2) *Int J Pharm* 169.

¹¹² V. I. Doder y P. V. Messina, 'Analyzing the Solution State of Protein Structure, Interactions, and Ligands by Spectroscopic Methods', *Proteins in Solution and at Interfaces* (John Wiley & Sons, Inc., 2013) 73-98.

¹¹³ W. L. Bencze y K. Schmid, 'Determination of Tyrosine and Tryptophan in Proteins' (Pt American Chemical Society) (1957) 29(8) *Analytical Chemistry* 1193.

¹¹⁴ J. M. Looney, 'The Colorimetric estimation of Tyrosine, Tryptophane and cystine in proteins II' (1926) 69(2) *Journal of Biological Chemistry* 519.

¹¹⁵ Edwin J. Cohn, Jessie L. Hendry y Adela M. Prentiss, 'Studies in the Physical Chemistry of the Proteins: V. The Molecular weights of the proteins Part 1. The minimal molecular weight of certain proteins' (1925) 63(3) *ibid.* 721.

Al realizar la comparación de los espectro UV-Visible de ambas soluciones, en la región en la que absorben los aminoácidos aromáticos, se observó que cuando se produce el cambio de pH desde 3.0 a 7.0, se produce un descenso de la señal a 280 nm. Esto explica las diferencias en las intensidades relativas existentes entre la muestra a pH 3.0 y 7.0. La disminución en la concentración de proteína fue corroborada a través del método de Bradford.

Los espectros UV-Visibles a ambos pHs demostraron que el máximo de absorción se encuentra en 282 nm, mostrando un comportamiento hipsocrómico comparado con el espectro de los aminoácidos libres¹⁰⁶ (Figura 15 B). Para estudiar cambios estructurales, se realizó la derivada segunda de los espectros. Este método permite caracterizar las diferencias existentes entre los espectros y resolver bandas de manera cualitativa, reduciendo el efecto producido por la dispersión de las partículas (Figura 15 C). Es conocido que en estos espectros, el mínimo observado a 280 nm corresponde a la absorción de los aminoácidos tirosina y triptófano, mientras que el observado a 290 nm corresponde al triptófano. Sin embargo, considerando que la gliadina es una proteína con un alto contenido de Tyr se puede suponer que esta es la mayor contribuyente en la absorbancia registrada a 280 nm.¹⁰⁶ En este caso, a pH 3.0 se observa un desplazamiento de esta banda característica a 281.5 nm, mientras que al alcanzar el pH 7.0 dicho mínimo se encontró a 281.0 nm. En proteínas en general, cambios en el máximo de longitud de onda de 0.1 nm están correlacionados con cambios estructurales.¹⁰⁶ Por lo que ambas Tyr están poco expuestas al solvente para ambos sistemas. Por otro lado, en el caso Trp, este absorbe a 288.7 nm a pH 3.0, mientras que a pH 7.0 lo hace a 288.5 nm. Estos desplazamientos indicarían que el Trp se encuentra en ambas soluciones expuesto al solvente. Basándose en estos resultados, es posible hipotetizar que existe una disposición diferencial de las cadenas laterales de los aminoácidos dependiendo del pH.

El Trp posee una eficiencia cuántica mayor que el resto de los aminoácidos aromáticos, además presenta un espectro de emisión que es sensible a la polaridad del medio por lo que su máximo de

emisión varía entre 307 y 350 nm, dependiendo de la polaridad del ambiente.¹¹⁶ Por esta razón su fluorescencia intrínseca fue utilizada para evaluar el cambio estructural de la gliadina en ambos pHs a través de los cambios de la posición del máximo de emisión.¹⁰⁶ Para ello se eligió excitar a este aminoácido a 295 nm, donde solo el grupo indol es capaz de absorber radiación. El espectro de emisión de la gliadina a ambos pHs posee su máximo ubicado en la región de 350 nm con un ancho de banda de 60 nm (Figura 15 D). Para lograr una mejor resolución de las bandas, se realizó la derivada segunda de ambos espectros. A ambos pHs se detectaron dos mínimos, a pH 3.0 uno en 334 nm y otro en 345 nm, mientras que a pH 7.0 en 332 nm y en 346 nm. Esto permitió corroborar la existencia de dos tipos de Trps. Si bien ambos corresponden a Trp localizados en medio polar, uno tipo de Trp está menos expuesto al solvente (334-332 nm) y el otro está más expuesto al solvente (345-346 nm).¹¹⁷ El primer grupo de triptófanos corresponde a los de clase I, en el cual este residuo se encuentra en un medio polar pero rígido, dentro de la proteína, formando un excímero. Los excímeros se caracterizan por ser complejos del tipo 2:1, que se establece con grupos polares vecinos al fluoróforo, lo cual provoca una disminución de la energía del fluoróforo, afectando su emisión. El segundo grupo corresponde a triptófanos de clase II, los cuales se encuentran ubicados en la superficie de las proteínas, en contacto con el solvente y otros grupos polares de la proteína.^{118,119} En ambos casos, la presencia de Trps en la superficie de los complejos proteicos podría contribuir a la estabilización del sistema. Esto podría deberse a que estos residuos establecerían puentes de hidrógeno con las moléculas del solvente y otros grupos polares favorecido por la entropía, como fue observado para las cápsides virales.^{120,121} A pH 3.0 la relación entre las

¹¹⁶ J.R Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2007).

¹¹⁷ V. Kumar, V. K. Sharma y D. S. Kalonia, 'Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins' (2005) 294(1-2) *Int J Pharm* 193.

¹¹⁸ A. S. Ladokhin, 'Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis', *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (John Wiley & Sons, Ltd, 2006).

¹¹⁹ E. A. Burstein, N. S. Vedenkina y M. N. Ivkova, 'Fluorescence and the location of Tryptophan residues in proteins molecules' (Pt Blackwell Publishing Ltd) (1973) 18(4) *Photochemistry and Photobiology* 263.

¹²⁰ A. T. Da Poian, J. E. Johnson y J. L. Silva, 'Protein-RNA interactions and virus stability as probed by the dynamics of tryptophan side chains' (2002) 277(49) *J Biol Chem* 47596.

intensidades de fluorescencia (IF) entre ambos mínimos, IF_{332}/IF_{345} fue de 0.98, demostrando que en este sistema ambos tipos de Trps están distribuidos uniformemente en el sistema. A pH 7.0 la relación existente entre los mínimo, IF_{334}/IF_{346} fue de 1.42, lo que significa que más de la mitad de los Trp se encuentran en un ambiente menos polar al aumentar el pH. Además incrementando el pH desde 3.0 a 7.0, las bandas de emisión de los diferentes tipos de triptófano presentan un corrimiento de batocrómico de 2 nm para la banda desde 334 a 332 nm y uno hipsocrómico de 1 nm para la segunda banda desde 345 a 346 nm. Estas observaciones sugieren la existencia de un cambio de la estructura terciaria de la gliadina cuando se produce un cambio de pH, produciendo una estructura terciaria más compacta cuando la solución llega a un pH 7.0.

Estos resultados demuestran que a ambos pHs, la gliadina se auto-organiza en solución acuosa a una fuerza iónica de 10 mM. Este comportamiento se ha observado en otros sistemas proteicos que se encuentran en los alimentos, los cuales han demostrado auto-asociarse en condiciones fisiológicas.^{122,123} A pH 3.0 la gliadina se ensambla espontáneamente formando agregados similares a micelas tal como ocurre en las moléculas anfifílicas.¹²⁴ Cuando se produce un cambio de pH desde 3.0 a 7.0, se observa una separación de fases, pero luego de la centrifugación se obtienen una solución límpida. Teniendo en cuenta la estructura primaria de la gliadina, con una composición aproximada de 14% del residuo prolina y 40% de glutamina, las interacciones hidrofóbicas jugarían un rol importante en la estabilización de los agregados detectados, junto con las interacciones de puente hidrógeno. Teniendo en cuenta el alto contenido de glutaminas, se hipotetiza que la presencia de puentes de hidrógeno podrían estabilizar las partículas coloidales formadas a este

¹²¹ D. Foguel et al, 'Role of entropic interactions in viral capsids: single amino acid substitutions in P22 bacteriophage coat protein resulting in loss of capsid stability' (1995) 34(4) *Biochemistry* 1120.

¹²² M. Boulet, M. Britten y F. Lamarche, 'Aggregation of some food proteins in aqueous dispersions: effects of concentration, pH and ionic strength' (2000) 14(2) *Food Hydrocolloids* 135.

¹²³ S. Bouhallab y T. Croguennec, 'Spontaneous Assembly and Induced Aggregation of Food Proteins' in *Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State II* (Springer Berlin Heidelberg, 2014) vol 256, 67-101.

¹²⁴ J. N. Israelachvili, '19 - Thermodynamic Principles of Self-Assembly' in Jacob N. Israelachvili (ed), *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)* 503-534, Academic Press, (2011)

pH.¹²⁵

La combinación de las interacciones de corto rango y las repulsiones de largo alcance han demostrado ser las causantes de la formación de diferentes en equilibrio clusters durante el proceso de agregación proteica.¹²⁶ Por lo tanto el comportamiento de las soluciones de gliadina estudiadas, podría ser explicado mediante la teoría DLVO, cuyo nombre deriva de las iniciales de los apellidos de los autores de la misma.(Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey y Theodoor Overbeek). En esta teoría se describe la agregación de distintos sistemas coloidales que presentan una carga superficial en medios acuosos. Según esta teoría las fuerzas atractivas, que llevan a la agregación están dadas por las interacciones de van der Waals entre las partículas, mientras que las de repulsión se generan debido a la superposición de la doble capa de electrolitos que se produce en un medio acuoso.¹²⁷ Mientras que los potenciales atractivos entre las moléculas permanecen prácticamente constantes, el potencial repulsivo puede variar en un amplio rango controlado por el potencial Z que depende del valor de pH, fuerza iónica y temperatura.

La medición del potencial Z se fundamenta en que las partículas en solución pueden presentar una superficie con una carga neta, la cual induce a la generación de una doble capa eléctrica de iones. En la primera de ellas, denominada capa de Stern, los iones se encuentran interactuando fuertemente con la superficie. La segunda capa es difusa y su interacción con la partícula se hace menor al alejarse de la misma. Cuando se aplica un potencial utilizando dos electrodos, esta doble capa es removida, por lo que es posible determinar la carga superficial de las partículas. En base a estas consideraciones, el potencial Z es medido induciendo a las partículas en solución a atravesar un espacio existente entre los dos electrodos, mientras que a estos se le aplica una diferencia de potencial, por lo que se registra la movilidad de las partículas debido a su carga neta.

Las proteínas pueden poseer una superficie cargada, la cual se encuentra determinada por la

¹²⁵ A. O. Elzoghby, W. M. Samy y N. A. Elgindy, 'Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems' (2012) 161(1) *J Control Release* 38.

¹²⁶ A. Stradner et al, 'Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids' (2004) 432(7016) *Nature* 492.

¹²⁷ D. Leckband y J. Israelachvili, 'Intermolecular forces in biology' (2001) 34(2) *Q Rev Biophys* 105.

presencia de aminoácidos con cadenas laterales ionizables. En el caso de la gliadina se determinó el potencial Z para ambas soluciones. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 2.

Gliadina	Potencial Z (mV)
pH 3.0	+13,42±1.55
pH 7.0	+4.78±0.48

Tabla 2. Valores de Potencial Z obtenidos para las soluciones de gliadina a pH 3.0 (HCl 0.01 M, NaCl 20 mM) y luego de alcanzar el pH 7.0, llevado a este pH con NaOH.

En este caso se observó que el Potencial Z de ambas soluciones era bajo, indicando que las partículas de gliadina se encuentran en régimen de inestabilidad incipiente, especialmente a pH 7.0, que se encuentra cercano al pI de la proteína.^{128,129} Sin embargo ambos sistemas se encontrarían estabilizados cinéticamente a ambos pHs, ya que las repulsiones electroestáticas serían débiles. Este comportamiento de auto-agregación ha sido reportado en la proteína amilogenina, la cual posee en su estructura un alto contenido en prolinas y glutaminas.¹³⁰ Considerando todos estos hallazgos es posible concluir que a pesar que la gliadina forma soluciones transparentes a simple vista, el sistema de gliadina se encontraría formado por una solución auto-organizada en agua.¹³¹

3.3. Evaluación de la morfología y de la estructura secundaria de los sistemas auto-organizados de gliadina a pH 3.0 y 7.0.

3.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

La capacidad de la gliadina de auto-asociarse espontáneamente en agregados ha sido reportado previamente en ácido acético⁹⁷ en mezclas de alcohol y agua⁶² y recientemente en agua destilada.⁶⁴ En agua destilada se ha reportado que la gliadina a bajas concentraciones adopta una morfología

¹²⁸ N. E. Kurland et al, 'Self-assembly mechanisms of silk protein nanostructures on two-dimensional surfaces' (Pt The Royal Society of Chemistry) (2012) 8(18) *Soft Matter* 4952.

¹²⁹ B. Viswanath et al, 'Nanoporous Pt with high surface area by reaction-limited aggregation of nanoparticles' (2009/05/14) (2009) 25(5) *Langmuir* 3115.

¹³⁰ V. Uskokovic et al, 'Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins' (2010) 89(2) *J Dent Res* 149.

¹³¹ K Shinoda, 'A new concept "ideal organized solution": comparison of random mixing solutions and ideal organized solution' (1991) 7(12) *Langmuir* 2877.

similar a un cilindro, encontrándose esta proteína como un monómero, con un largo de 11.3 nm y un ancho de 2.5 nm, aunque se ha reportado la formación de trímeros, detectados mediante SAXS y experimentos de sedimentación. Teniendo en cuenta que la microscopía electrónica es una técnica adecuada para el estudio de la morfología de oligómeros y agregados proteicos, se decidió emplear esta metodología.^{132,133,134} En este caso, la microscopía electrónica permitió obtener información estructural importante sobre la morfología general de ambos sistemas. A pH 3.0 fue posible detectar dos poblaciones de nano-estructuras, con un diámetro promedio de 17 ± 1.6 y 20.8 ± 2 nm. Por otro lado, es interesante observar que estas estructuras son capaces de interactuar formando arreglos lineales. (Figura 16).

¹³² F. Hernandez et al, 'Characterization of Alzheimer paired helical filaments by electron microscopy' (2005) 67(3-4) *Microsc Res Tech* 121.

¹³³ V. L. Anderson y W. W. Webb, 'Transmission electron microscopy characterization of fluorescently labelled amyloid beta 1-40 and alpha-synuclein aggregates' (2011) 11 *BMC Biotechnol* 125.

¹³⁴ J. J. Miranda et al, 'The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules' (2005) 12(2) *Nat Struct Mol Biol* 138.

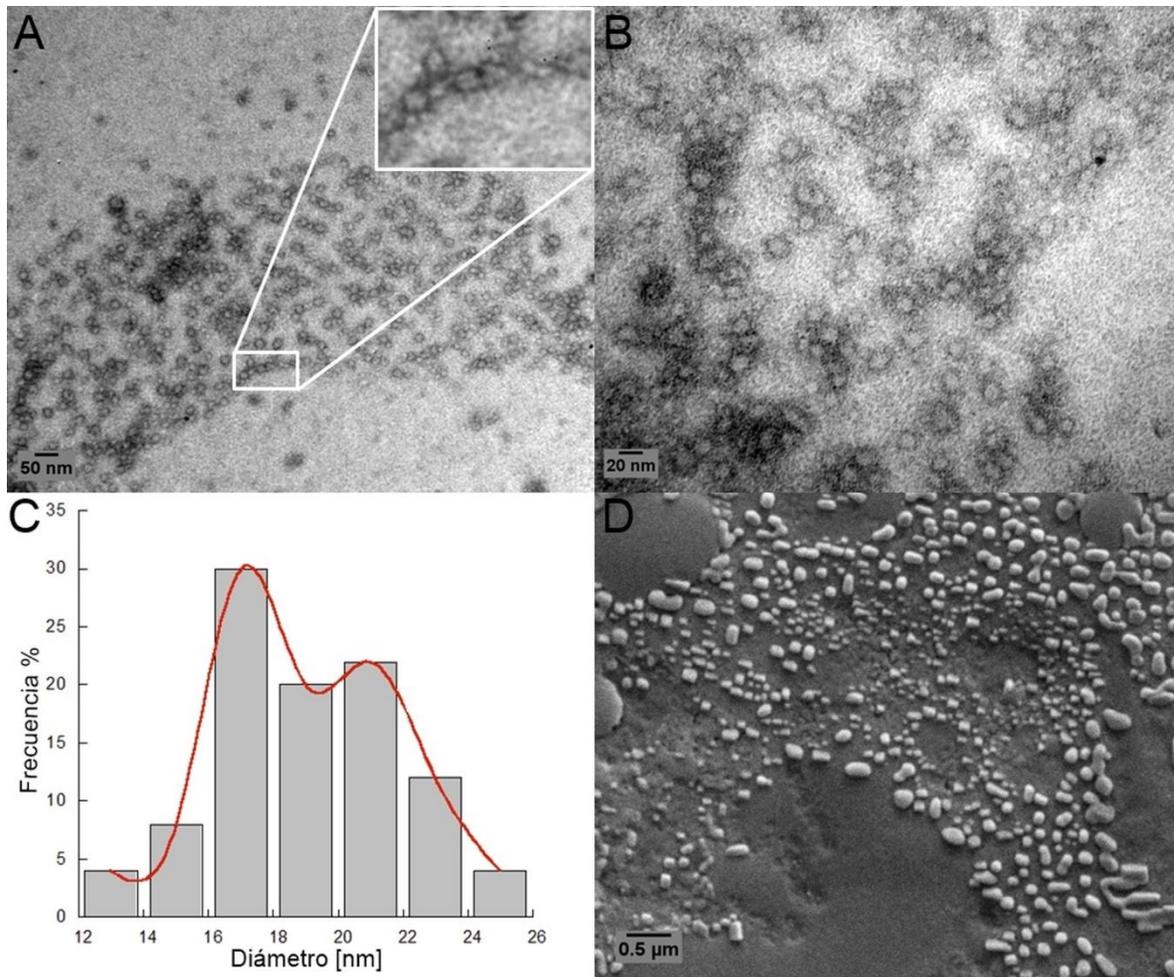


Figura 16. Imagen de Microscopía electrónica de soluciones de gliadina a pH 3.0, NaCl 10 mM. A) Imagen TEM de las partículas depositadas en un grid recubierto con Formvar y un zoom de las nano-estructuras observadas. B) Zoom de una región de A) mostrando el arreglo lineal de las partículas C) Distribución de los diámetros de las partículas observadas en A. D) Imagen SEM mostrando el arreglo fractal de las estructuras de la gliadina sobre una superficies de vidrio.

A través de SEM se detectó que las nano-estructuras son capaces de interactuar sobre la superficie de vidrio, formando un patrón del tipo fractal. En general, el proceso por el cual se depositan y se agregan las proteínas, que ocurre mediante la evaporación del solvente, permite la precipitación de las especies solubles. Esto resulta en arquitecturas complejas que pueden ser clasificadas a través de distintas propiedades físicas, dentro de las cuales se encuentra la dimensión fractal (D_f), densidad y textura.^{128,135} Un fractal es un objeto geométrico cuya estructura básica,

¹³⁵ J-F Gouyet, *Physics and Fractal Structures* (1996).

fragmentada o irregular, se repite a diferentes escalas. Para describir estos objetos se usa la dimensión fractal, que es una regla escalar que establece como los detalles del patrón fractal cambian con el cambio de escala, por lo que de esta manera es posible determinar la complejidad del sistema. Uno de los métodos empleados para su cálculo es el algoritmo del conteo de caja (Ver Materiales y Métodos). Este fue empleado en este experimento obteniéndose un valor de Df de 1.768 ± 0.003 . Esta dimensión fractal es consistente con un mecanismo de agregación limitada por difusión (DLA)¹³⁶ y es característica de agregados con una distribución polidispersa, donde se exponen sitios adicionales de nucleación.¹²⁸ En este mecanismo se caracteriza porque la velocidad de agregación se encuentra determinada por la colisión de las partículas con escasa carga superficial, la cual depende de la difusión de estas. Generalmente en este tipo de agregación da lugar a estructuras con una geometría característica y que puede ser descrita mediante una Df entre 1.7-1.8.^{128,137}

La relación existente entre el potencial Z bajo y la tendencia a la auto-agregación mediante DLA fue previamente observado en diversos sistemas coloidales y proteínas en condiciones de baja fuerza iónica. Considerando esto, se puede hipotetizar que el proceso de agregación mediante DLA sobre la superficie puede deberse a que las partículas de gliadina poseen una baja carga superficial a pH 3.0. De esta manera la inestabilidad de las partículas, podría ser descrita por la teoría DLVO, la cual sostiene que esta inestabilidad depende de las fuerzas de van der Waals y electrostáticas establecidas entre partículas discretas que se encuentran en la solución, describiendo un movimiento del tipo browniano. Esto ha sido descrito en sistemas complejos como la sericina, proteína soluble de la seda.¹²⁸

¹³⁶ P. Ossadnik, Chi-Hang Lam y Leonard M. Sander, 'Nonuniversal diffusion-limited aggregation and exact fractal dimensions' (Pt American Physical Society) (1994) 49(3) *Physical Review E* R1788.

¹³⁷ M. Y. Lin et al, 'Universal reaction-limited colloid aggregation' (Pt American Physical Society) (1990) 41(4) *Physical Review A* 2005.

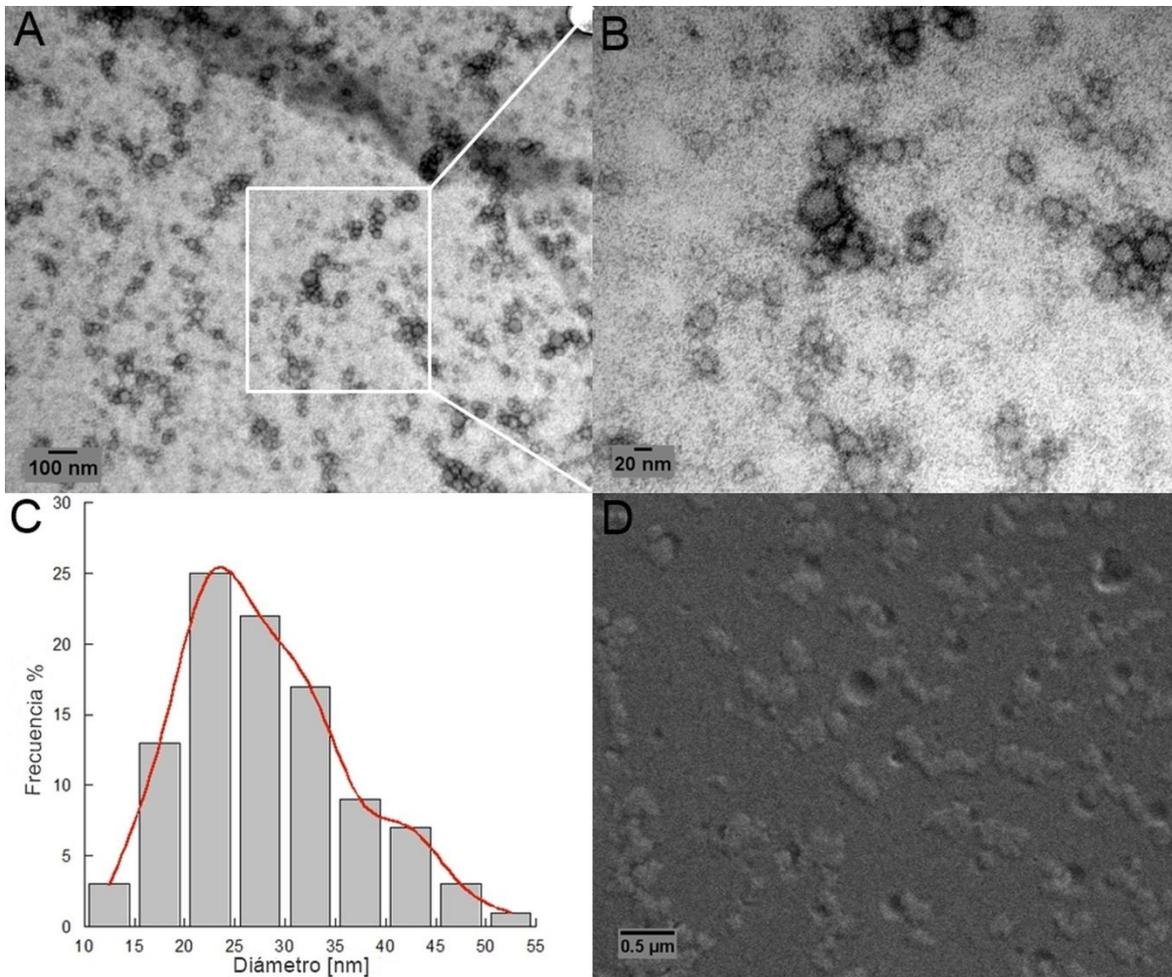


Figura 17. Imagen de Microscopía Electrónica cuando se alcanza el pH 7.0, 10 mM NaCl. A) Imágenes TEM mostrando la estructura de las partículas de la gliadina B) Zoom de la imagen A) mostrando los diferentes tamaños de las partículas. C) Distribución de los diámetros de las estructuras observadas en A). D). Imagen SEM de las partículas y los agregados amorfos depositados sobre una superficie de vidrio.

A pH 7.0, se detectaron clusters o agrupamiento de nano-estructuras de gliadina, con un diámetro promedio de 27.8 nm (Figura 17 C) y agregados de tipo amorfo, fueron observados mediante TEM y también SEM. Ambas microscopías confirman que el sistema se encuentra altamente agregado, tal como se detectó mediante el cálculo del I.A. a través de espectroscopia UV-Visible. Otros trabajos sobre agregación de gliadina previos han enfatizado la importancia que las condiciones de la solución como un factor determinante en el tamaño y la morfología los agregados

de gliadina.¹³⁸

3.3.2. Dicroísmo Circular (CD).

La estructura tridimensional de las diferentes isoformas de la gliadina no ha podido ser establecida. Sin embargo a través de diversos métodos es posible estudiar su estructura secundaria y las variaciones de la misma. Para ello realizamos espectros de dicroísmo circular en la región lejana de UV (CD).¹³⁹ Esta técnica permite determinar el contenido de cada una de las estructuras secundarias que posee una proteína y se lleva a cabo en solución.¹⁴⁰ Estudios previos han establecido que la gliadina se encuentra mayormente compuesta por estructuras del tipo α -hélice y del tipo desordenada.¹⁴¹ Teniendo en cuenta que la muestra se encuentra constituida por una mezcla de proteínas, no fue posible obtener espectros en relación a su composición molar, sin embargo se puede obtener información cualitativa de ambas dispersiones si se trabaja a una relación en peso similar. Tanto a pH 3.0 y como a pH 7.0 se obtuvo un patrón estructural similar, por lo que a ambos pHs se observó una composición de estructura del tipo desordenado y α -hélice. Siendo en ambas condiciones la relación $\lambda_{208} / \lambda_{222}$ de 1.8. Este resultado se encuentra en concordancia con el presentado por Kasarda *et. al.* para la proteína α gliadina a pH 3.0 y 5.0 en ácido acético y baja fuerza iónica. Es importante destacar, que Kasarda *et. al.* no observó diferencia estructura entre las fibrillas de gliadina y aquella dispersa en solución.¹⁴¹ Otros autores han repostado CD de mezclas de gliadina que presentan un comportamiento estructural similar a la α -gliadina.⁶¹ Teniendo en cuenta el experimento de SDS-PAGE, donde a pH 7.0 se observa que la solución se encuentra fundamentalmente formada por α -gliadina, este resultado era esperable. La diferencia observada en ambos espectros puede deberse a las diferencias en la concentración de proteína debido a errores en

¹³⁸ C. Duclairoir et al, 'Gliadin nanoparticles: formation, all- trans-retinoic acid entrapment and release, size optimization' (Pt John Wiley & Sons, Ltd.) (1999) 48(4) *Polymer International* 327.

¹³⁹ V. I. Doderó, Z. B. Quirolo y M. A. Sequeira, 'Biomolecular studies by circular dichroism' (2011/01/05) (2011) 16 *Front Biosci* 61.

¹⁴⁰ N. J. Greenfield, 'Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure' (2006) 1(6) *Nat Protoc* 2876.

¹⁴¹ D. D. Kasarda, J. E. Bernardin y W. Gaffield, 'Circular dichroism and optical rotatory dispersion of alpha-gliadin' (1968/11/01) (1968) 7(11) *Biochemistry* 3950.

la estimación por pesada.

Es importante destacar que este experimento de CD muestra que la desnaturalización no es uno de los factores que inducen a la auto-agregación de este sistema, ya que la estructura secundaria se mantiene en ambas condiciones.

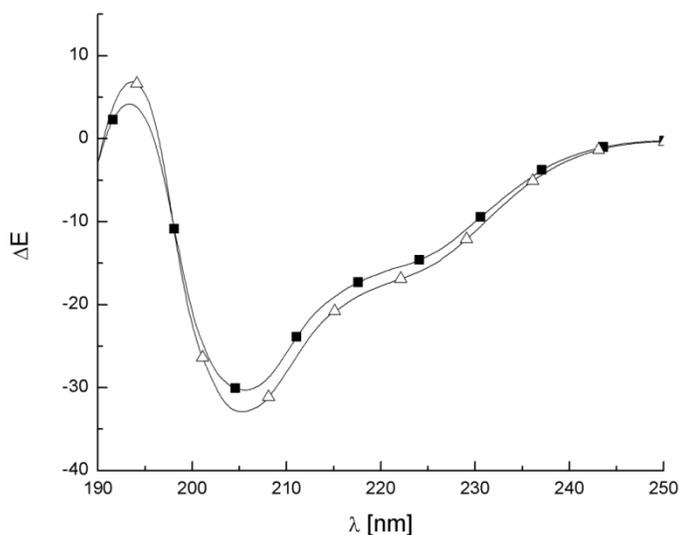


Figura 18. Dicroísmo Circular de la gliadina en agua a pH 3.0, 10 mM NaCl (Δ) y cuando se alcanza el pH 7.0 (■).

3.4. Predicción de propiedades estructurales de la gliadina a través de métodos Bioinformáticos.

Teniendo en cuenta la complejidad del sistema aquí descrito, debido a que se encuentra constituido por diferentes proteínas, es que recurrimos a la utilización de métodos computacionales, con el fin de predecir algunas propiedades estructurales. Considerando que las muestras analizadas en este capítulo estaban conformadas fundamentalmente por α y β gliadinas, se ha decidido elegir dos secuencias representativas de la base de datos de UniProt. Se eligió la secuencia de la alfa gliadina, utilizada por *Shan et. al.*⁵³ para sus experimentos (Código Q9M4L6). Además, se utilizó la secuencia de una fracción conocida como α/β por su peso molecular intermedio entre ambas fracciones, empleada por *Rasheed et al* en sus estudios de caracterización estructural (Código P18573).⁶² Las secuencias correspondientes a estas proteínas se encuentran en la Tabla 3.

aminoácidos serina y valina, 5.2-5.5% y 5.2% respectivamente. En cuanto a los residuos aromáticos, la tirosina y la fenilalanina constituyen un 3.1-3.9% del total de los aminoácidos, mientras que el triptófano se encuentra en un porcentaje del 0.3%, correspondiéndose este porcentaje a un residuo por cadena. Esta observación se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos mediante espectroscopia UV-Vis, en el cual se observó una elevada relación Tyr / Trp.

Al analizar los puntos isoeléctricos, es posible observar que tanto a pH 3.0 como 7.0, ambas proteínas se encontrarían cargadas positivamente, siendo mayor la carga neta en la primera condición. Esto permite corroborar los valores positivos de Potencial Z obtenidos previamente a ambos pHs.

El índice alifático es una medida que representa el volumen relativo ocupado por las cadenas alifáticas (principalmente alanina, valina, isoleucina y leucina). Este valor siempre es positivo. Cuando los valores de este índice son mayores a 80, indica que la proteína presenta una elevada estabilidad termodinámica de proteínas globulares. La fórmula utilizada normalmente para obtener este valor se presenta a continuación:

$$\text{Índice Alifático} = X(\text{Ala}) + 2.9 * X(\text{Val}) + 3.9 * (X(\text{Ile}) + X(\text{Leu}))$$

Donde $X(\text{Ala})$, $X(\text{Val})$, $X(\text{Ile})$ y $X(\text{Leu})$ es el porcentaje molar de los aminoácidos alanina, valina, isoleucina y leucina respectivamente. Sin embargo cuando existe un alto contenido de prolina, este aminoácido debe ser considerado. Para ello se suma el término $2.4 X(\text{Pro})$, siendo $X(\text{Pro})$, el porcentaje molar de este aminoácido. Esto fue considerado en la obtención de este índice.¹⁴³

Para ambas secuencias de gliadinas analizadas, se observó que existe un elevado índice alifático, lo cual indica que estas proteínas poseen una elevada estabilidad termodinámica. Esta estabilidad es en gran parte dada por el elevado porcentaje de prolina presente en su estructura

¹⁴³ A. Ikai, 'Thermostability and aliphatic index of globular proteins' (1980) 88(6) *J Biochem* 1895.

primaria.

Por otro lado, se determinó el valor GRAVY (Grand Average of Hydropathy), el cual es un promedio de la hidropatía (hidrofobicidad / hidrofiliidad) de los aminoácidos, dividido por el número de residuos presentes en la secuencia. Cuando este valor es positivo, indica una elevada presencia de grupos hidrofóbicos en la cadena polipeptídica, mientras que valores negativos indican una predominancia de grupos hidrofílicos. Es así que para proteínas solubles, se estima un valor de GRAVY de -0.4.¹⁴⁴ Las secuencias de gliadinas analizadas demostraron valores de estos parámetros negativos y mayores a los esperados para proteínas globulares en promedio. Esto puede deberse al elevado contenido del aminoácido glutamina. Las glutaminas posiblemente disminuyen la hidrofobicidad media de estas proteínas y ya que se podrían exponer en la superficie en contacto con el solvente, donde estabilizarían las estructuras en solución a través de la formación de interacciones del tipo puente hidrógeno.

3.4.1. Predicción de la existencia de regiones hidrofóbicas y regiones accesibles al solvente.

La predicción de regiones hidrofóbicas, de sectores expuestos al solvente y la polaridad de una proteína son de gran importancia para evaluar el plegamiento de estas moléculas. Existen diversos métodos de predicción de regiones hidrofóbicas, entre ellos se encuentra el de Kyte-Doolittle. En este se le asigna un valor positivo a los aminoácidos apolares y negativos a los polares. A continuación se elige una ventana, generalmente de nueve residuos para las proteínas globulares (del uno al nueve) y se promedian los valores de hidrofobicidad. Este nuevo valor se le asigna al aminoácido que se encuentra en la mitad de la secuencia utilizada. Luego la ventana se corre un aminoácido (del dos al nueve) por lo que se vuelve a hacer el mismo procedimiento. Realizando este protocolo en toda la cadena polipeptídica es posible obtener un gráfico de hidrofobicidad. Aquellas regiones que presentan un valor mayor a cero, son zonas hidrofóbicas.¹⁴⁵

¹⁴⁴ J. Kyte y R. F. Doolittle, 'A simple method for displaying the hydropathic character of a protein' (1982) 157(1) *Journal of Molecular Biology* 105.

¹⁴⁵ S. Choudhuri, 'Chapter 8 - Additional Bioinformatic Analyses Involving Protein Sequences' in Supratim Choudhuri (ed), *Bioinformatics for Beginners*, 183-207, Academic Press, (2014)

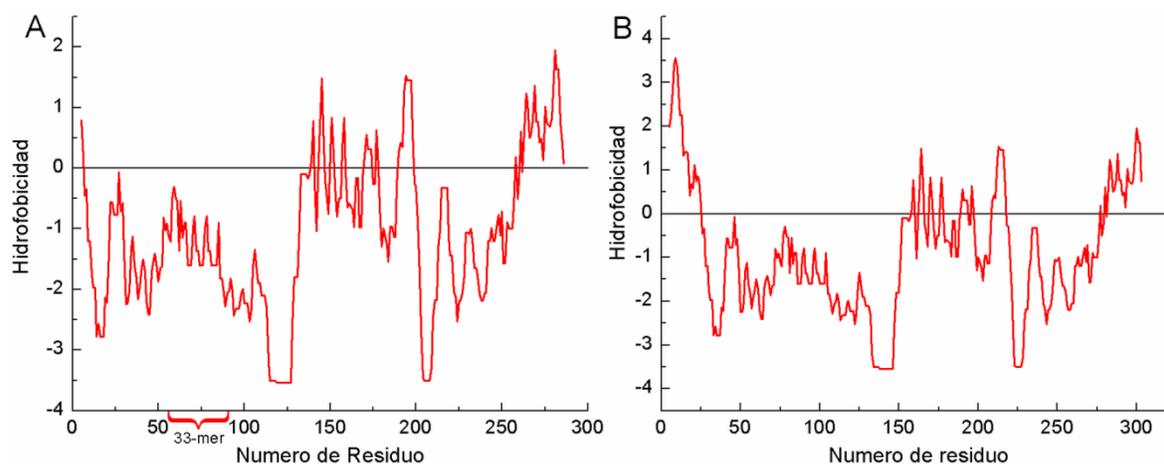


Figura 19. Gráficos de hidrofobicidad utilizando los parámetros de Kyte-Doolittle de las proteínas A) α -gliadina y B) α/β gliadina. En A se encuentra marcada la región correspondiente al péptido 33-mer.

Mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle se pudo establecer que la α -gliadina, posee sitios hidrofóbicos en la región comprendida entre los residuos 150 a 200 y desde el 250 al final de la secuencia, comprendiendo zonas hidrofóbicas que abarcan entre 5-10 residuos. Es interesante destacar que el fragmento desde 56-89, correspondiente al péptido 33-mer se encuentra en una región hidrofílica, posiblemente a causa de su alto contenido en glutamina. En consecuencia, podría encontrarse expuesto en la estructura tridimensional de la proteína. En la isoforma α/β también se encuentran una región hidrofóbica extensa, comprendida entre los aminoácidos 1-25, y seis regiones hidrofóbicas cortas comprendidas entre los residuos 158-217. Luego se observa otra amplia región hidrofóbica en el final de la cadena, que comprende la región de los residuos 282-303. La presencia de estas regiones en la secuencia podría favorecer a la formación de contactos entre las moléculas de gliadina a través de interacciones hidrofóbicas. De esta manera podría favorecerse la formación de las nano-partículas observadas.

Teniendo en cuenta que muchas veces las zonas hidrofílicas pueden presentar una exposición diferencial al solvente, afectando así las propiedades de la moléculas, se decidió determinar este parámetro. Para ello se utilizó el predictor ACCpro. Este servidor se caracteriza porque utiliza la información de accesibilidad al solvente del Protein Data Bank, y se genera un set de perfiles

mediante BLAST y PSI-BLAST , por lo que se alinean secuencias. Mediante esta técnica se computan correlación estadística en detalle de los contactos y la accesibilidad del set de alineamientos generados para la proteína de interés. Este servidor utiliza arquitecturas computacionales interconectadas que pueden procesar grandes cantidades de datos y combinar la información de largo rango. Estos métodos junto a los perfiles evolutivos permiten obtener buena estadística en la resolución de la accesibilidad al solvente. Este ha sido reconocido por presentar resultados 4-7 % mejores que otro método previamente usado.^{146,147}

Alfa -Gliadina, >tr Q9M4L6 Q9M4L6_WHEAT Alpha-gliadin OS=Triticum aestivum
MVRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQLVPLVQQQQ ³⁰ FPGQQQFFPPQQPYQPQPFPSQQPYLQLQ ⁶⁰ FFPQPQLPYP ⁷⁰ eee-eeeeeeeeeeeeeeeeeeee-eeee eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee-eee eeeeeeeeeee QPQLPYPQPQLPYPQPQFRPQQPYPQSQP ¹⁰⁰ QYSQPQQPISQQQQQQQQQQKQQQQQQ ¹³⁰ QILQQILQQQ ¹⁴⁰ eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee eeeee-eee LIPCRDVVLQQHSIAYGSSQVLQQSTYQLV ¹⁷⁰ QQGCCQLWQIPEQSRCAIHNVVHAIILH ²⁰⁰ QQQQQQQQQQ ²¹⁰ -ee-ee-----e-eeeeee-eeee-e-- -ee--ee-ee-eeee-ee-ee-----e eeeeeeeee QQPLSQVSFQQPQQYPSGQGSFQPSQQNP ²⁴⁰ QAQGSVQPQQLPQFEEIRNLALETLPAMCN ²⁷⁰ VYIPPYCTIA ²⁸⁰ Eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee eeeee-eeeeee-ee-e-----e-ee--e -e---e---- PVGIFGTNYR ²⁹⁰ e-ee---eee
Alfa / Beta Gliadina, >sp P18573 GDA9_WHEAT Alpha/beta-gliadin MM1 OS=Triticum aestivum
MKTFLILALLAIVATTARIAVRVPVPLQLP ³⁰ QNPSSQQQPQEQLVPLVQQQQFPGQQQFFPPQ ⁶⁰ QPYQPQPF ⁷⁰ ee-----e---e-eeeeee eeeeeeeeeee-eeeeeeeeeeeeeeee eeeeeeeeeee SQQPYLQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQL ¹⁰⁰ PYPQPQFRPQQPYPQSQPQYSQPQQPISQ ¹³⁰ QQQQQQQQQQ ¹⁴⁰ eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee- eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee eeeeeeeeeee QKQQQQQQQILQQILQQQLIPCRDVVLQQ ¹⁷⁰ HSIAYGSSQVLQQSTYQLVQQGCCQLWQI ²⁰⁰ PEQSRCAIH ²¹⁰ eeeeeeeeeeeeeeeeeee-ee-ee-ee- -eeeeee-ee-eee--e--eee--ee-ee- eeeee-e--- NVVHAIILHQQQQQQQQQQQPLSQVSFQQ ²⁴⁰ PQQYPSGQGSFQPSQQNPQAQGSVQPQQ ²⁷⁰ PQFEEIRNLA ²⁸⁰ -----eeeeeeeeeeeeeeeeeeee eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee ee-ee-e--- LETLPAMCNVYIPPYCTIAPVGIPTN ³⁰⁷ -e--ee--e-e---e-----e-ee-eee

Tabla 5. En esta representación se presenta las accesibilidades al solvente de la proteína α y la α/β gliadina. La letra e corresponde a un aminoácido accesible y - a un residuo ubicado en el interior de la proteína.

Mediante este cálculo se pudo determinar que un porcentaje elevado de los aminoácidos se

¹⁴⁶ G. Pollastri et al, 'Prediction of coordination number and relative solvent accessibility in proteins' (2002) 47(2) *Proteins* 142.

¹⁴⁷ J. Cheng et al, 'SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server' (2005) 33(Web Server issue) *Nucleic Acids Res* W72.

encuentran expuestos al solvente en ambas estructuras proteicas, tal como se observó en los gráficos de hidrofobicidad. Teniendo en cuenta ambos resultados es posible hipotetizar que ambas gliadinas son estructuras parcialmente ordenadas con regiones hidrofóbicas que involucran pequeñas regiones de 5-10 residuos y además posee una elevada exposición de sus residuos al solvente.

3.4.2 .Predicción de estructura de gliadina seleccionadas mediante el software I-TASSER.

La estructura tridimensional de la gliadina no se ha podido determinar, ya que esta proteína no se ha podido cristalizar ni estudiar mediante RMN. Sin embargo se puede proponer una estructura de la proteína utilizando métodos Bioinformáticos. Existen tres clases de estos, los métodos de modelado comparativo, que usa como patrón una proteína homóloga, es decir con secuencia similar pero de estructura conocida. Otro es el método en el que se compara la secuencia proteica con otras secuencias cuya estructura se conoce pero que no está relacionada evolutivamente a la proteína incógnita. Por último, existen aquellas proteínas cuya estructura no se conoce y que debe ser modelada *ab initio*. Este se corresponde al caso más complejo.¹⁴⁸

En este caso se realizó un modelo *ab initio* de las dos secuencias seleccionadas, para ello se decidió utilizar el servidor I-TASSER. Este ha presentado una excelente actuación en los experimentos internacionales denominados Evaluación Crítica de la predicción de estructura de proteínas (The Critical Assessment of protein Structure Prediction (CASP)), que se realizan para evaluar la eficacia de los métodos de predicción de estructura. Esto demuestra que I-TASSER es un servidor adecuado para predecir estructuras proteicas.¹⁴⁹ Este aplica varias metodologías y pasos para predecir la estructura secundaria y terciaria de una proteína incógnita. I-TASSER se caracteriza porque predice la estructura de una proteína utilizando diferentes etapas con distintos métodos para obtener de esa manera una estructura con una adecuada estadística. Estos pasos involucran la identificación de proteínas con patrones similares en estructura o motivos similares utilizando el

¹⁴⁸ A. Roy, A. Kucukural e Y. Zhang, 'I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction' (2010) 5(4) *Nat Protoc* 725.

¹⁴⁹ Y. Zhang, 'I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8' (2009) 77 Suppl 9 *Proteins* 100.

Conf	87675555400412544301013100035	673513353447761246677644331238	6332465201
Sec	NVVHAIILHQQQQQQQQQQPLSQVSFQQ ²⁴⁰	PQQQYPSGQGSFQPSQQNPQAQGSVQPQQ ²⁷⁰	PQFEEIRNLA ²⁸⁰
Est	HHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	CCCCCCCCSSCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	HHHHHHHHHH
Conf	233101145012564424136654555341	454343541022575442477563476351	1566666555
Sec	LETLPAMCNVYIPPYCTIAPVGIFGTN ³⁰⁷		
Est	HCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC		
Conf	413700071526986654565655679		

Tabla 6. Predicción de la estructura secundaria de la α y α/β gliadina mediante el uso de I-TASSER, en la que se presenta la secuencia (Sec), la estructura (Est) y el grado de confianza en la predicción (Conf). En la predicción estructural, C corresponde a una estructura desordenada o coil, H a una estructura del tipo Helicoidal, S una estructura tipo beta. El grado de confianza es un parámetro que va de 0-9, donde 0 es muy bajo y 9 corresponde al mayor nivel de confianza.

En este caso se predijo que las gliadinas α/β y α presentan una estructura secundaria conformada preferentemente por una estructura desordenada o random coil, y en ciertas regiones hay un predominio de estructuras helicoidales. Solo en la α/β existen regiones de hebras beta de escasa longitud. Estas predicciones se encuentran en concordancia con los resultados experimentales observados mediante CD y los reportados previamente en la bibliografía.

Por otro lado se obtuvo varios modelos tridimensionales de ambas proteínas, los cuales se presentan a continuación. De estos se eligieron aquellos que tenían el mayor C-Score. Este parámetro es un valor de confianza que estima la calidad del modelo predicho. Este es obtenido considerando la estadística de los alineamientos y las simulaciones llevadas a cabo por I-TASSER. Los valores típicos se encuentran entre [-5,2], cuanto mayor es el valor de C-Score mayor es la confianza del modelo predicho.

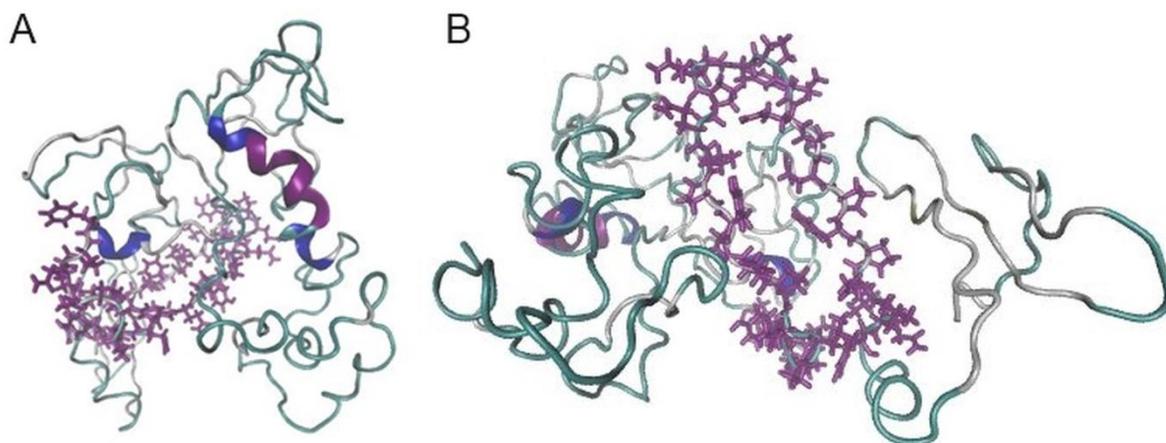


Figura 20. Representaciones tridimensionales frontal A) y lateral B) de la proteína α -gliadina obtenida mediante I-TASSER y representada utilizando el programa Visual Molecular Dynamics (VMD). Las cadenas laterales correspondientes al péptido 33-mer se encuentran representadas en violeta.

La estructura de la α -gliadina fue predicha con un C-Score -3.37, por lo que la predicción fue obtenida con un grado de confianza regular. En la estructura tridimensional se observa un alto contenido de estructura desordenada y tres regiones helicoidales. El péptido 33-mer marcado en la Figura 20 B se observa en la región media de la molécula, formando parte de una región similar a un loop de la molécula. Es notable destacar que la estructura tridimensional predicha indicaría que la misma presenta una alta exposición de sus aminoácidos ya que no se observa la formación de una región hidrofóbica compacta. Esto concuerda con la exposición al solvente obtenida previamente.

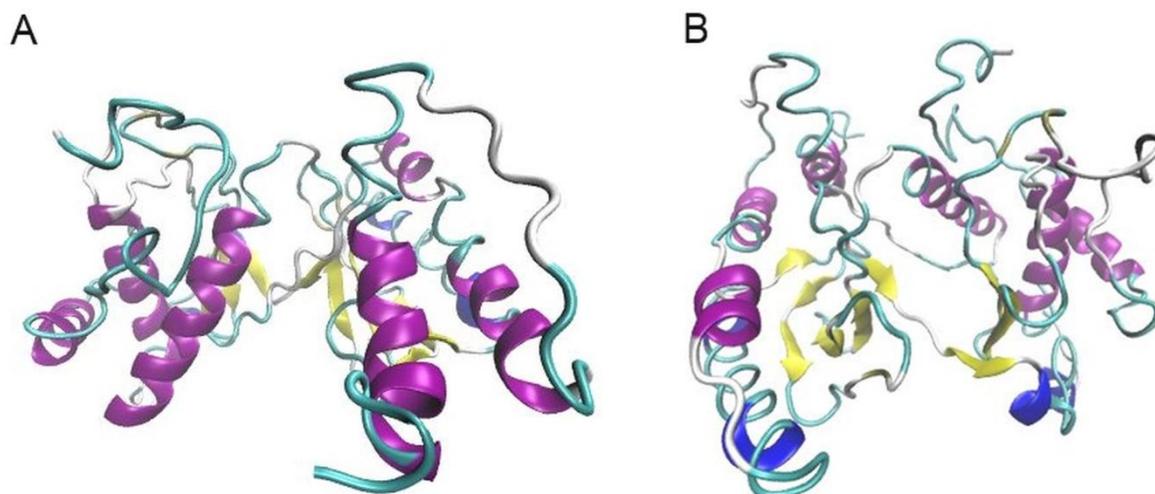


Figura 21. Representaciones tridimensionales de la región frontal A) e inferior B) de la proteína α/β -gliadina obtenida mediante I-TASSER y representada utilizando el programa Visual Molecular Dynamics (VMD). Las cadenas laterales correspondientes al péptido 33-mer se encuentran representadas en violeta.

La α/β -gliadina fue predicha con un C-Score -3.19, por lo que la predicción fue obtenida con un grado de confianza regular. En la figura 21 se puede observar la estructura tridimensional predicha para esta proteína en la que se observa un mayor orden estructural con respecto a la α - gliadina, detectándose un alto contenido de regiones helicoidales y del tipo β . Esta estructura es más compacta que la α - gliadina, sin embargo no presenta una región interna hidrofóbica extensa. Los aminoácidos se encontrarían en gran medida expuestos al solvente, corroborando los resultados de accesibilidad al solvente previamente obtenidos.

3.4.3. Predicción de regiones con propensión a agregarse.

Muchas proteínas presentan regiones con una alta capacidad de agregarse y formar estructuras amiloides, las cuales inducen la producción de una respuesta inmune. Para evaluar si las dos secuencias de gliadina seleccionadas poseen esta capacidad, se decidió elegir tres predictores ampliamente distintos AGGRESCAN, Tango y Waltz. Estos predictores han sido ampliamente usados para estudiar la capacidad de agregación de diversas mutantes de proteínas amiloidogénicas tales como el péptido β -amiloide¹⁵⁰ y la alfa-sinucleína¹⁵¹ Los mismos utilizan diferentes

¹⁵⁰ R. Sabate et al, "The role of protein sequence and amino acid composition in amyloid formation:

parámetros para determinar la presencia de estas regiones. AGGREGSCAN determina la probabilidad de una región de auto-agregarse basándose en experimentos *in vivo* y asumiendo que ciertas cadenas pequeñas y de secuencia específica pueden modular la agregación.¹⁵² Por otro lado Tango, se basa en principios fisicoquímicos que determinan la formación de una estructura del tipo β , utilizando el concepto que las regiones agregadas se encuentran ubicadas en sitios hidrofóbicos sin contacto con la superficie.¹⁵³ Por último, Waltz determina la capacidad de una proteína de agregarse utilizando una secuencia peptídica de seis residuos, los cuales se consideran como un sitio de agregación y utiliza un algoritmo de comparación en el que se establece la semejanza de la secuencia propuesta con una base de datos de regiones cristalizadas de péptidos.¹⁵⁴

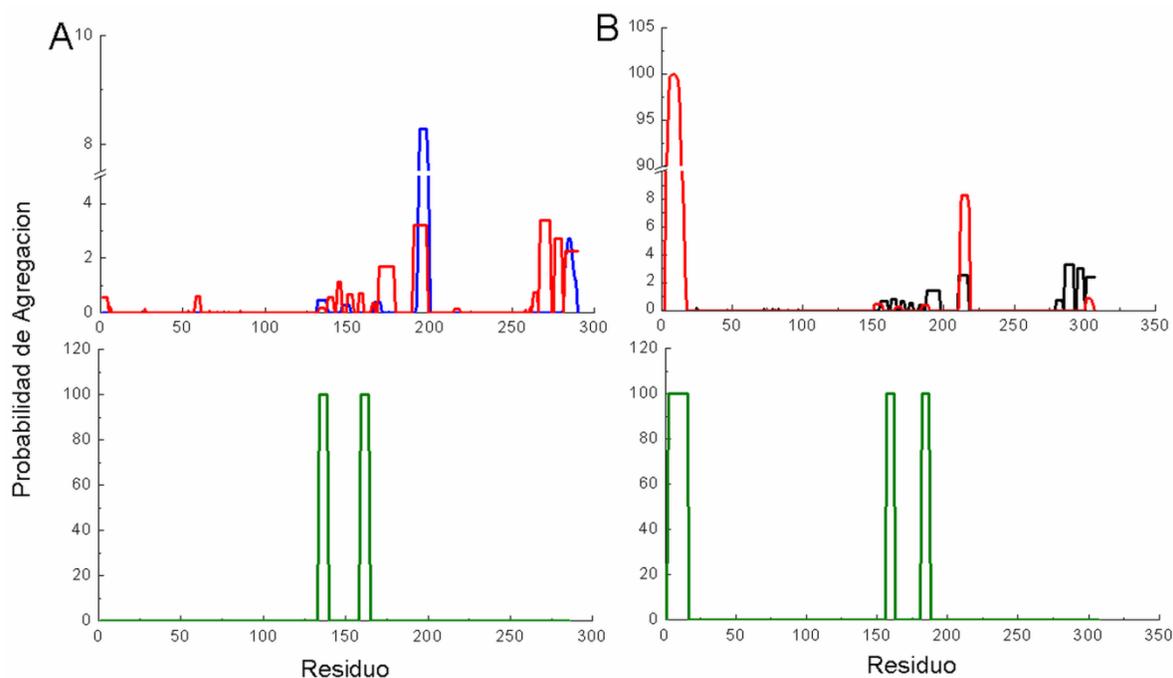


Figura 22. Perfil de agregación obtenido para las proteínas A) α gliadina y B) α/β -gliadina. En color rojo se presenta el resultado obtenido por Tango, en Azul AGGREGSCAN y en verde el de WALTZ.

scrambling and backward reading of IAPP amyloid fibrils' (2010) 404(2) *J Mol Biol* 337.

¹⁵¹ J. I. Gallea and M. S. Celej, 'Structural insights into amyloid oligomers of the Parkinson disease-related protein alpha-synuclein' (2014) 289(39) *J Biol Chem* 26733.

¹⁵² O. Conchillo-Sole et al, 'AGGREGSCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides' (2007) 8 *BMC Bioinformatics* 65.

¹⁵³ A. M. Fernandez-Escamilla et al, 'Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins' (2004) 22(10) *Nat Biotechnol* 1302.

¹⁵⁴ M. Oliveberg, 'Waltz, an exciting new move in amyloid prediction' (2010) 7(3) *Nat Methods* 187.

En el caso de estas proteínas se puede observar que estos algoritmos predicen la existencia de varias regiones con probabilidad de agregarse. Para la α gliadina se proponen como posibles sitios de agregación los residuos 1-8 (Tango), 56-60 (Tango), 71-73 (Tango), 132-142, 144-153 (Tango y AGGRESCAN), 165-178, 190-194 y 261-290 (AGGRESCAN). Para la α/β gliadina los tres algoritmos coinciden en la región comprendida entre los residuos, 2-26, 182-198, 165-180, 211-218 y 300-307. Muchas de estas regiones coinciden con las zonas hidrofóbicas determinadas mediante el perfil de hidrofobicidad y algunas de ellas son regiones con una alta probabilidad de agregación. Esta tendencia podría favorecer a la auto-asociación de las moléculas de gliadina en las nanoestructuras esféricas observadas, lo cual podría ser mediada en primer lugar por interacciones hidrofóbicas. Por otro lado es interesante destacar que Tango predice agregación en la región comprendida por el péptido 33-mer en la α -gliadina, y así se podría explicar la no accesibilidad de las proteasas enzimáticas y la consiguiente resistencia a la proteólisis observada.

3.4.4. Predicción de cortes por enzimas.

La proteína gliadina durante el proceso de digestión es tratada con diferentes proteasas, entre ellas la pepsina, tripsina y quimiotripsina. Utilizando la herramienta Peptide Cutter de la plataforma ExPASy,¹⁴² es posible determinar los sitios teóricos de corte de las mencionadas enzimas. En el caso de la pepsina se seleccionó el pH > 2, mientras que para la quimiotripsina se usó la de baja afinidad. En la tabla 7 se muestran los sitios teórico de corte calculados por este programa.

Alfa -Gliadina, >tr Q9M4L6 Q9M4L6_WHEAT Alpha-gliadin OS=Triticum aestivum		
Enzima	Cantidad de sitios de corte	Posiciones
Pepsina	48	24 31 55 57 58 67 74 81 88 102 132 133 136 137 140 148 149 155 156 161 162 166 167 168 169 172 173 177 178 179 198 199 213 218 219 226 232 251 254 259 261 262 265 271 284 285 288 289
Tripsina	6	3 123 145 186 258 290
Quimiotripsina	35	1 9 25 56 57 59 89 102 133 137 141 149 152 156 162 167 169 173 178 179 191 195 199 200 214 219 233 254 260 262 268 272 276 285 289
Alfa / Beta Gliadina, >sp P18573 GDA9_WHEAT Alpha/beta-gliadin MM1 OS=Triticum aestivum		

Enzima	Cantidad de sitios de corte	Posiciones
Pepsina	53	3 5 6 7 8 9 10 43 50 74 76 77 86 93 100 107 121 151 152 155 156 159 167 168 174 175 180 181 185 186 187 188 191 192 196 197 198 217 218 232 237 238 245 251 270 273 278 280 281 284 290 303 304
Tripsina	7	2 18 22 142 164 205 277
Quimiotripsina	39	1 4 5 7 9 10 28 44 75 76 78 108 121 152 156 160 168 171 175 181 186 188 192 197 198 210 214 218 219 233 238 252 273 279 281 287 291 295 304

Tabla 7. En este esquema se representan los posibles sitios de corte de la α y la isoforma α/β gliadina. En rojo se presentan las regiones en las cuales el 33-mer sufriría corte con estas enzimas.

Es posible observar que existen 99 sitios de corte para la isoforma α/β y 89 para la isoforma α . En el caso de la isoforma α/β , se observa a partir de la estructura tridimensional predicha, que muchos de los sitios de corte se encontrarían en regiones helicoidales que se encontrarían menos expuestas que las regiones desordenadas de la proteína. En el caso de la α -gliadina, esta presentaría un elevado porcentaje de estructura del tipo desordenada, por lo que las enzimas podrían acceder fácilmente a estos sitios.

Considerando los múltiples sitios de corte y las estructuras predichas para estas proteínas, esto indica que teóricamente, estas proteínas no serían resistentes a la proteólisis. Sin embargo en los experimentos *in vitro* realizados, estas secuencias presentan una elevada resistencia a su degradación.⁵³ Además es importante destacar que el péptido 33-mer debería ser cortado en varias posiciones por las enzimas pepsina y quimiotripsina, tal como se presenta en la Tabla 7.

Los resultados bioinformáticos brindan información que apoyaría a nivel molecular los resultados estructurales informados previamente. Teniendo en cuenta las características estructurales y de exposición al solvente descripto mediante estos métodos y el hecho que esta proteína no sea totalmente degradada por las enzimas digestivas, podrían indicar que la proteína se encuentra formando agregados, tales como los descriptos en este capítulo, que no permiten dejar disponibles los sitios de cortes enzimáticos. Además, es interesante destacar que el fragmento 33-

mer se encontraría en sitios hidrofílicos, pero que a la vez este podría ser un fragmento con una potencial capacidad de agregación.

3.5. Evaluación de la características de los sistemas organizados de gliadina pH 3.0 y 7.0 utilizando la sonda fluorescente Rojo Nilo.

En general, los sistemas auto-ensamblados han sido ampliamente estudiados utilizando fluoróforos extrínsecos para evaluar la organización proteica.¹⁵⁵ En particular el Rojo Nilo es una sonda hidrofóbica que es sensible a los cambios en microambientes.¹⁵⁶ Previamente el Rojo Nilo ha sido usado para monitorear cambios estructurales de proteínas como el citocromo P 450¹⁵⁷ y diferentes agregados proteicos¹⁵⁸ como los de la β -galactosidasa,¹⁵⁹ fibras amiloides¹⁶⁰ y ha sido empleado para elucidar intermediarios en el proceso de polimerización de la tubulina.¹⁶¹ En ambientes hidrofóbicos, la fluorescencia del Rojo Nilo se incrementa y sufre un desplazamiento de su máximo de emisión al azul.^{156, 162} Por otro lado, el gran corrimiento hacia el azul (de 108 nm desde hexano al agua), permite que puedan excitarse diferentes moléculas ubicadas en diversos entornos de polaridad. Debido a esto, el Rojo Nilo posee una emisión dependiente de la excitación cuando existe micro-dominios de diferente polaridad en el sistema estudiado. Es así que se puede excitar diferencialmente moléculas de Rojo Nilo ubicadas en distintos entornos de

¹⁵⁵ L. A. Munishkina y A. L. Fink, 'Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins' (2007) 1768(8) *Biochim Biophys Acta* 1862.

¹⁵⁶ P. Greenspan y S. D. Fowler, 'Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red' (1985) 26(7) *J Lipid Res* 781.

¹⁵⁷ A. Nath et al, 'Spectral resolution of a second binding site for Nile Red on cytochrome P4503A4' (2008) 474(1) *Arch Biochem Biophys* 198.

¹⁵⁸ R. A. Poole et al, 'Fluorescence Spectroscopy to Characterize Protein Aggregates and Particles', *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*, 201-226.

¹⁵⁹ M. Sutter et al, 'Sensitive spectroscopic detection of large and denatured protein aggregates in solution by use of the fluorescent dye Nile red' (2007) 17(2) *J Fluoresc* 181.

¹⁶⁰ R. Mishra, D. Sjolander y P. Hammarstrom, 'Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile red' (2011) 7(4) *Mol Biosyst* 1232.

¹⁶¹ D. L. Sackett, J. R. Knutson y J. Wolff, 'Hydrophobic surfaces of tubulin probed by time-resolved and steady-state fluorescence of Nile red' (1990) 265(25) *J Biol Chem* 14899.

¹⁶² M. C. A. Stuart, J. C. van de Pas y J. B. F. N. Engberts, 'The use of Nile Red to monitor the aggregation behavior in ternary surfactant-water-organic solvent systems' (2005) 18(9) *Journal of Physical Organic Chemistry* 929.

hidrofobicidad.¹⁶³ Esta propiedad resulta una excelente posibilidad para determinar las características de los agregados de gliadina a los pH 3.0 y 7.0 mediante la unión del Rojo Nilo. Cuando el Rojo Nilo es excitado a los 552 nm o 590 nm, el espectro de emisión deriva de la interface polar, por lo que se ha seleccionado ambas longitudes de onda para estudiar la capacidad de unión de esta sonda a este sistema proteico. La λ_{\max} emisión puede ser precisamente determinada mediante la realización de la derivada segunda del espectro.¹⁶³

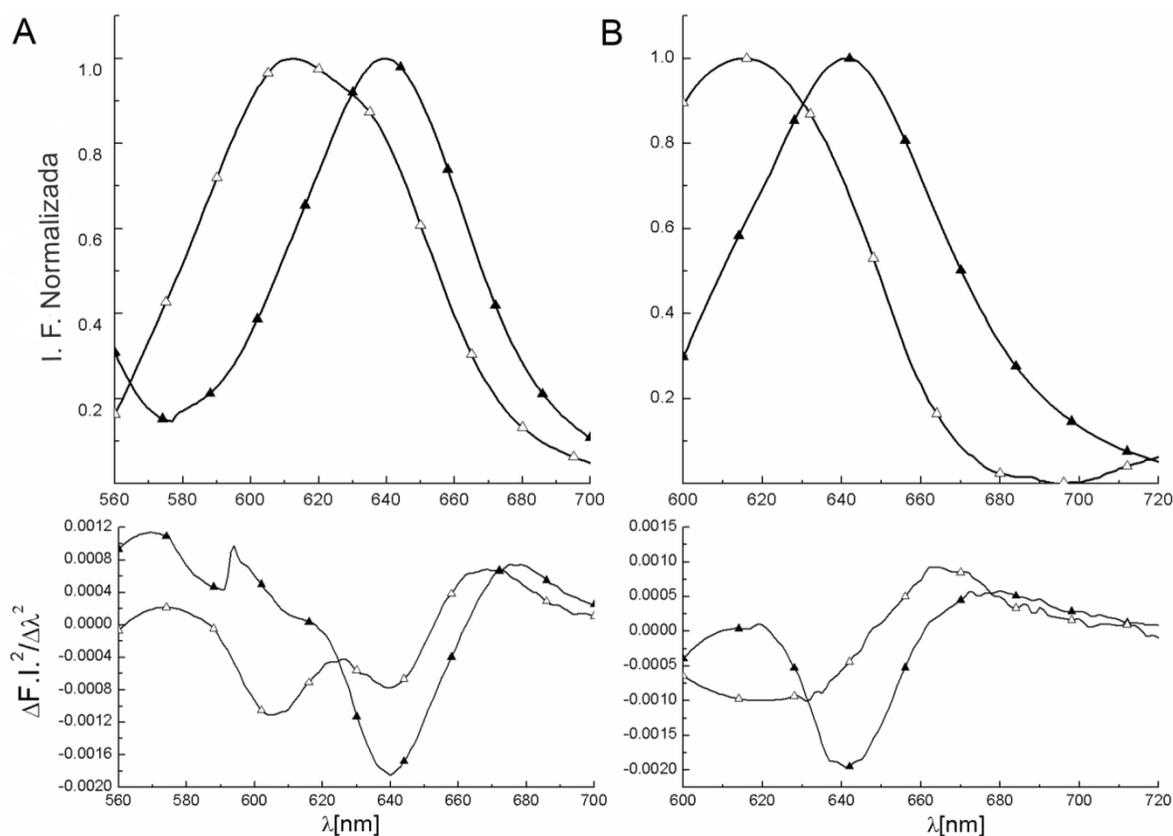


Figura 23. Espectros de Emisión de Fluorescencia Normalizada de las soluciones de gliadina a pH 3.0, NaCl 10mM (Δ), y agua (\blacktriangle) en las mismas condiciones. Longitudes de excitación A) 552 nm y B) 590 nm. Debajo de cada gráfico se observa la correspondiente derivada segunda.

Inicialmente se evaluó la dependencia de la excitación/ emisión del Rojo Nilo en agua a pH 3.0 y 7.0, NaCl 10 mM, excitando la muestra a 552 nm y 590 nm, resultando en ambos pHs una longitud máxima de emisión en 640 nm (Figura 23 y 24). Cuando se realizó la medición en el sistema de

¹⁶³ C. Lin, J. Zhao y R. Jiang, 'Nile red probing for the micelle-to-vesicle transition of AOT in aqueous solution' (2008) 464(1-3) *Chemical Physics Letters* 77.

gliadina a pH 3.0, excitando a la muestra a 552 nm, el máximo de emisión sufrió un corrimiento hipsocrómico a 608 nm, aunque la banda a 640 nm permanece como se observa claramente en el espectro de la deriva segunda (Figura 23 A). Al excitar la muestra a 590 nm se observó también un corrimiento hacia el azul del máximo a 620 nm (Figura 23 B), sin embargo esta banda es ancha por lo que se sugiere la existencia de regiones de polaridad ligeramente distinta. El cambio de posición del máximo de emisión del Rojo Nilo es consistente con la presencia de agregados auto-organizados de gliadina, que poseen sitios de unión con el colorante Rojo Nilo. Considerando la existencia de cambios en la absorbancia del Rojo Nilo con la polaridad del medio, cuando la sonda se ubica en sitios hidrofóbicos, puede ser excitada a una longitud de onda menor y emite también a longitudes de onda menores. Sin embargo, se determinó que esta sonda reside en una cavidad en la cual puede enfrentarse al solvente, por lo que puede excitarse y emitir a mayores longitudes de onda. El corrimiento observado hacia el azul, a 608 nm fue previamente reportado en el caso de micelas inversas¹⁶³ y agregados de β -galactosidasa.¹⁵⁹

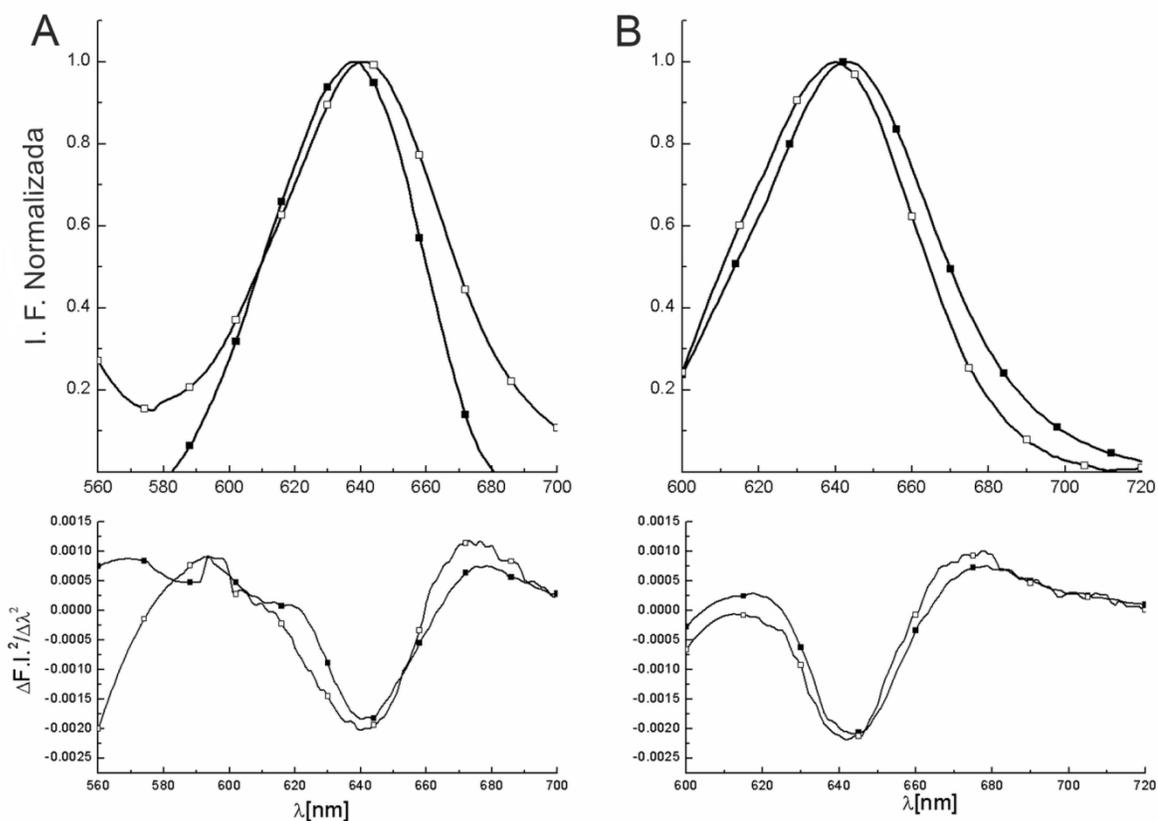


Figura 24. Espectros de Emisión de Fluorescencia Normalizada de las soluciones de gliadina a pH 7.0, NaCl 10mM (Δ), y agua (\blacktriangle) en las mismas condiciones. Longitudes de excitación A) 552 nm y B) 590 nm. Debajo de cada gráfico se observa la correspondiente derivada segunda.

Por otro lado, a pH 7.0 no se observó una dependencia de la emisión dependiente de la excitación tanto a 552 nm como a 590 nm y la λ_{\max} de emisión fue similar a la observada en el agua a dicho pH (Figura 24).

Estos resultados demuestran que la naturaleza superficial de los agregados de gliadina a ambos pHs es diferente. A pH 3.0 se hace evidente la presencia de regiones hidrofóbicas, mientras que a pH 7.0 la sonda no es capaz de interactuar con el sistema proteico, posiblemente porque no existen sitios hidrofóbicos accesibles, lo que se correlaciona con la presencia de agregados del tipo coloidal compacto.

Para cuantificar la interacción de la unión del Rojo Nilo, se llevó a cabo una titulación incrementando la concentración de la sonda, mientras que la concentración de proteína se mantiene

prácticamente constante. Se eligió excitar a la muestra a 552 nm, región del espectro del Rojo Nilo que permite evaluar regiones de hidrofobicidad media.

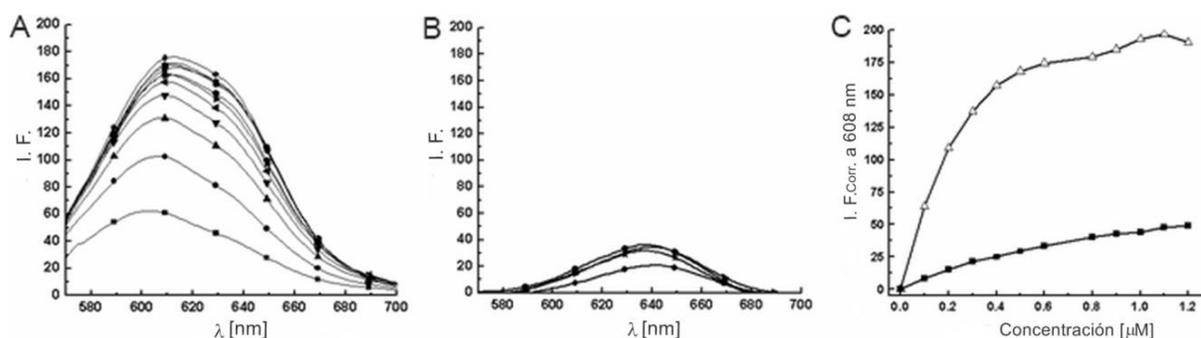


Figure 25. Titulación de las soluciones de gliadina con Rojo Nilo. Espectros de emisión de las soluciones de gliadina a A) pH 3.0, concentración final de la sonda: 0.1 μM (\blacksquare), 0.2 μM (\blacklozenge), 0.3 μM (\blacktriangle), 0.4 μM (\blacktriangledown), 0.5 μM (\blacktriangleleft), 0.6 μM (\blacktriangleright), 0.8 μM (\blacklozenge), 0.9 μM (\bullet), 1.0 μM (\star), 1.1 μM (\bullet), 1.2 μM (\blacksquare) y B) a pH 7.0, concentración final de la sonda: 0.2 μM (\blacklozenge), 0.6 μM (\blacktriangleright), 0.9 μM (\bullet), 1.1 μM (\bullet). A pH 7.0 no se observó unión del Rojo Nilo. C) Curvas de unión de la sonda a pH 3.0 a 610 nm. En este gráfico se presenta la unión específica (\triangle) y el ligando libre (\blacksquare). En todos los espectros la contribución del agua fue sustraída.

La titulación con Rojo Nilo a pH 3.0 presentó un corrimiento desde 599 a 608 nm cuando se incrementa la concentración y se observó la presencia de una banda a 640 nm, que se hace más evidente a mayores concentraciones. Las constantes de disociación aparente fueron llevadas a cabo a la λ_{max} 608 nm fue de $0.180 \pm 0.08 \mu\text{M}$. El corrimiento de la banda al azul (λ_{max} 608 nm) es típico de moléculas de Rojo Nilo incorporadas en sitios hidrofóbicos en la superficie de la proteína o agregados del tipo core-shell, micelas o vesículas.^{163, 164, 165, 166} La existencia de un corrimiento hacia el rojo muestra diferentes sitios hidrofóbicos que son accesibles al Rojo Nilo de manera diferencial. Además, la aparición de un hombro a longitudes de onda mayores ha sido observado en agregados del citocromo P450 3A4¹⁵⁷ y filamentos de tubulina.¹⁵⁹ Estas características espectrales observadas permiten hipotetizar que la sonda posee dos sitios de unión distintos en las nano-

¹⁶⁴ J. F. Deye, T. A. Berger y A. G. Anderson, 'Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids' (Pt American Chemical Society) (1990) 62(6) *Analytical Chemistry* 615.

¹⁶⁵ R. A. Poole et al, 'Fluorescence Spectroscopy to Characterize Protein Aggregates and Particles', *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals* (John Wiley & Sons, Inc., 2012) 201-226.

¹⁶⁶ T. Delmas et al, 'Encapsulation and Release Behavior from Lipid Nanoparticles: Model Study with Nile Red Fluorophore' (2012) 1(1) *Journal of Colloid Science and Biotechnology* 16.

estructuras de gliadina a pH 3.0. Uno posiblemente ubicado en el interior de los agregados, detectándose a 608 nm con alta afinidad, y otro más cercano al solvente, cuyo máximo de emisión se encuentra en 640 nm.

A pH 7.0 se observa un incremento pequeño de la intensidad de fluorescencia a 640 nm, no pudiéndose calcular una constante de afinidad. Esto sugiere que en la superficie de las partículas de gliadina a este pH no presentan sitios de interacción disponibles. Considerando la existencia de partículas de características coloidales detectadas a pH 7.0 mediante espectroscopia UV-Visible y M.E., es posible hipotetizar por un lado no hay sitios hidrofóbicos accesibles o bien que en la superficie se encontrarían moléculas de agua fuertemente unidas mediante puentes de hidrógeno fundamentalmente con los residuos glutamina, es decir su superficie es hidrofílica, favoreciendo el apagamiento de esta sonda fluorescente.¹⁶³ La presencia de una capa de moléculas de agua interactuando con las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos, evitaría la agregación y precipitación de las partículas entre sí, por lo que permitiría estabilizar ligeramente estas nanoestructuras en solución, como sucede en los sistemas coloidales.

Por último se ha estudiado las diferencias de las nano-estructuras de la gliadina a ambos pHs, realizando un cambio de pH desde 3.0 a 7.0. Estas medidas han sido previamente utilizadas para estudiar los cambios en la organización supramolecular de diferentes sistemas, en respuesta a un estímulo externo.^{166, 167}

¹⁶⁷ N. Fomina et al, 'UV and Near-IR Triggered Release from Polymeric Nanoparticles' (Pt American Chemical Society) (2010) 132(28) *Journal of the American Chemical Society* 9540.

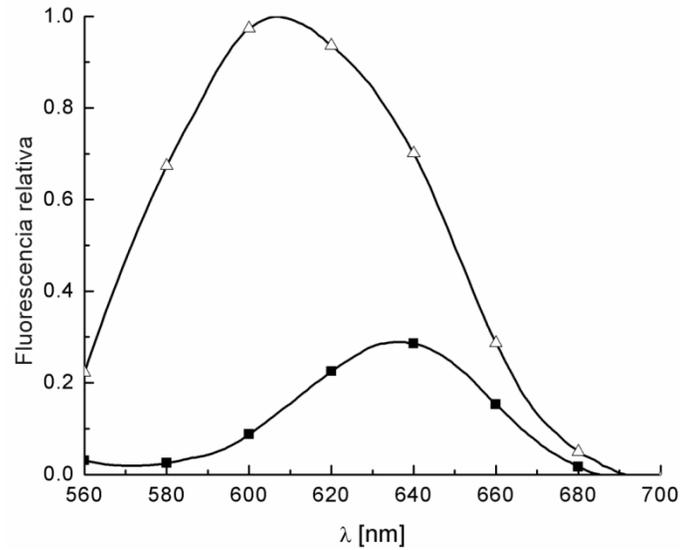


Figura 26. Espectros de Rojo Nilo en solución de gliadina a pH 3.0 (■) y luego de cambiar el pH de la misma solución a 7.0 (□). Un decaimiento y corrimiento de la fluorescencia es observado debido a la liberación de la sonda al medio. La contribución de la sonda libre fue sustraída.

A pH 3.0, se observa la fluorescencia del Rojo Nilo al interactuar con las estructuras auto-organizadas de la gliadina, por lo que se detectó un máximo de emisión a 608 nm, sin embargo al realizar el cambio de pH a 7.0, se observa una disminución de la fluorescencia y un corrimiento a 640 nm. Este comportamiento sugiere la existencia de un cambio de la organización de la gliadina modulada por el pH.

Capítulo IV:

Estudio del péptido 33-mer de la
proteína α -2 Gliadina

Sección I

Elucidación de la Estructura Secundaria del péptido 33-mer y su capacidad de auto-organizarse

4.1.1. Introducción.

El péptido 33-mer de la proteína α -2 gliadina se ha reconocido como el principal inmunomodulador de la patología celíaca. En este capítulo se estudiaron las características estructurales del péptido 33-mer utilizando para ello la técnica de difracción circular. Por otro lado, la morfología de los agregados fue analizada utilizando para ello microscopía electrónica. El péptido utilizado en los experimentos llevados a cabo en esta sección fue adquirido comercialmente con un porcentaje de pureza > 95% (ver Materiales y Métodos).

4.1.2. Evaluación del 33-mer mediante espectroscopia UV-Visible.

La espectroscopia UV-Visible es una técnica que permite estudiar el comportamiento de un sistema peptídico en diversas condiciones de pH, sales y solventes, sin producir grandes perturbaciones en el sistema.¹⁶⁶ En este caso se decidió evaluar cambios estructurales de este péptido en función de la concentración en agua. Teniendo en cuenta que el espectro de orden cero es generalmente difícil de interpretar, se decidió realizar las correspondientes derivadas segundas. Las mismas fueron suavizadas utilizando el método de Savitzky-Golay polinomial de tercer orden. Mediante esta metodología es posible estudiar cambio en la posición de los picos de absorción, causados por una modificación en el entorno de los aminoácidos aromáticos, generalmente producido por un cambio en la estructura terciaria del sistema peptídico.¹⁶⁸ En el caso del péptido 33-mer posee tres tirosinas y dos fenilalaninas.

¹⁶⁸ H. Mach et al, 'Ultraviolet Absorption Spectroscopy' in BretA Shirley (ed), *Protein Stability and Folding* (Humana Press, 1995) vol 40, 91-114.

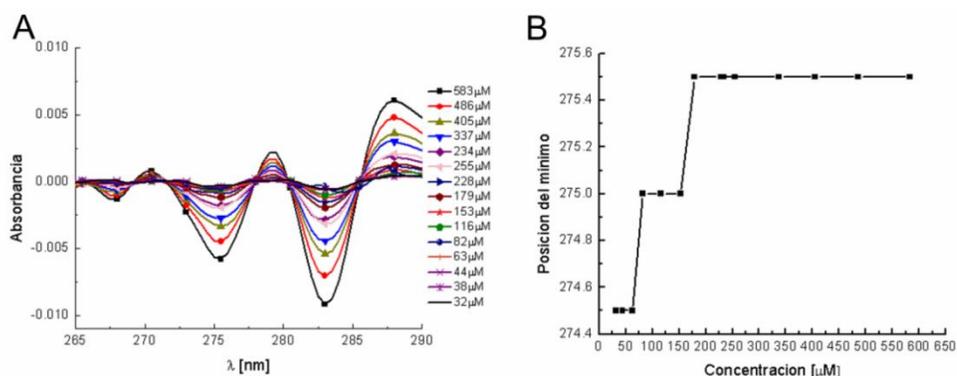


Figura 27. A) Derivada de segundo orden de los espectros UV-Visible del péptido 33-mer en agua a diferentes concentraciones. B) Variación de la posición del mínimo de la derivada en la región cercana a 275 nm (región de absorción de la tirosina).

En solución de Agua Milli Q el péptido 33-mer posee tres picos, 260, 275 y 282 nm correspondientes a los aminoácidos Tyr y Phe. Dado que la tirosina es el que posee mayor absortividad molar, se eligió este para evaluar la existencia de cambios en la posición de los máximos de absorción. A bajas concentraciones se observó un pico a 274.5 nm. Este pico se desplaza a 275.0 nm cuando la concentración se incrementa desde aproximadamente 60 μM a 80 μM . Un comportamiento similar se observó entre 150 μM -200 μM , donde existe un corrimiento del máximo desde 275.0 a 275.5 nm. Este cambio observado indica que los residuos tirosina se encuentran menos expuestos al solvente, posiblemente a un cambio estructural. Este cambio podría deberse a una posible agregación del péptido en solución, lo cual ocurriría en el rango de concentraciones 80-200 μM .

4.1.3. Estudio de la estructura secundaria del 33-mer en solución mediante Dicroísmo Circular.

Previamente, se ha realizado un experimento de CD demostrando que el péptido 33-mer tiene una estructura secundaria tipo PII.⁵³ Sin embargo en este trabajo no se especificaba la concentración empleada. Además el buffer de trabajo no es uno de los comúnmente utilizados (1 mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15mM NaCl a pH 7.0). Teniendo en cuenta los cambios observados mediante espectroscopia UV-Visible, se decidió realizar un estudio estructural del péptido 33-mer mediante CD en función de la concentración (6-610 μM) y la temperatura (-10 a 37°C) en agua a pH 7.0 y en el buffer descrito.

El péptido 33-mer fue disuelto en agua Milli Q a una concentración máxima de 766 μM , debido a que a concentraciones mayores la solubilidad en agua estaba limitada. Se realizaron espectros de CD en función de la concentración, realizando diluciones.

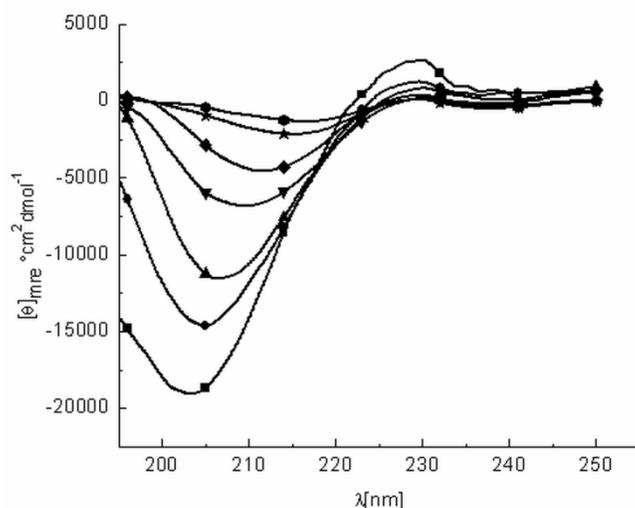


Figura 28. Espectros de CD del péptido 33-mer en agua pH 7.0. Las concentraciones estudiadas fueron 46 μM (■), 93 μM (●), 197 μM (▲), 217 μM (▼), 317 μM (◆), 418 μM (★), 613 μM (◆).

En este caso del buffer, se evaluó al péptido 33-mer en un rango de concentraciones comprendida desde 46 a 613 μM a 5°C. Los espectros obtenidos se presentan en la Figura 29.

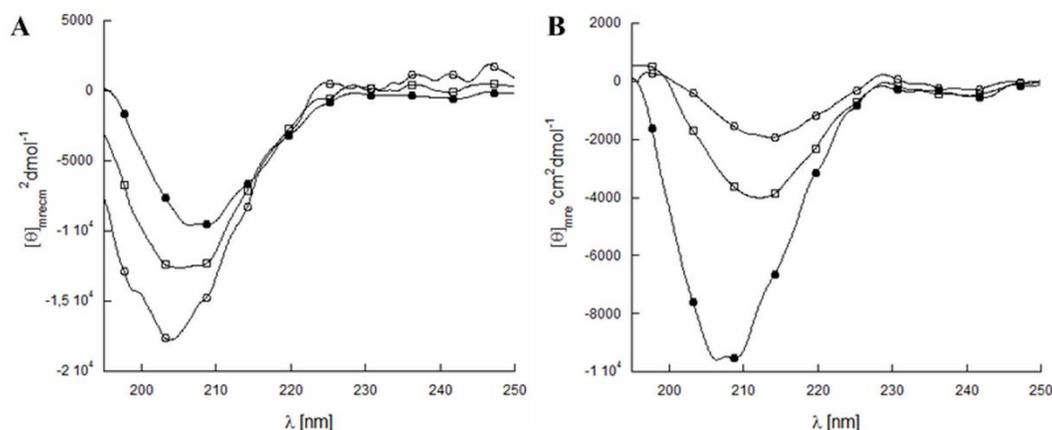


Figura 29. Espectros de CD de soluciones del péptido 33-mer a distintas concentraciones, realizados en buffer: 1 mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15 mM NaCl a pH 7.0, a 5°C. A): 46 μM (○), 122 μM (□) y 197 μM (●). B): 197 μM (●), 418 μM (□) y 613 μM (○).

Los espectros de CD en agua y en buffer mostraron la existencia de un cambio en la estructura secundaria del péptido dependiente de la concentración. En ambas condiciones se observó un

comportamiento similar. A concentraciones bajas como 46 μM , se detectó una banda negativa ubicada 203 nm, indicando la presencia de una estructura desordenada. Cuando se aumentó la concentración de péptido a 613 μM , se observó un desplazamiento hacia el rojo del máximo de la señal de 203 nm a 215 nm, con un comportamiento hipocrómico de la elipticidad molar, que se observó desde - 18000 a - 2000 $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$. Esto indicaría una transición conformacional del péptido desde una estructura desordenada a una más ordenada, que puede ser producto del auto-ensamblado.^{169,170,171} Este comportamiento se observa tanto en experimentos de dilución como de concentración de sistema, demostrando que el sistema es reversible. La banda a alrededor 203-215 nm es atribuida a la transición $\pi^* \rightarrow \pi$ de una estructura PPII, en equilibrio con otras conformación.^{32,53,172} Además, en el intervalo de concentraciones 197 μM a 613 μM , tanto en agua como en buffer fue posible observar una banda positiva a 228 nm, más apreciable al disminuir la temperatura, característica de una transición $n \rightarrow \pi^*$ de una estructura del tipo PPII.³² La estructura PPII generalmente se encuentra en equilibrio conformacional con otras tales como giros- β , cadenas β y conformaciones desordenadas, ya que los ángulos diedros son próximos.³²

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos dependiendo de la concentración del péptido, se determinó el comportamiento de estos equilibrios conformacionales en función de la temperatura. Se evaluaron las concentraciones 197 y 613 μM en el buffer descripto. Se realizaron los espectros a las temperaturas: 37, 25, 5 y -10°C .

¹⁶⁹ A. Aggeli et al, 'Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide beta - sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers' (2001) 98(21) *Proc Natl Acad Sci U S A* 11857.

¹⁷⁰ L. Debelle y A. M. Tamburro, 'Elastin: molecular description and function' (1999) 31(2) *Int J Biochem Cell Biol* 261.

¹⁷¹ R. Lakshminarayanan et al, 'Analysis of secondary structure and self-assembly of amelogenin by variable temperature circular dichroism and isothermal titration calorimetry' (2009) 76(3) *Proteins* 560.

¹⁷² M. A. Kelly et al, 'Host-guest study of left-handed polyproline II helix formation' (2001) 40(48) *Biochemistry* 14376.

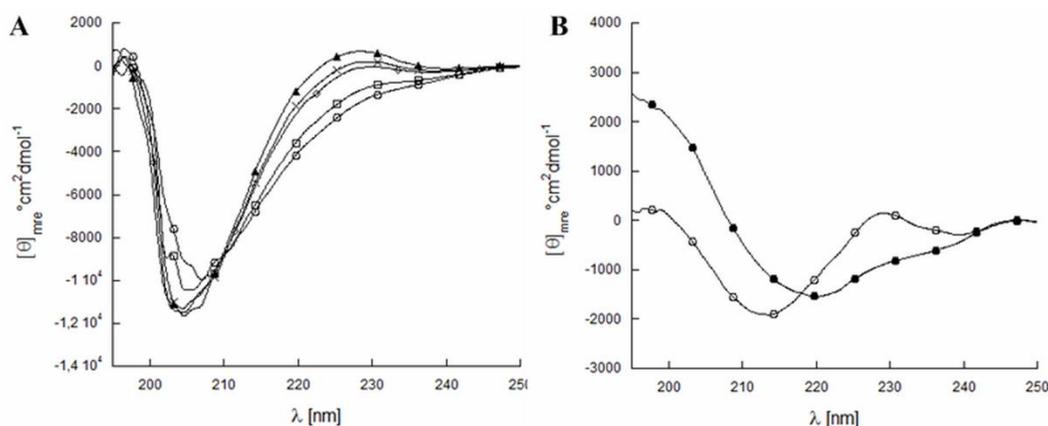


Figura 30. Espectros de CD de soluciones del péptido 33-mer en buffer: 1 mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15 mM NaCl a pH 7.0 a distintas temperaturas. A) Solución 197 μM a 37 (\circ), 25 (\square), 5 (\triangle), 0 (\times) y -10 $^{\circ}\text{C}$ (\blacktriangle). B) Solución 613 μM a 5 (\circ) y 37 $^{\circ}\text{C}$ (\bullet).

Cuando la temperatura se incrementa desde -10 a 37 $^{\circ}\text{C}$, a la concentración 197 μM , se observa la existencia de un punto isodicroico a 211 nm. Este es indicativo de la presencia de un equilibrio conformacional entre una estructura mayoritaria del tipo PPII, con estructuras más plegadas. La estructura del tipo PPII fue la mayoritaria a -10 $^{\circ}\text{C}$, donde se hizo evidente la presencia de una banda negativa en 206 nm y una positiva a 228 nm.¹⁷³ Cuando la temperatura se incrementó a 37°C se observó un pequeño desplazamiento de la banda negativa a 209 nm y se produce una pérdida de la positiva ubicada en 228 nm. Este comportamiento, junto con evidencias previas de modelos peptídicos del tipo Pro-Xaa^{174 175} permite hipotetizar que este comportamiento está asociado a un equilibrio conformacional entre una estructura PPII y un giro β del tipo II.¹⁷⁶ Al estudiar la solución 613 μM , se detectó que a 5°C , el espectro obtenido se correspondía con una estructura del tipo PPII. Al aumentar la temperatura a 37°C , se observó un desplazamiento de la banda negativa a 220 nm y la aparición de

¹⁷³ A. Ostuni et al, 'Molecular and supramolecular structural studies on human tropoelastin sequences' (2007) 93(10) *Biophys J* 3640.

¹⁷⁴ A. Aubry, M. T. Cung y M. Marraud, '.beta.I and .beta.II-turn conformations in model dipeptides with the Pro-Xaa sequences' (Pt American Chemical Society) (1985) 107(25) *Journal of the American Chemical Society* 7640.

¹⁷⁵ S. K. Brahmachari et al, 'Proline-containing β -turns in peptides and proteins. II. Physicochemical studies on tripeptides with the Pro-Gly sequence' (Pt Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company) (1982) 21(6) *Biopolymers* 1107.

¹⁷⁶ G. D. Rose, L. M. Gierasch y J. A. Smith, 'Turns in Peptides and Proteins' in John T. Edsall C.B. Anfinsen and M. Richards Frederic (eds), *Advances in Protein Chemistry* (Academic Press, 1985) vol Volume 37, 1-109.

una banda positiva a 195 nm, indicando la existencia de un tipo de estructura más plegada, posiblemente del tipo β .

Para confirmar la existencia de un equilibrio conformacional PPII/estructura β , se decidió estudiar la respuesta al sistema en presencia de agentes como guanidinio y trifluoretanol. El guanidinio es un agente caotrópico, por lo que es capaz de romper enlaces de puente hidrógeno. Dichos enlaces no se encuentran en la estructura del tipo PPII, por lo que esta estructura se favorece¹⁷² Por otro lado el TFE es un co-solvente, que promueve la formación de puentes hidrógenos intracatenarios^{177,178}, favoreciendo así la formación de estructuras más ordenadas y plegadas, tales como hélices y estructuras β ¹⁷⁹

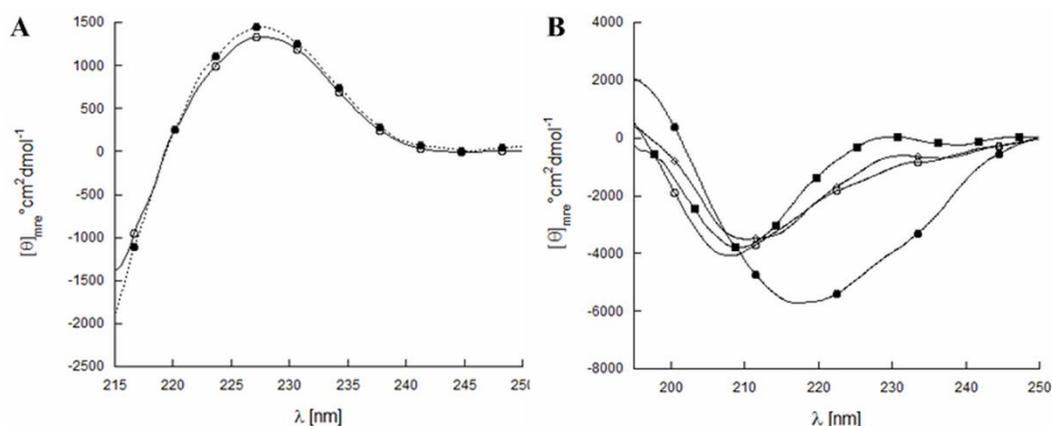


Figura 31. Espectro de CD del péptido 33-mer disuelto en distintos agentes. (A) Soluciones 197 μM y 613 μM disueltas en cloruro de guanidinio 8M. B) Solución 416 μM a 5 $^{\circ}\text{C}$ disuelta en 0 (■), 5 (□), 20 (○) y 46 % (●) de TFE.

Al disolverse el péptido en cloruro de guanidinio 8M a concentraciones 197 μM y 613 μM , se observó la aparición de la banda positiva a 228 nm, confirmando la existencia de un tipo de estructura del tipo PPII a las dos concentraciones de trabajo.⁵³ Por otro lado, al utilizar TFE se observó que cuando se llega a un 46% de TFE se detecta un corrimiento de la banda hacia el rojo de la banda

¹⁷⁷ D. Roccatano et al, 'Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study' (2002) 99(19) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 12179.

¹⁷⁸ F. D. Sonnichsen et al, 'Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide' (Pt American Chemical Society) (1992) 31(37) *Biochemistry* 8790.

¹⁷⁹ N. Floquet et al, 'Structure and modeling studies of the carboxy-terminus region of human tropoelastin' (2005) 24(4) *Matrix Biol* 271.

presente a 210 nm a 220 nm, con la aparición de una banda positiva a 195 nm, lo cual indica la formación de una estructura más plegada, tipo β . También se la existencia de una banda negativa en 230 nm fue detectada, que puede haberse generado por un arreglo de las tirosinas presentes junto con el incremento de la estructura del tipo β ¹⁸⁰.

Estos experimentos muestran que el péptido 33-mer se encuentra en dos equilibrios conformacionales, uno a baja concentración ($\leq 197 \mu\text{M}$) correspondiente a un equilibrio random-PPII y otro a mayores concentraciones PPII-estructura β . Además del cambio conformacional, la disminución de las bandas es característico de un proceso de auto-organización dependiente de la concentración.

4.1.4. Estudio del péptido 33-mer mediante técnicas bioinformáticas y de modelado molecular.

Con el objetivo de obtener una mayor información a nivel molecular del péptido 33-mer se decidió utilizar algunas técnicas bioinformáticas y de modelado molecular. Inicialmente, la utilización de ProtParam¹⁴² brindó información de algunos parámetros fisicoquímicos. Los resultados se presentan en la tabla 8.

Parámetros	Valores
pI	5.52
Coefficiente de extinción Molar	4470 M ⁻¹ cm ⁻¹
Índice Alifático	153.84
GRAVY	-1.064

Tabla 8. Parámetros más importantes del péptido 33-mer predichos por el Prot Param

Considerando que el P.I. de 33-mer calculado por este programa es de 5.52, se podría predecir que a pH 7.0, el péptido se encontraría ligeramente cargado negativamente. Además se determinó que el mismo presentaba un coeficiente de extinción molar elevado, debido a la presencia de tres Tyr y dos Phe.

¹⁸⁰ E. A. Bienkiewicz, A. Y. M. Woody y R. W. Woody, 'Conformation of the RNA polymerase II C-terminal domain: circular dichroism of long and short fragments1' (2000) 297(1) *Journal of Molecular Biology* 119.

Por otro lado, se determinó el índice alifático, que es el volumen relativo ocupado por las cadenas alifáticas, para el caso de 33-mer, se utilizó la misma ecuación utilizada para las moléculas de gliadina. El valor obtenido fue elevado indicando que este péptido es termodinámicamente estable. También se obtuvo el valor GRAVY¹⁴⁴ el cual es un promedio del carácter hidrofílico/hidrofóbico del péptido. Como se describió en el caso de la gliadina, el péptido posee un carácter hidrofílico, debido a que este valor GRAVY es negativo (-1.064), por lo que a pesar de poseer un elevado índice alifático, la presencia en su estructura primaria de glutaminas, hace que este péptido tenga un importante carácter hidrofílico. En consecuencia se podría inferir que este péptido presenta una naturaleza anfifílica.¹⁴⁴

Por otro lado para visualizar la capacidad de auto-organización de 33-mer se construyó un modelo por dinámica molecular. Para ello, teniendo en cuenta los experimentos de CD, se construyó un modelo del péptido 33-mer en una estructura PPII, utilizando el software Abalone. A continuación se realizó una simulación de dinámica molecular (MD) utilizando el software especializado GROMACS. La dinámica del monómero fue obtenida en un tiempo de 5 ns y con un campo de Fuerzas PARSE (Parameters for Solvation Energy). A partir del modelo resultante se determinó la distribución de las cargas parciales (PCED), utilizando los algoritmos PDB2PQR y APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver), que utilizan la ecuación de Poisson-Boltzmann. Una vez realizado esto para el monómero, se realizó el mismo procedimiento para un dímero modelado de igual manera. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 32.

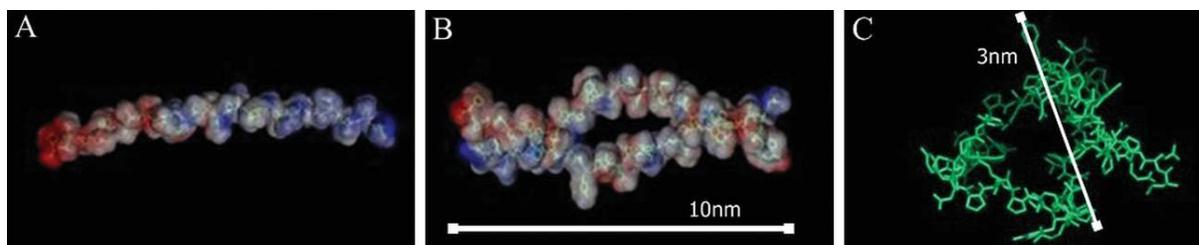


Figura 32. A) Perfil electrostático de la estructura del tipo PPII del péptido luego de realizar una simulación de dinámica molecular. Las cargas fueron asignadas utilizando un campo de fuerzas PARSE. Las zonas rojas representan regiones de carga negativa, mientras que las azules, regiones de carga positiva. B) Modelo de un posible dímero del péptido 33-mer estabilizado por complementariedad de cargas, luego de realizar una dinámica

molecular. C) Corte transversal del dímero presentado en B). Las representaciones fueron realizadas usando VMD.

Mediante MD se pudo establecer que en el tiempo analizado, el péptido 33-mer y su dímero eran estables en una estructura del tipo PPII. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo observado previamente mediante CD y lo reportado para el fragmento PQQQLPY.⁹⁷ Al realizar el cálculo PCED del monómero, se pudo evidenciar que el péptido 33-mer posee una naturaleza anfifílica, aunque no posee aminoácidos cargados. Esta característica es muy importante ya que normalmente las moléculas anfifílicas poseen una elevada capacidad de auto-organizarse en agua.¹²⁵ Al observar la distribución de cargas del dímero se observa una disminución de las cargas en algunas regiones, debido a la complementariedad de cargas.

4.1.5. Visualización de los oligómeros de 33-mer por microscopia electrónica en agua y en buffer

4.1.5.1. Morfología del péptido 33 mer en agua a pH 7.0.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se propone que el péptido es capaz de ensamblarse formando oligómeros. Para visualizar las características de estos se utilizó técnicas de microscopia electrónica TEM y SEM. A las concentraciones 613 μM , donde el equilibrio conformacional estaba desplazado hacia las estructuras β .¹⁸¹ Las muestras fueron preparadas depositando una alícuota del 33-mer sobre un grid recubierto con Formvar y secado por capilaridad usando un papel de filtro para TEM. Para SEM las muestras fueron depositadas sobre vidrio y se procedió a realizar un secado por evaporación a temperatura ambiente. En el caso de TEM la muestra fue metalizada con acetato de uranio y en SEM con oro.

Al observar al 33-mer mediante TEM se detectó la existencia de distintas arquitecturas tales como nano-esferas, fibrillas y fibras que se asociaban. Estas morfologías se encontraban distribuidas en los distintos campos inspeccionados.

¹⁸¹ M. S. Celej et al, 'Toxic prefibrillar alpha-synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel beta-sheet structure' (2012) 443(3) *Biochem J* 719.

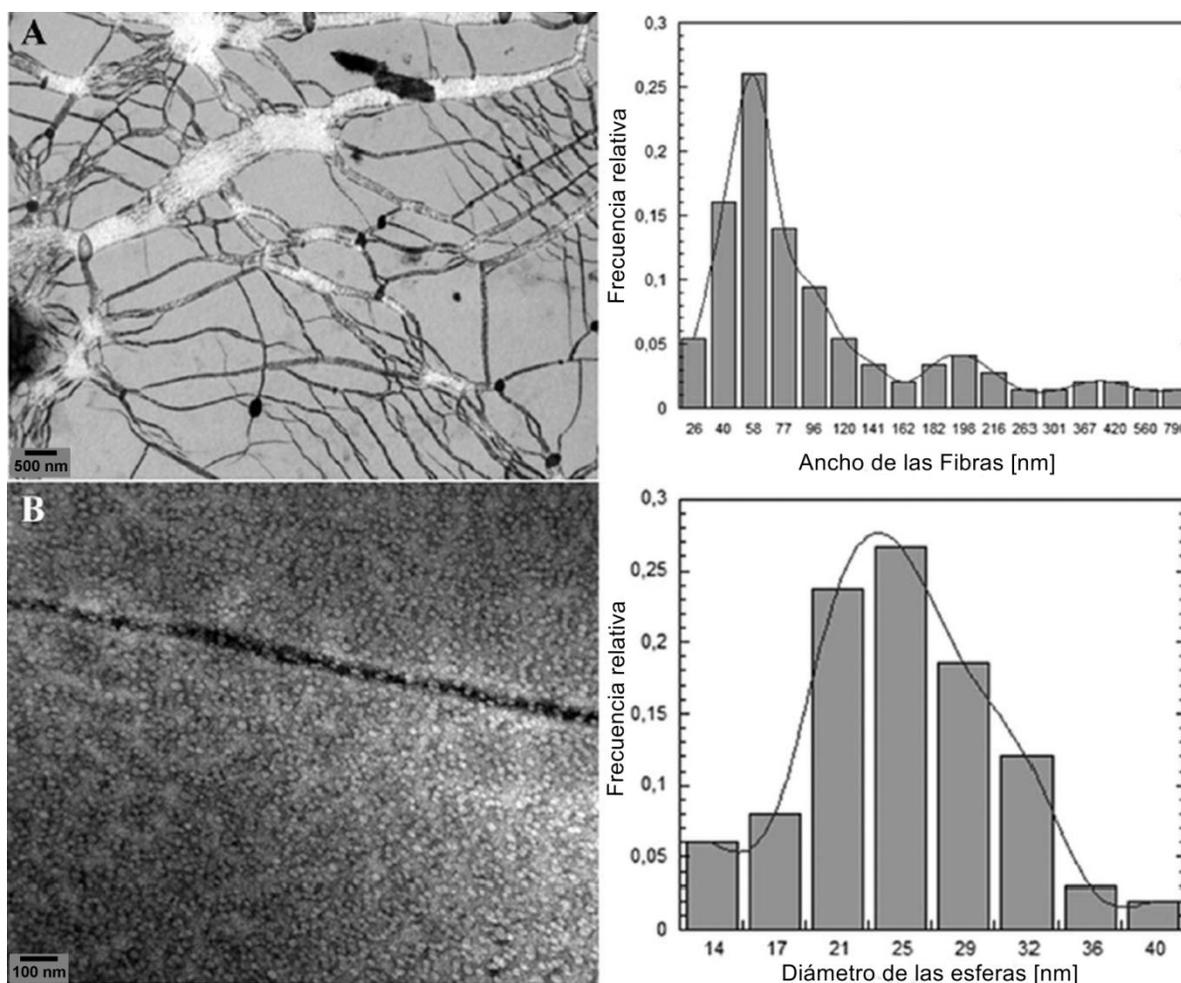


Figura 33. Imágenes de TEM del péptido 33-mer en solución acuosa, concentración 613 μM . A) Se presenta un campo con fibrillas, fibras y auto-asociación de distintas fibras, junto con su evaluación estadística. B) Se presenta un campo constituido por nanoesferas del péptido y una fibrilla aislada, junto con la distribución de los diámetros de las nano-esferas.

En los distintos campos, se pudo observar la existencia de distintas morfologías, algunas de ellas presentaban nanoesferas junto a fibrillas aisladas. Las nanoesferas poseían un diámetro medio de $25 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$. Las fibrillas aisladas poseen un diámetro de $28 \pm 5 \text{ nm}$ (Figura 33 B).

En otras regiones, se observó que la predominancia de fibrillas y fibras (Figura 33 A). En estas secciones, se observó que las fibrillas eran las estructuras preponderantes con un diámetro medio de $58 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$. Estas tenderían a asociarse, produciendo un entramado de fibras ramificadas que cubrieron un alto porcentaje del área estudiada. Es posible distinguir la existencia de dos poblaciones de fibras, unas que tenían diámetros de $200 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ y otras de $400 \pm 70 \text{ nm}$. Estas estructuras de

mayor orden se generarían a partir de asociaciones laterales de fibrillas. Tanto las fibrillas como las fibras poseían longitudes variables que se encuentran entre 220 - 800nm.

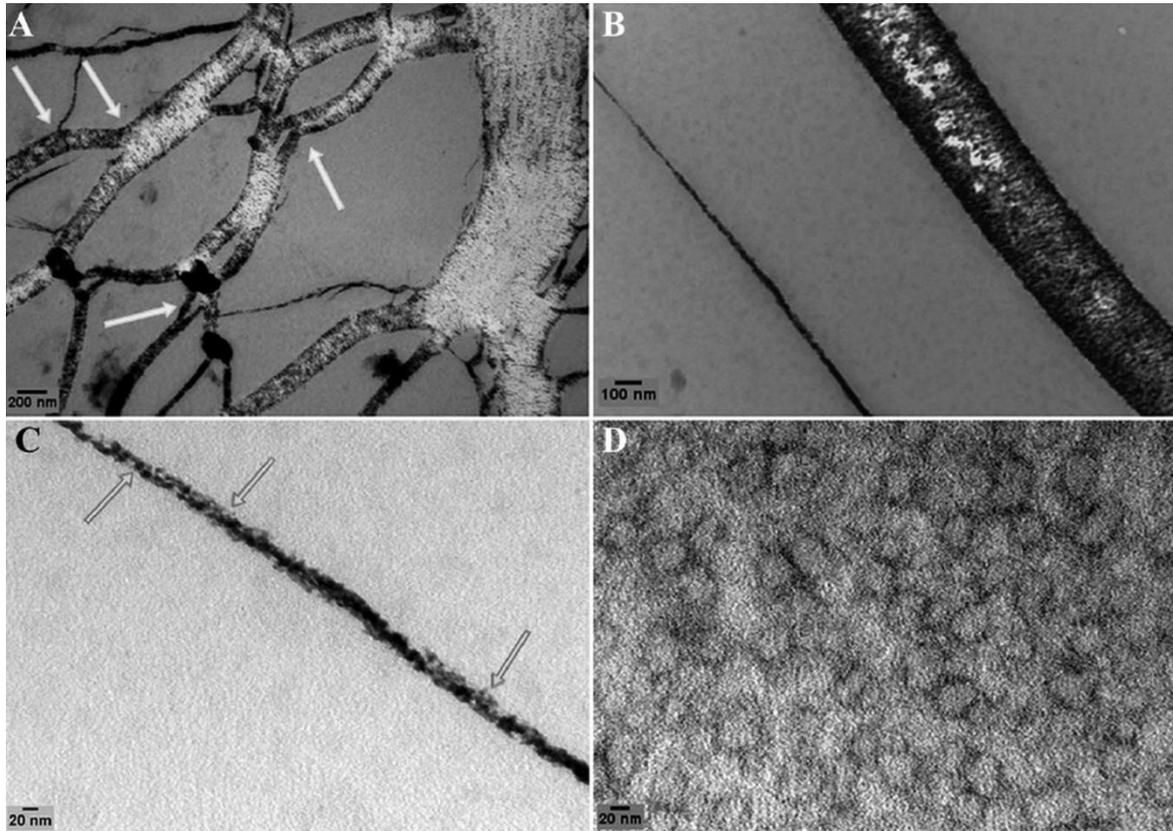


Figura 34: Imágenes TEM del péptido 33-mer en agua, presentándose las distintas estructuras observadas desde un grado de mayor a menor complejidad. A) Se observa la presencia de fibrillas interactuando de manera lateral (marcado con flechas) unas con otras para generar fibras de mayor tamaño. B) Se distinguen las fibrillas con respecto a las nanoesferas presentes en el fondo. C) Se observa un filamento y flechas indicando que el mismo podría estar compuesto por nano-esferas. D) Se presentan un grupo de nanoesferas interactuando unas con otras.

En la Figura 34, se resumen las distintas estructuras observadas del péptido 33-mer en solución acuosa a $613 \mu\text{M}$. En esta figura se han empleado mayores magnificaciones, permitiendo de esta manera detectar, la composición interna de las distintas morfologías observadas en la Figura 33. Es así que en la Figura 34 A se pudo observar las interacciones laterales entre fibrillas, que darían origen a las fibras. Por otro lado, se podría inferir que las fibrillas se habrían generado por interacción lateral de nanoesferas y coalescencia de las mismas, tal como se observa en la Figura 34 B y C. Además se pudo observar en detalle las nanoesferas del péptido (Figura 34 D).

Por SEM se corroboraron los resultados obtenidos mediante TEM y debido a las características de esta microscopía, se pudo obtener imágenes con detalles topográficos de las estructuras presentes. Para estas microscopías se seleccionaron las superficies de vidrio y mica. Ambas superficies presentan una naturaleza hidrofílica y son ampliamente utilizadas en microscopía.^{182 183}

El péptido 33-mer sobre una superficie de vidrio presenta una morfología similar a la observada a través de TEM (Figura 35). Mediante SEM, se distinguió la presencia de fibras y fibrillas, las cuales presentaban diámetros similares a los determinados en TEM. Al aumentar la magnificación (Figura 35 C), se detectó la presencia de nanoesferas distribuidas al azar y asociaciones de las mismas. Además fue posible observar que las fibrillas estaban constituidas de asociación de las nano-esferas.

¹⁸² P. R. Desjardins and Michael B. Barkley, 'Mica disc supports for particulate specimens for scanning electron microscopy' (Pt Blackwell Publishing Ltd) (1973) 97(3) *Journal of Microscopy* 389.

¹⁸³ M. A. Hayat, *Principles and techniques of electron microscopy* (University Press: Cambridge, 2000).

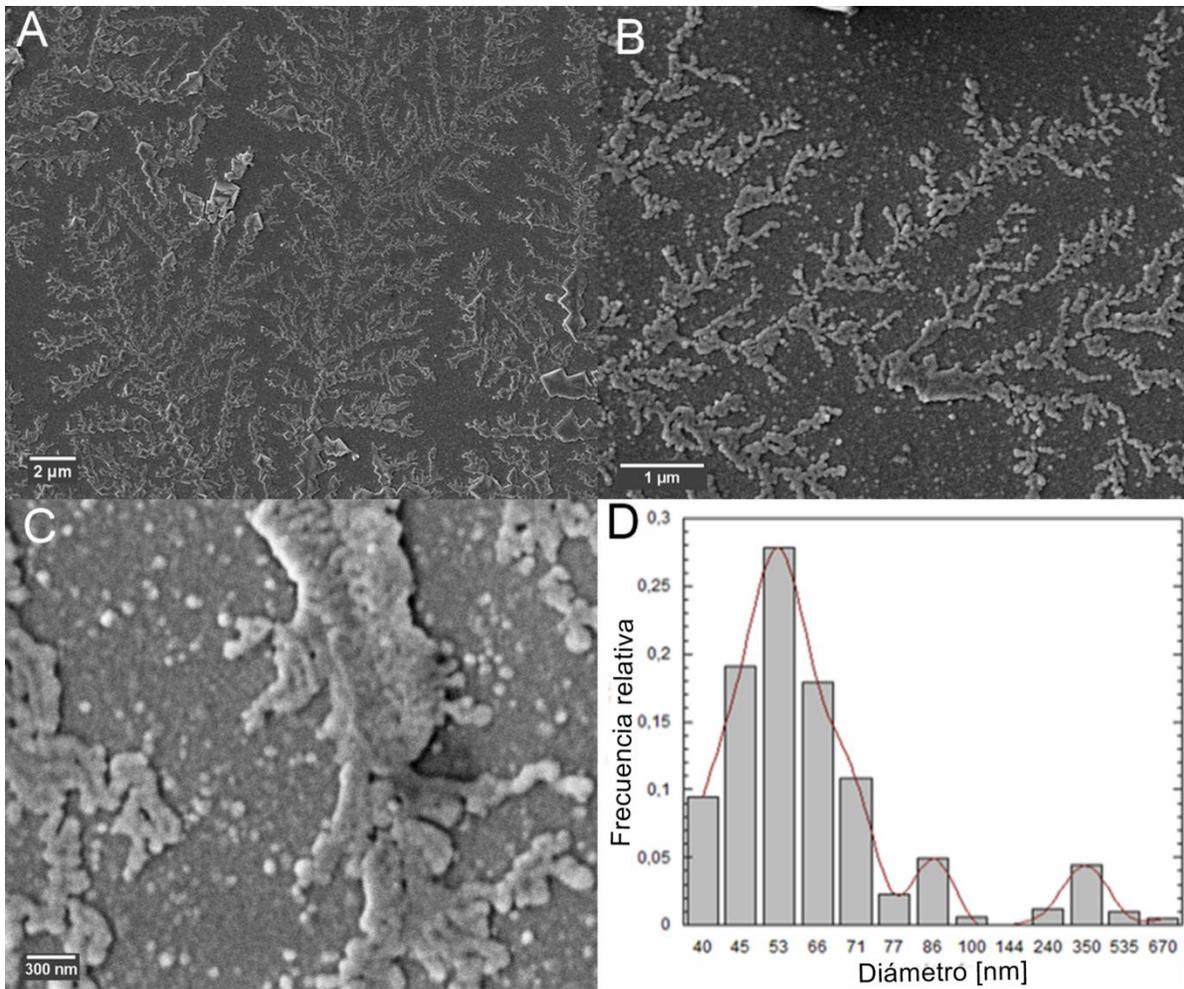


Figura 35. Imagen de SEM del péptido 33-mer en solución acuosa. A) Se observa un campo cubierto del péptido donde se encuentran fibrillas y fibras. Las imágenes B) y C) corresponden a acercamientos a las fibrillas, donde se puede observar además la presencia de nanoesferas. D) Distribución de los diámetros de las fibras y fibrillas observadas en A).

También se estudió la interacción del péptido 33-mer con mica por TEM y SEM. En este caso, se observó que este fragmento peptídico se auto-asociaba, generando estructuras fibrilares ramificadas, con un orden espacial repetitivo. (Figura 36 A). Además fue posible observar la arquitectura interna de las fibras (Figura 36 B), las cuales están formadas por la interacción de fibrillas, tal como se observó en la figura 34 A (TEM).

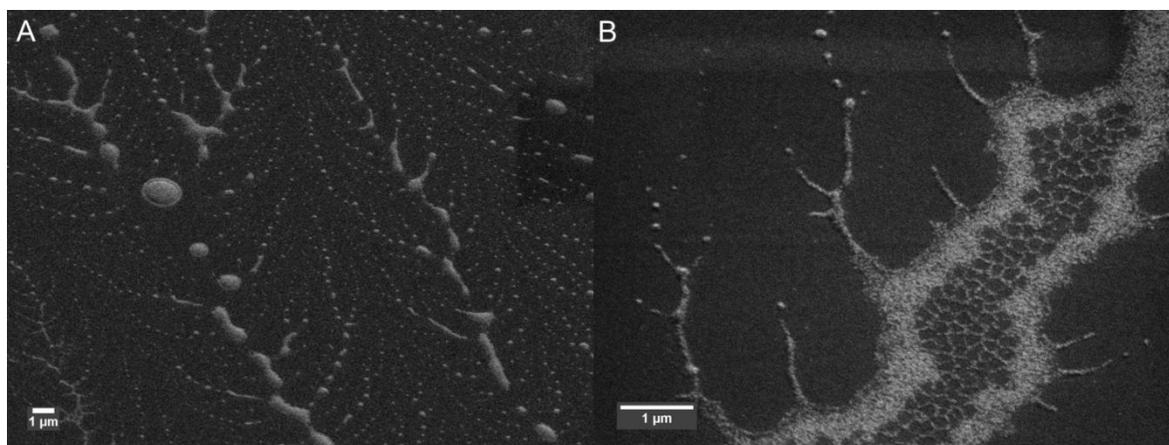


Figura 36. Imágenes de SEM del péptido 33-mer en solución acuosa utilizando mica como superficie. En A) es posible apreciar la auto-organización de este fragmento peptídico. En B). se puede observar la presencia de nanoesferas, fibrillas, fibras y la constitución interna de dichas fibras.

Por lo tanto, mediante esta combinación de ME, haciendo uso de distintas superficies de hidrofiliicidad similar, fue posible determinar que el péptido 33-mer es capaz de auto-organizarse a la concentración 613 µM. En esta solución, en la que se observaron cambios estructurales interesantes mediante CD, se observó la presencia de diversos motivos, tales como nano-esferas, fibrillas, y fibras. Estas dos últimas estructuras se encontrarían posiblemente formas por asociación de las nano-esferas.

4.1.5.2. Morfología del péptido 33 mer en Buffer (1 mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15 mM NaCl a pH 7.0).

Las muestras fueron preparadas de la misma manera que se describió en el apartado anterior. Al realizar una microscopía TEM sobre un grid recubierto de Formvar, se observó que el péptido era capaz de formar nanoesferas y asociaciones de las mismas. También se observó la presencia de agregados del tipo amorfo, distribuidos de manera aleatoria (Figura 37).

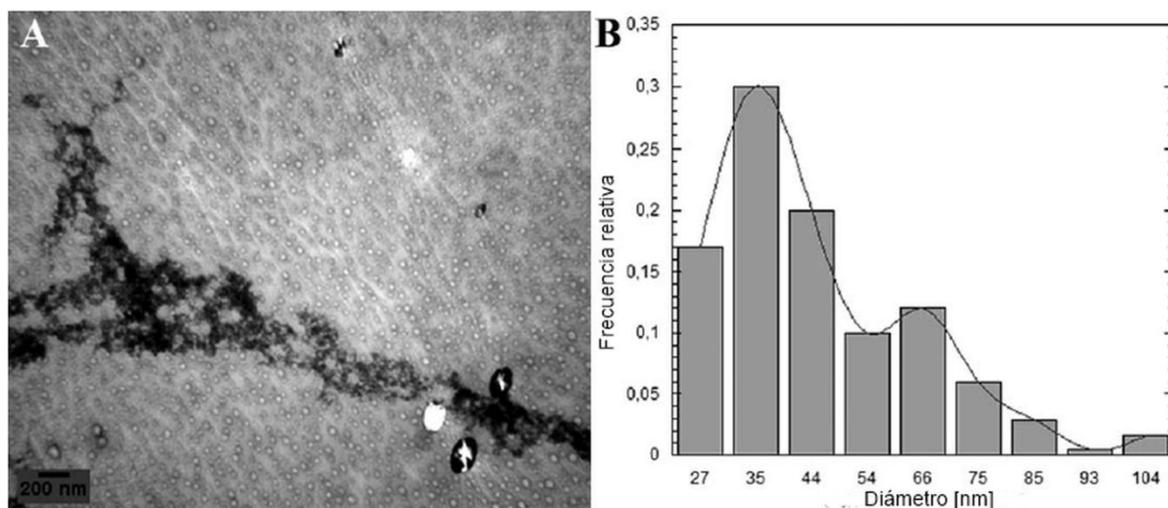


Figura 37. A) Imagen TEM del péptido 33-mer en buffer (1mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15mM NaCl) a pH 7.0, observándose la presencia de nano-estructuras esféricas y agregados amorfos. B) Distribución de diámetros de las nano-estructuras esféricas observadas en la imagen A).

A través de un análisis estadístico del diámetro de las nano-esferas, se pudo detectar la existencia de dos poblaciones, unas pequeñas de 35 ± 10 nm, otras de 66 ± 10 nm. Estas últimas podrían haberse generado por la asociación de dos nanoesferas. Por otro lado, se observó la tendencia de las mismas de disponerse de manera lineal en la superficie, en grupos de tres o más nano-estructuras esféricas. Los agregados amorfos observados podrían haberse generado por la interacción de las nano-estructuras esféricas, que en presencia de sales, darían lugar a este tipo de arquitectura. No obstante, hay que destacar la posibilidad de que las mismas puedan ser un artefacto de la presencia de dichas sales.

En el caso de la microscopía SEM, la preparación fue igual a la descrita en el apartado anterior. La solución del péptido 33-mer se depositó en una superficie de vidrio, se secó mediante evaporación y luego de la correspondiente metalización, se observó que éste se ensambla generando nanoesferas (Figura 38). Estas son de características similares a las observadas mediante TEM (Figura 38).

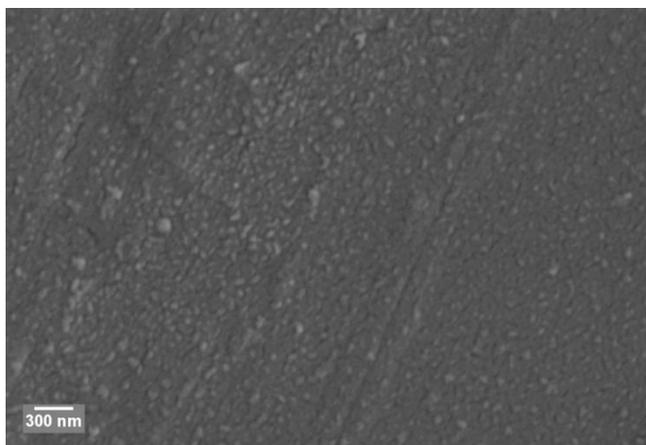
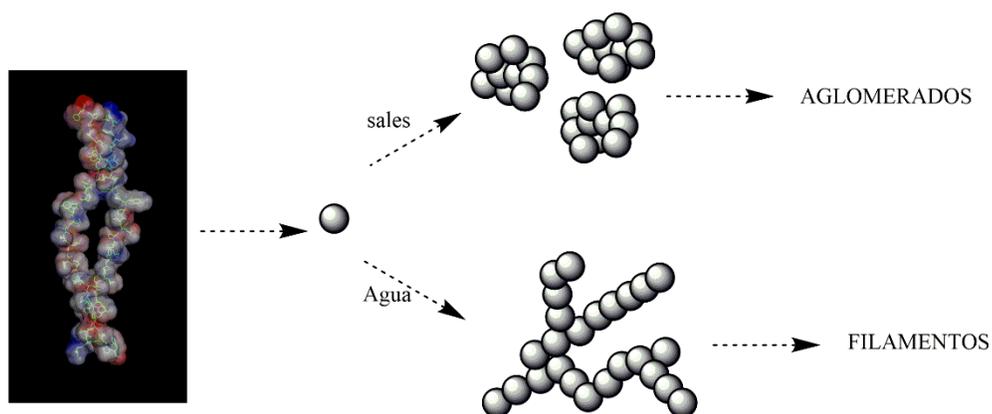


Figura 38. Imagen SEM del péptido 33-mer sobre vidrio, en la cual el péptido se asocia generando nanoesferas.

En este caso, no fue posible observar la presencia de agregados amorfos, posiblemente debido a la diferencia en la preparación de la muestra (ver Materiales y Métodos). El tamaño de las nanoestructuras esféricas formadas no pudo ser determinado en estas microscopías debido a la escasa resolución de las imágenes obtenidas.

Considerando estos resultados, es posible establecer una primera hipótesis para entender el proceso de auto-organización de 33-mer. Esta se presenta en el Esquema 2.



Esquema 2. Hipótesis de la auto-organización del péptido 33-mer. El péptido 33-mer formaría dímeros y estos se organizarían en oligómeros. Estos oligómeros podrían asociarse formando estructuras lineales como filamentos y fibras en agua, mientras que en presencia de sales se forman agregados amorfos o aglomerados.

Sección II

Caracterización de los oligómeros del péptido 33-mer

4.2.1. Introducción

Los experimentos presentados en el capítulo anterior han permitido demostrar la existencia de los oligómeros de péptido 33-mer en equilibrio conformacional entre estructuras extendidas y estructuradas. Además, se pudo demostrar que 33-mer tiene características anfífilas, lo cual es una explicación de la capacidad del 33-mer de auto-organizarse formando estructuras esféricas, las cuales pueden asociarse y generar estructuras fibrilares o aglomerados en función del entorno.

En este apartado se presenta una evaluación más profunda de las características estructurales y morfológicas del péptido en solución. Para ello se presentan experimentos de dispersión de Luz Dinámica (DLS) utilizando un correlador 3D y espectroscopia de fluorescencia intrínseca de Tyr. Además, para poder establecer el tipo de estructura β y corroborar los cambios conformacionales detectados previamente por CD, se utilizó de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier - reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).

4.2.2. Evaluación del 33-mer en solución mediante DLS- Correlación 3D.

La técnica de DLS es una adecuada metodología que permite detectar la presencia de agregados en solución y determinar el tamaño de los mismos y así, confirmar la presencia de oligómeros de 33-mer en solución. La correlación cruzada 3D es una técnica que suprime la dispersión múltiple, y la hace muy útil en el caso de soluciones concentradas o turbias, por lo que es una extensión de las técnicas clásicas de dispersión de la luz.^{184 185}

¹⁸⁴ C. Urban y P. Schurtenberger, 'Characterization of Turbid Colloidal Suspensions Using Light Scattering Techniques Combined with Cross-Correlation Methods' (1998) 207(1) *Journal of Colloid and Interface Science* 150.

Las muestras del péptido 33-mer fueron preparadas y continuación se filtraron (filtro de cut-off 200 nm, baja retención de proteína) bajo una campana de flujo laminar. Este procesamiento se realizó para evitar la presencia de partículas exógenas que pudieran interferir en la medición, generando señales espurias. Por otro lado, antes de realizar las medidas, se permitió que las muestras lleguen al equilibrio durante un tiempo de 1 h a 20°C y posteriormente se realizaron las mediciones. En estas condiciones, a concentraciones menores de 125 μM las muestras presentaban una baja dispersión, por lo que se trabajó por encima de esa concentración. (Ver Materiales y Métodos). Se eligieron las concentraciones de péptido de: 125, 250 y 610 μM . El péptido 33-mer presentó una cinética de auto-ensamblado rápida, con la presencia de estructuras meta-estables solubles en todo el rango de concentraciones. Esto produce que la distribución obtenida sea multimodal o polidispersa. En estos casos es necesario utilizar un método de regularización para analizar los resultados de DLS obtenidos.¹⁸⁶ Existen varios métodos de regularización, que difieren en el algoritmo matemático utilizado. En este caso, se utilizó el método de CONTIN¹⁸⁷, que emplea la inversa de la transformada de Laplace. A partir de este algoritmo, se obtiene una distribución ponderada de las velocidades de relajación que pueden ser convertidas en los correspondientes radios hidrodinámicos de las estructuras presentes (Ver Materiales y Métodos). CONTIN proporciona todos los momentos relevantes para diferenciar los picos en la función obtenida, permitiendo calcular el valor promedio de cada pico (o modo de relajación) y su correspondiente desviación estándar. Debido a la polidispersidad del péptido 33-mer, para la discusión de los resultados obtenidos, se realizó una clasificación de estos en tres categorías: ≤ 100 , 100-1000 y \geq de 1000 nm (Figura 39). Comportamientos similares se obtuvieron para sistemas peptídicos que se auto-organizan, con diferentes morfologías globulares.^{188,189,190} Además en sistemas amiloides, en

¹⁸⁵ C. Moitzi et al, 'The pH induced sol-gel transition in skim milk revisited. A detailed study using time-resolved light and x-ray scattering experiments' (2010/08/31) (2011) 27(6) *Langmuir* 2195.

¹⁸⁶ A. Lomakin, D. B. Teplow y G. B. Benedek, 'Quasielastic light scattering for protein assembly studies' (2005) 299 *Methods Mol Biol* 153.

¹⁸⁷ S.W. Provencher, 'CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations' (1982) 27(3) *Computer Physics Communications* 229.

¹⁸⁸ T. S. Khire et al, 'The fractal self-assembly of the silk protein sericin' (Pt The Royal Society of Chemistry) (2010) 6(9) *Soft Matter* 2066.

condiciones fisiológicas, se ha observado una elevada polidispersidad, la cual puede ser explicada considerando la formación de oligómeros meta-estables en solución.¹⁹¹

Teniendo en cuenta que la intensidad de la dispersión de Rayleigh es directamente proporcional a r^6 (siendo r el radio de la molécula), por lo que las partículas de mayor tamaño no permiten detectar a las más pequeñas. El volumen o distribución de número de partículas ponderado podría ser obtenido utilizando una función diferente.¹⁹² Sin embargo, este tipo de análisis se encuentra más allá de los objetivos de trabajo y los valores de Intensidad relativa obtenidos dan información acerca de la composición del sistema.

¹⁸⁹T. R. Serio et al, 'Nucleated Conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant' (2000) 289(5483) *Science* 1317.

¹⁹⁰ C. Du et al, 'Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons' (2005) 307(5714) *ibid.* 1450.

¹⁹¹ D. B. Teplow, 'Preparation of Amyloid β -Protein for Structural and Functional Studies' in Kheterpal Indu and Wetzel Ronald (eds), *Methods in Enzymology* (Academic Press, 2006) vol Volume 413, 20-33.

¹⁹² T. Hellweg et al, 'Interaction of short DNA fragments with the cationic polyelectrolyte poly(ethylene imine): a dynamic light scattering study' (2000) 163(1) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 71.

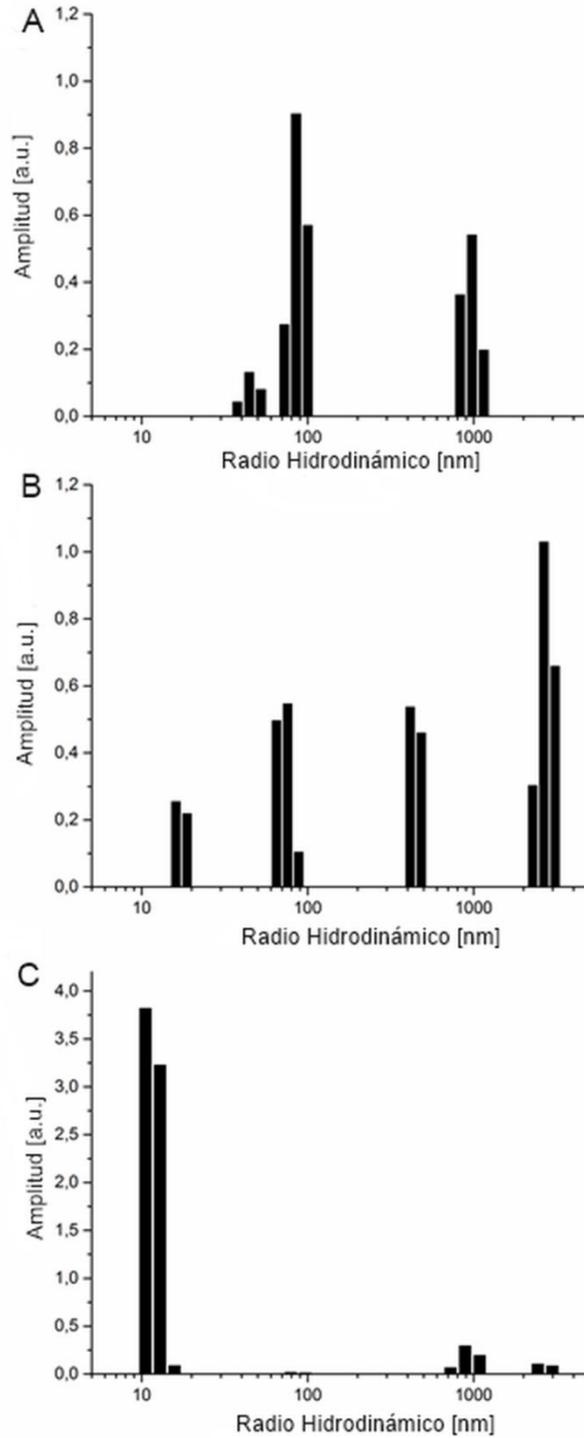


Figura 39. Distribución de tamaños del péptido 33-mer en agua a diferentes concentraciones: A) 125 μM , B) 250 μM y C) 610 μM . Las distribuciones fueron obtenidas aplicando la inversa de la transformada de Laplace a las funciones de correlación obtenidas mediante las medidas de Dispersión de Luz Dinámica.

Como se comentó anteriormente, las muestras fueron filtradas, por lo que se esperaba detectar partículas que tuvieran un tamaño menor a 200 nm, al límite del filtro utilizado. Sin embargo, en todas las concentraciones se detectaron partículas de menor y mayor tamaño. Esto sugiere que las partículas pequeñas interactúan entre sí produciendo partículas mayores, por lo que ambas poblaciones se encuentran en un equilibrio, posiblemente determinado mediante la ley de acción de masas.¹⁹³ Cuando se incrementó la concentración, se observó un aumento de la intensidad relativa de las poblaciones que se encontraban por debajo de 100 nm, mientras que las otras dos poblaciones (100 - 1000 nm y \geq a 1000 nm) decrecían, posiblemente porque quedaron retenidos en el filtro. Además, al comparar el radio hidrodinámico de las dos poblaciones de menos de 100 nm, se observó que al aumentar la concentración desde 125 a 610 μ M, los radios hidrodinámicos decrecen desde 46 ± 7 a 10 ± 3 nm y desde 90 ± 9 a 75 ± 8 nm (Figura 39). Este comportamiento sugiere que existe una interacción dinámica de las partículas pequeñas y más grandes. A bajas concentraciones, las partículas pequeñas se asocian entre sí para generar otras de mayor tamaño. Sin embargo cuando la concentración es mayor, las partículas más grandes formadas, actuarían como nuevo centros de nucleación que limitaría la interacción entre las pequeñas entre sí. Además es importante considerar que luego del proceso de filtración, cada muestra presentó una cinética de formación de los agregados mayores distinto, siendo la concentración 610 μ M, la que presentó el equilibrio más lento. Los cambios en la distribución de tamaños e intensidades de las diferentes poblaciones observadas, fue descrito previamente en la fibrillogénesis proteica. En general, durante este proceso, los agregados pueden precipitar, fragmentarse o reorganizarse en nuevas estructuras auto-ensambladas, cambiando la distribución de las especies agregadas en solución.¹⁹⁴

¹⁹³ Z.-J. Tan et al, 'Influence of particle size on diffusion-limited aggregation' (Pt American Physical Society) (1999) 60(5) *Physical Review E* 6202.

¹⁹⁴ A. K. Buell, C. M. Dobson y T. P. Knowles, 'The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation' (2014) 56 *Essays Biochem* 11.

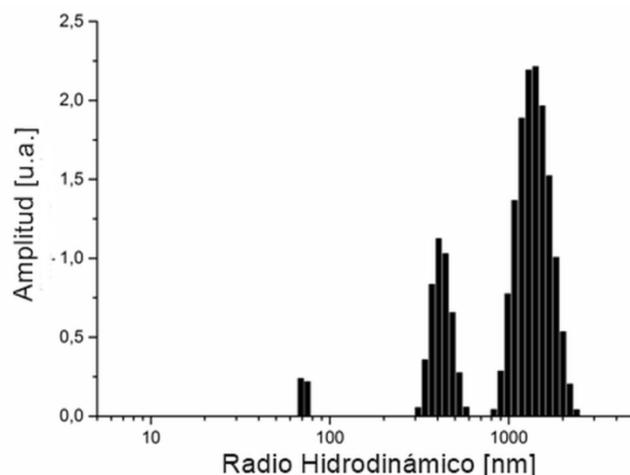


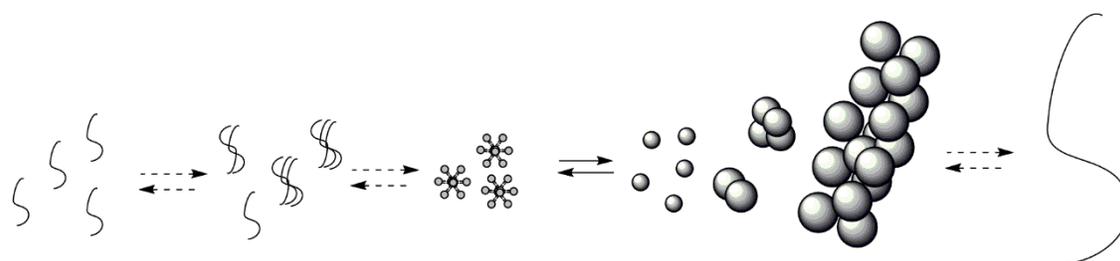
Figura 40. Distribución de tamaños del péptido 33-mer en la concentración 250 μM en 10 mM citrato sodio, 10 mM borato sodio, 10 mM fosfato sodio, y 150 mM NaCl, pH 7. Las distribuciones fueron obtenidas aplicando la inversa de la transformada de Laplace a las funciones de correlación obtenidas mediante las medidas de Dispersión de Luz Dinámica.

Para estudiar la influencia de interacciones electroestáticas en la auto-organización del péptido 33-mer se decidió utilizar una condición de elevada fuerza iónica. Para ello se eligió la concentración peptídica de 250 μM en el buffer 10 mM citrato de sodio, 10 mM borato de sodio, 10 mM fosfato de sodio y 150 mM NaCl (buffer utilizado anteriormente concentrado 10 veces). La fuerza iónica final del sistema fue de 180 mM. En este caso se pudo observar la predominancia de las tres poblaciones de partículas, de manera similar a la observada en agua. Esto indicaría que la interacción de estos entre si no estaría influenciada por fuerzas electroestáticas, ya que el comportamiento del péptido es similar en condiciones de baja y alta fuerza iónica.

Concentración/Valor medio del radio	≤ 100 (nm)	100-1000 (nm)	≥ 1000 (nm)
125 μM en agua	46 \pm 7 90 \pm 9	962 \pm 178	
250 μM en agua	17 \pm 1 75 \pm 8	448 \pm 60	2784 \pm 866
250 μM en buffer	68 \pm 9	424 \pm 87	1413 \pm 452
610 μM en agua	10 \pm 3	889 \pm 125	2437 \pm 345

Tabla 9. Radios promedios de las estructuras solubles del péptido 33-mer en diferentes condiciones: agua y Buffer concentrado 10 veces (10 mM citrato de sodio, borato de sodio, fosfato de sodio, y 150 mM NaCl, pH 7).

Estos resultados permiten hipotetizar que el péptido es capaz de auto-organizarse en agua. Probablemente las interacciones del tipo hidrofóbico y los puentes de hidrógeno que pueden establecer los residuos de glutamina, sean las principales fuerzas que gobiernan el proceso auto-organización del 33-mer. Teniendo en cuenta las características anfifílicas del péptido, se puede hipotetizar que el mismo podría organizarse en forma de micelas, las cuales tendrían dominios disponibles para favorecer la interacción entre ellas. Estructuras del tipo micelar han sido detectadas en la fibrillogénesis del péptido β -amiloide, considerándose las mismas como precursoras.¹⁹⁵ La elevada polidispersidad del sistema y su comportamiento dinámico podría ser podría favorecer el formación de superestructuras en condiciones fisiológicas en función del entorno^{191,196}, esto ha sido previamente observado en sistemas como el péptido β -amiloide¹⁹⁷ y otras proteínas auto-organizadas como la α B-cristalina.¹⁹⁷



Esquema 3. Representación de la hipótesis propuesta del auto-ensamblado del péptido 33-mer que lleva a la formación de las tres poblaciones detectadas mediante DLS-Correlación 3D. Se hipotetiza que aunque no sean detectadas mediante técnicas espectroscópicas, estructuras pre-micelares se encontrarían en solución a concentraciones menores de 125 μ M.

4.2.3. Evaluación de la estructura secundaria de los oligomeros de 33-mer a través ATR-FTIR.

El estudio microscópico de proteínas se caracteriza por disponer a las mismas sobre una superficie, en la cual se adsorben e interactúan. Por esto, se llevaron a cabo experimentos de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier -reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), en donde la estructura

¹⁹⁵ A. Lomakin et al, 'On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants' (1996) 93(3) *Proc Natl Acad Sci U S A* 1125.

¹⁹⁶ D. M. Walsh et al, 'Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate' (1997) 272(35) *J Biol Chem* 22364.

¹⁹⁷ A. J. Baldwin et al, 'The Polydispersity of α B-Crystallin Is Rationalized by an Interconverting Polyhedral Architecture' (2011) 19(12) *Structure* 1855.

secundaria de los oligómeros de 33-mer puede ser evaluada.¹⁹⁸ Esta técnica posee similitudes operacionales con las técnicas microscópicas, en las cuales se incluye la deposición de la muestra sobre una superficie de un cristal de Germanio (hidrofílico) y el secado de la misma.¹⁹⁹ Por otro lado, es más sensible que el CD en el estudio de estructuras del tipo β y pueden ser fácilmente identificadas en la región amida I debido a su elevado coeficiente de extinción molar.²⁰⁰ Teniendo en cuenta los resultados previamente presentados en solución, se decidió evaluar si existen cambios en estructura secundaria péptido 33-mer, depositado en una superficie en función de la concentración. Para la adquisición de los espectros, se generaron films del péptido y se recolectaron los espectros correspondientes.

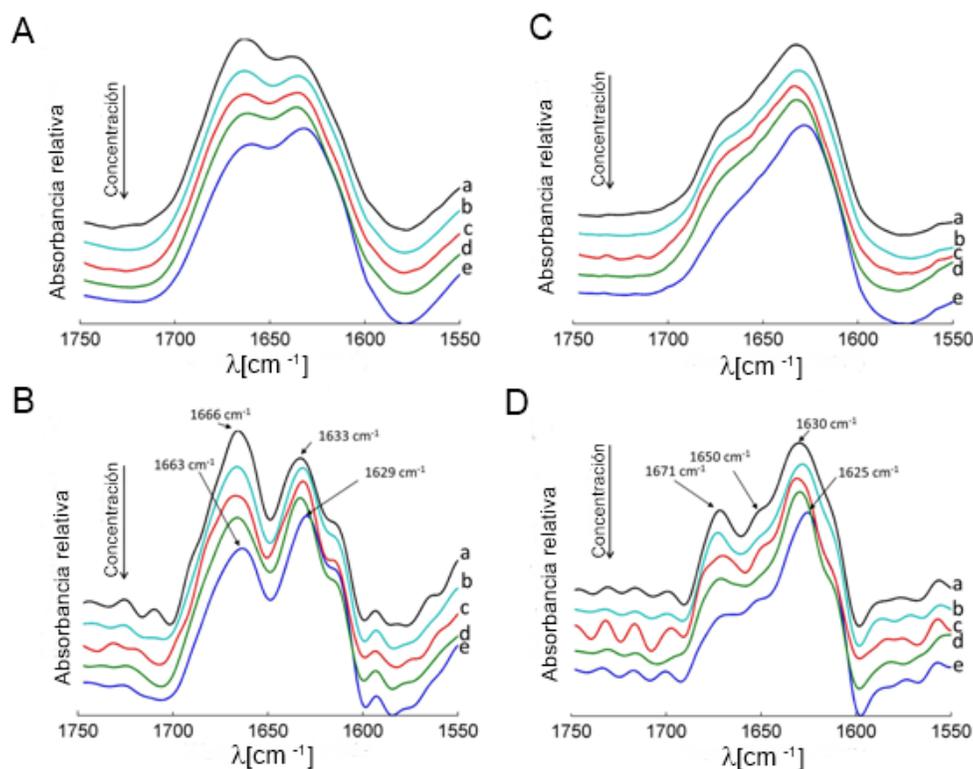


Figura 41. Espectro de ATR-FTIR Normalizados de films del péptido 33-mer en la región Amida I. Las concentraciones: (a) 50 μM ; (b), 100 μM , (c) 200 μM , (d) 300 μM , (e) 600 μM . Imagen A) film formado bajo

¹⁹⁸ K. Nakanishi, T. Sakiyama y K. Imamura, 'On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon' (2001) 91(3) *Journal of Bioscience and Bioengineering* 233.

¹⁹⁹ E. Goormaghtigh, V. Raussens y J. M. Ruyschaert, 'Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes' (1999) 1422(2) *Biochim Biophys Acta* 105.

²⁰⁰ R. Sarroukh et al, 'ATR-FTIR: a "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins' (2013) 1828(10) *Biochim Biophys Acta* 2328.

flujo de nitrógeno y B) se observa su correspondiente deconvolución. C) se observa el espectro de intercambio de $^2\text{H}_2\text{O}$. Cuando los films son formados bajo flujo de nitrógeno en presencia de $^2\text{H}_2\text{O}$ y en (D) su correspondiente deconvolución. Para estos espectros, una línea de base entre 1729 and 1575 cm^{-1} fue sustraída y el espectro entre dicho rango fue rescalado. Todos los espectros fueron corridos para una mejor visualización.

En este caso, se estudió las características de los espectros en la región Amida I, que es la más empleada para el estudio conformacional de péptidos y proteínas. A la concentración $50\text{ }\mu\text{M}$ existen dos picos de absorción, uno a 1666 cm^{-1} y otro a 1633 cm^{-1} (Fig. 41 A y B). El primero es característico de motivos desestructurados y del tipo PPII, la cual es una conformación extendida y carece de la formación de puentes hidrógeno internos.^{201,202} El segundo pico ubicado en esta región, es indicativo de una estructura del tipo β , más estructurada.^{203,204, 205} La relación entre las señales absorbancias entre el pico en $1633/1666\text{ cm}^{-1}$ (estructura β / relación PPII) es de 0.82, indicando la existencia de una mayor proporción de la estructura del tipo desordenada/PPII. A medida que la concentración se incrementa hasta llegar a $600\text{ }\mu\text{M}$, se observa un desplazamiento de dichas banda, hasta llegar a los valores de 1663 cm^{-1} , y 1629 cm^{-1} , correspondientes también a estructuras del tipo PPII y β , respectivamente.²⁰⁶ Al comparar las relaciones de intensidad entre los picos $1629/1663\text{ cm}^{-1}$, se observa una relación de intensidades de 1.18. Este cambio en las relaciones de estructura indicaría la existencia de un equilibrio conformacional dependiente de la concentración. En este caso, a bajas concentraciones el péptido 33-mer presentaría una transición desde una estructura desordenada a una con mayor plegamiento, enriquecida en estructuras del tipo β . Una característica destacable es que existe un corrimiento del pico 1633 cm^{-1} band a 1629 cm^{-1} , que estaría relacionado con la formación de estructuras del tipo β que forman parte de un ensamblado molecular altamente ordenado en un

²⁰¹ M. Jackson y H. H. Mantsch, 'Beware of proteins in DMSO' (1991) 1078*ibid.* 231.

²⁰² M. Martino et al, 'On the occurrence of polyproline II structure in elastin' (2000) 519(1–3) *Journal of Molecular Structure* 173.

²⁰³ Y. Wang et al, 'Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR-ATR spectroscopy and PLS regression' (2008) 89(11) *Biopolymers* 895.

²⁰⁴ A. M. Tamburro et al, 'Supramolecular amyloid-like assembly of the polypeptide sequence coded by exon 30 of human tropoelastin' (2005) 280(4) *J Biol Chem* 2682.

²⁰⁵ M. Jackson y H. H. Mantsch, 'The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure' (1995) 30(2) *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 95.

²⁰⁶ B. Bochicchio et al, 'Amyloidogenesis of proteolytic fragments of human elastin' (Pt The Royal Society of Chemistry) (2013) 3(32) *RSC Advances* 13273.

plano. Por otro lado, no se detectó el pico 1695 cm^{-1} , característico de láminas β antiparalelas, sugiriendo la existencia de estructura β paralela, similares a las observadas en enfermedades como Parkinson y Alzheimer.²⁰⁰

A continuación, se adquirieron los espectros a las mismas concentraciones, en presencia de agua deuterada y se realizó la correspondiente deconvolución del espectro (Figuras 41 C y D). Se observó en el rango de concentraciones estudiadas, la presencia de tres picos uno entre $1627\text{ -}1633\text{ cm}^{-1}$, otro en 1650 cm^{-1} , 1671 cm^{-1} . A la concentración $50\text{ }\mu\text{M}$, el primer pico se encontró en 1633 cm^{-1} . Sin embargo cuando la concentración llega a $600\text{ }\mu\text{M}$, este se desplazó a 1625 cm^{-1} . La presencia de los mismos y de este corrimiento, sugiere la existencia de estructuras del tipo β ^{204,205,207}. La banda observada a 1650 cm^{-1} es característica de estructuras del tipo alfa hélice. No obstante, el elevado contenido de prolinas que posee el péptido, hace que exista una restricción conformacional para este tipo de estructuras secundarias. En consecuencia, esta señal es indicativa de una región desestructurada.^{208,209} A su vez se observa un incremento de la relación de intensidad entre los picos ubicados en $1630/1671\text{ cm}^{-1}$, que van desde 1.86 a $50\text{ }\mu\text{M}$, hasta llegar a 2.78 a $600\text{ }\mu\text{M}$. De esta manera se confirma la existencia de un incremento de estructuras β , a medida que la concentración aumenta.²¹⁰

Teniendo en cuenta los resultados anteriores es posible hipotetizar que el péptido 33-mer se encontraría en un equilibrio conformacional entre estructuras del tipo desordenadas /PPII y β paralela. En este equilibrio las estructuras del tipo β paralela se favorecen al aumentar la concentración.^{210,211,212,213} Este tipo de comportamiento ha sido observado previamente en distintas proteínas, tales

²⁰⁷ J. Kong y S. Yu, 'Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures' (2007) 39(8) *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 549.

²⁰⁸ M. Jackson, P. I. Haris y D. Chapman, 'Fourier transform infrared spectroscopic studies of Ca(2+)-binding proteins' (1991) 30(40) *Biochemistry* 9681.

²⁰⁹ D. C. Lee et al, 'Second-derivative infrared spectroscopic studies of the secondary structures of bacteriorhodopsin and Ca²⁺-ATPase' (1985) 24(16) *ibid.* 4364.

²¹⁰ Y. N. Chirgadze y N. A. Nevskaya, 'Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheets' (1976) 15(4) *Biopolymers* 627.

²¹¹ E. Goormaghtigh, V. Cabiaux y J. M. Ruyschaert, 'Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds' (1994) 23 *Subcell*

como la proteína prion de Sup 35, derivada de levaduras, que posee una relación β /desordenada, dependiente del agregado que este forme, ya sea una fibra o un filamento.²¹⁴ El mismo tipo de comportamiento se observó en la proteína amelogenina y el péptido sintético S4, que surge de la proteólisis de la elastina por la metaloproteínasa -12. Estos sufren un incremento de su estructura tipo β paralela cuando pasa de monómero a una estructura del tipo fibrilar.^{215,216}

4.2.4. Evaluación de los oligómeros de 33-mer mediante fluorescencia intrínseca del aminoácido Tirosina:

El péptido 33-mer posee en su estructura primaria tres aminoácidos tirosina, pudiendo utilizar este aminoácido para experimentos de fluorescencia intrínseca. La tirosina posee la capacidad de emitir fluorescencia debido a que en su estructura se encuentra un grupo fenol. Así, existen dos momentos de transición electrónica que dan lugar a la absorción de radiación. La absorción mayor, que se produce es a 223 nm, debido a la transición 1L_a , mientras que la de menor energía se debe a la 1L_b , la cual produce un pico de absorción a 277 nm. Ambas transiciones se representan en la figura 42. La fluorescencia se genera cuando el aminoácido pasa desde el menor nivel vibracional de su estado excitado a su estado fundamental, lo cual produce una emisión cuyo máximo se encuentra centrado en 303 nm en soluciones acuosas. Cuando el grupo hidroxilo se ioniza, el máximo de emisión se desplaza a 340 nm. Esta ionización incluso puede ocurrir en el estado excitado.²¹⁷ Si bien su eficiencia cuántica es menor a la del Triptófano y no presenta una elevada sensibilidad a la polaridad del ambiente,¹¹²

Biochem 329.

²¹² J. Kubelka y T. A. Keiderling, 'The Anomalous Infrared Amide I Intensity Distribution in ^{13}C Isotopically Labeled Peptide β -Sheets Comes from Extended, Multiple-Stranded Structures. An ab Initio Study' (Pt American Chemical Society) (2001) 123(25) *Journal of the American Chemical Society* 6142.

²¹³ J. S. Richardson, 'The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure' in John T. Edsall C.B. Anfinsen and M. Richards Frederic (eds), *Advances in Protein Chemistry* (Academic Press, 1981) vol Volume 34, 167-339.

²¹⁴ S. Hess, S. L. Lindquist y T. Scheibel, 'Alternative assembly pathways of the amyloidogenic yeast prion determinant Sup35-NM' (2007) 8(12) *EMBO Rep* 1196.

²¹⁵ J. Dandurand et al, 'Conformational and thermal characterization of a synthetic peptidic fragment inspired from human tropoelastin: Signature of the amyloid fibers' (2014) 62(2) *Pathol Biol (Paris)* 100.

²¹⁶ E. Beniash, J. P. Simmer y H. C. Margolis, 'Structural changes in amelogenin upon self-assembly and mineral interactions' (2012) 91(10) *J Dent Res* 967.

²¹⁷ J. B. Alexander Ross et al, 'Tyrosine Fluorescence and Phosphorescence from Proteins and Polypeptides' in Joseph R Lakowicz (ed), *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (Springer US, 2002) vol 3, 1-64.

este ha sido utilizado para estudiar procesos de asociación de proteínas péptido β -amiloide.²¹⁸ Para obtener información relevante es necesario hacer uso de las técnicas de anisotropía y fluorescencia resuelta en el tiempo, sin interferir en la naturaleza química de la molécula peptídica.

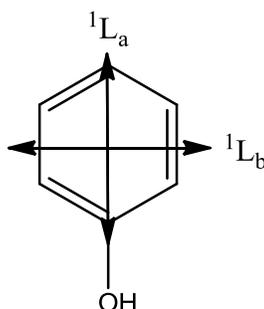


Figura 42. Momentos de transición electrónica de la absorción.

En este trabajo doctoral, se decidió evaluar las propiedades de auto-organización del péptido 33-mer en soluciones acuosas a 25°C en función de la concentración. Para ello se utilizó la anisotropía del estado estacionario y medidas de tiempo de vida. Teniendo en cuenta que el péptido 33-mer posee tres Tyr y la diversidad de estructuras secundarias que puede formar en agua, la interpretación de estos resultados implica un desafío. Para simplificar el sistema, evaluaremos solo 33-mer en agua, ya que el buffer empleado en los experimentos previos (CD, SEM y DLS) y en los citados en la bibliografía,⁵³ contiene fosfato, el cual podría producir apagado de la fluorescencia de la tirosina.²¹⁹

4.2.4.1. Determinación de la anisotropía del péptido 33-mer.

La anisotropía es una magnitud que permite estudiar la movilidad angular que posee un fluoróforo, en el tiempo que ocurre la absorción de radiación y la emisión de fotones. Esta propiedad es independiente del fluoróforo y de su intensidad de fluorescencia. El desplazamiento angular que sufre un fluoróforo en un determinado medio o solvente es dependiente de la difusión rotacional de la molécula, por lo que este último parámetro es dependiente de la viscosidad del medio y del tamaño y forma de la molécula.¹¹⁶ Es así que esta propiedad presenta una diversidad de aplicaciones, ya que

²¹⁸ M. Amaro, D. J. Birch y O. J. Rolinski, 'Beta-amyloid oligomerisation monitored by intrinsic tyrosine fluorescence' (2011) 13(14) *Phys Chem Chem Phys* 6434.

²¹⁹ R. F. Chen y P. F. Cohen, 'Quenching of tyrosine fluorescence in proteins by phosphate' (1966) 114(3) *Arch Biochem Biophys* 514.

permite estudiar procesos de oligomerización²²⁰, uniones proteína ligando²²¹ y cambios en la fluidez de la membrana, utilizando para ello fluoróforos como laurdan que detectan esta propiedad de las membranas.²²²

El fundamento de esta técnica se basa en que cuando una luz polarizada incide sobre un fluoróforo, solo aquellas moléculas que posean sus dipolos de excitación, aquellos que se producen en la molécula al pasar a un estado excitado, paralelos a la radiación podrán absorber fotones. En consecuencia, se genera una foto-selección de las moléculas. Si durante el período entre que se produce la absorción y la emisión de fotones (es decir el tiempo de vida del fluoróforo), se produce un desplazamiento de la molécula, la emisión ocurrirá en un plano distinto. Debido a ello, la contribución en ese plano, será menor, por lo que la molécula sufrió una despolarización. En cambio si no se produce un movimiento, se dice que la muestra se encuentra polarizada. Teniendo en cuenta este fundamento, la determinación se realiza en un fluorómetro que posee polarizadores de excitación y emisión, registrándose la radiación cuando ambos polarizadores se encuentran en paralelo y dispuestos perpendiculares. A continuación se presenta la ecuación general para el cálculo de la anisotropía (Ecuación 1). Para más detalles sobre la obtención experimental de estos valores ver la sección de Materiales y Métodos correspondiente.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Como se comentó anteriormente, el aminoácido tirosina no posee una elevada sensibilidad a cambios en la polaridad del ambiente, sin embargo puede ser utilizada para estudiar procesos de oligomerización/agregación a través de mediciones de la anisotropía. Es así que ésta se ha utilizado en diversos estudios tales como en la evaluación del efecto de sales sobre las histonas en la formación de

²²⁰ B. D. Hamman et al, 'Dimer/monomer equilibrium and domain separations of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12' (1996) 35(51) *Biochemistry* 16680.

²²¹ A. M. Rossi y C. W. Taylor, 'Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization' (2011) 6(3) *Nat Protoc* 365.

²²² F. M. Harris, K. B. Best y J. D. Bell, 'Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order' (2002) 1565(1) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 123.

los nucleosomas²²³ y en la agregación del péptido amiloide de los islotes pancreáticos, el cual está relacionado con la Diabetes melitus tipo II.²²⁴ Teniendo en cuenta estos trabajos, se decidió evaluar de forma similar el proceso de oligomerización del péptido 33-mer, que posee tres residuos tirosina. Para ello se realizaron mediciones de la anisotropía en función de la concentración. Para realizar estas mediciones, asumimos que el péptido se auto-organiza generando estructuras del tipo esféricas. Las muestras fueron excitadas a 280 nm y la longitud de emisión utilizada fue de 303 nm, a 25°C. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 43.

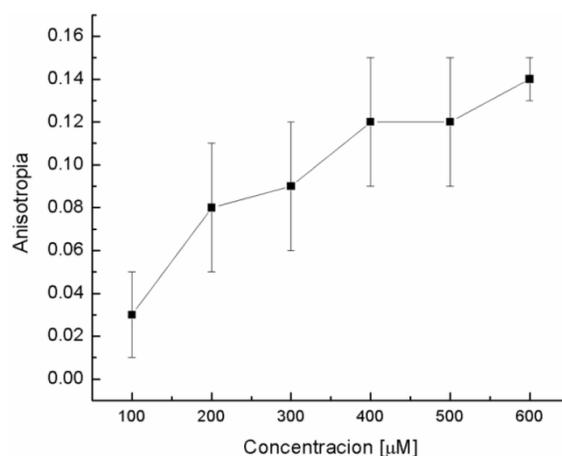


Figura 43. Anisotropía de estado estacionario en función de la concentración del péptido 33-mer de la proteína alfa 2-gliadina desde 100 µM a 600 µM en agua.

Se observó un incremento de la anisotropía del sistema en función de la concentración. Entre las concentraciones 100 - 400 µM se observó un aumento de esta propiedad de manera casi lineal, desde 0.02 a 0.12 respectivamente. Esto indicaría que existe un mayor orden conformacional alrededor del grupo fenol a medida que la concentración se incrementa, lo cual estaría asociado a la formación de distintos oligómeros, lo cual se correlaciona con los cambios estructurales previamente observados mediante CD. Entre 400 - 500 µM, la anisotropía presenta un valor constante, mientras que sufre un ligero incremento a 600 µM (desde 0.12 a 0.14). Mediante las técnicas descritas anteriormente, se

²²³ L. J. Libertini y E. W. Small, 'Salt induced transitions of chromatin core particles studied by tyrosine fluorescence anisotropy' (1980) 8(16) *Nucleic Acids Res* 3517.

²²⁴ S. B. Padrick y A. D. Miranker, 'Islet amyloid polypeptide: identification of long-range contacts and local order on the fibrillogenesis pathway' (2001) 308(4) *J Mol Biol* 783.

detectó que en este rango de concentraciones empezarían a formarse filamentos, lo cual probablemente sería la causa de este incremento.

Estos resultados muestran que el péptido 33-mer es capaz de auto-organizarse a través de diferentes estadios de agregación en función de la concentración, lo cual se encuentra en concordancia con lo observado mediante DLS. Al aumentar la concentración hasta 400 μM , se observó mediante CD que el péptido es capaz de sufrir cambios conformacionales y auto-ensamblarse. Debido a ello es posible explicar el incremento lineal de la anisotropía en esta región. Entre 400 y 500 μM no existe cambio apreciable de la anisotropía, lo cual indicaría la presencia de partículas de gran tamaño, generadas por un proceso de asociación. Al llegar a 600 μM , se observó un pequeño cambio de la anisotropía, lo que podría estar relacionado con el equilibrio conformacional detectada mediante CD y el equilibrio dinámico entre oligómeros pequeños y mayores, tal como se detectó mediante DLS.

Al realizar un ajuste de la curva obtenida con la ecuación de Hill, se puede observar que este proceso de agregación posee una concentración de oligomerización/agregación crítica en 273 μM ($R^2 = 0.98$). Mediante CD, ATR-FTIR y UV-Vis, se observó que a concentración cercanas a 200 μM existe un cambio conformacional y a través de DLS, se detectó la presencia de diversos tipos de oligómeros. Posiblemente a la concentración de 273 μM , los oligómeros de 33-mer comiencen a presentar una rigidez estructural debido al aumento el componente tipo β y esto es detectado por los residuos Tyr.

4.2.4.2. Tiempo de vida del péptido 33-mer.

Cuando una solución de un fluoróforo es iluminado con un pulso de radiación de adecuada longitud de onda, genera la excitación de un grupo de fluoróforos. Las moléculas excitadas decaen a su estado fundamental mediante procesos radiactivos y no-radiactivos. Este proceso se describe mediante un decaimiento exponencial. El tiempo de vida es una constante τ y corresponde al tiempo de decaimiento característico o promedio del tiempo de vida del estado excitado. Este es calculado como el tiempo que es requerido para que la intensidad de fluorescencia caiga a un valor de $1/e$ del valor inicial (Figura 44). El tiempo de vida de la fluorescencia determina el tiempo que posee el

fluoróforo para interactuar con el ambiente y determina un plazo para realizar la observación del fluoróforo para obtener información de fenómenos dinámicos.

La espectroscopia resuelta en el tiempo, permite obtener información detallada de la velocidad y la cinética de procesos intra- e intermoleculares, brindando información de parámetros estructurales así como la dinámica de proceso rápidos. Estas medidas pueden ser llevadas a cabo mediante las técnicas de dominio temporal o dominio de frecuencia.¹¹⁶ La empleada en este trabajo fue la de dominio temporal. En esta se registra la variación de fluorescencia en el tiempo luego de excitar la muestra con un pulso de luz adecuado. El método más utilizado en este tipo de medidas es la de Tiempo de Correlación mediante Conteo de un Solo Fotón (TCSPP). Esta se basa en que luego de la excitación con un pulso de luz, la probabilidad de detectar un fotón al tiempo t es proporcional a la intensidad de fluorescencia a ese dado tiempo. Por lo tanto registrando en un largo tiempo un número grande de fotones, que se obtienen luego de la excitación con varios pulsos de luz, es posible reconstruir las curvas de decaimiento. Este método permite una elevada resolución temporal, con una elevada eficiencia, alta sensibilidad y con métodos estadísticos adecuados para su análisis.²²⁵ Estos decaimientos se ajustan mediante a funciones exponenciales (puede ser una sola o a varias). Para determinar la bondad del ajuste se utiliza un método estadístico, que es método no lineal de mínimos cuadrados. La bondad del ajuste se determina con el valor de χ^2 , Si este es cercano a 1, el ajuste describe adecuadamente la curva experimental.¹¹⁶

²²⁵ W. Becker, *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques* (Springer-Verlag, 2005).

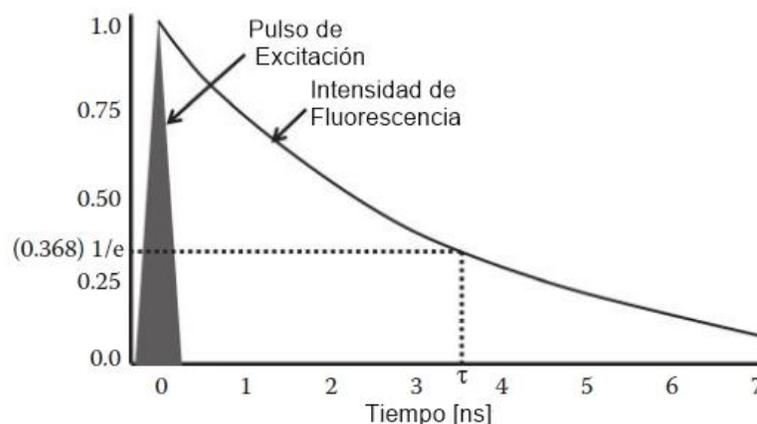


Figura 44. Gráfico representando el decaimiento de la intensidad de un fluoróforo en función del tiempo.

El aminoácido tirosina en solución presenta un tiempo de vida media entre 3.38-3.76 ns, el cual puede ser descrito mediante una curva de decaimiento mono-exponencial.²²⁶ Sin embargo, cuando a este se le adiciona un grupo amina, para generar el N-Acetil Tirosinamina, el ambiente del fenol sufre un cambio, produciendo un decaimiento multi-exponencial. *Unruh et al* han demostrado que péptidos pequeños de tres a cinco aminoácidos presentan decaimientos complejos, con características no-mono-exponenciales.²²⁷ Este comportamiento complejo puede ser explicado si se considera que el enlace C_{α} - C_{β} que posee el aminoácido tirosina, posee libre rotación. Esto genera la existencia de tres rotámeros más importantes $\chi^1 = -60^\circ$, $\chi^1 = 180^\circ$, $\chi^1 = 60^\circ$, tal como se presenta en la figura 45.^{228,229} Cada rotámero presenta un micro-ambiente diferente y posiciona al grupo fenol a distancias distintas de grupos que apagan la fluorescencia, como los grupos amino del enlace peptídico.^{230,231} Como el decaimiento es dependiente del entorno local del fenol, cada rotámero posee un tiempo de vida característico, que se

²²⁶ J.R Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (Springer 1992) vol 3.

²²⁷ J. R. Unruh, M. R. Liyanage y C. K. Johnson, 'Tyrosyl rotamer interconversion rates and the fluorescence decays of N-acetyltyrosinamide and short tyrosyl peptides' (2007) 111(19) *J Phys Chem B* 5494.

²²⁸ W. R. Laws et al, 'Time-resolved fluorescence and 1H NMR studies of tyrosine and tyrosine analogues: correlation of NMR-determined rotamer populations and fluorescence kinetics' (1986) 25(3) *Biochemistry* 599.

²²⁹ J. B. Ross et al, 'Time-resolved fluorescence and 1H NMR studies of tyrosyl residues in oxytocin and small peptides: correlation of NMR-determined conformations of tyrosyl residues and fluorescence decay kinetics' *ibid.* 607.

²³⁰ M. Noronha et al, 'Intramolecular Fluorescence Quenching of Tyrosine by the Peptide α -Carbonyl Group Revisited' (Pt American Chemical Society) (2004) 108(12) *The Journal of Physical Chemistry A* 2155.

²³¹ W. Wiczak et al, 'Mechanism of fluorescence quenching of tyrosine derivatives by amide group' (2001) 341(1-2) *Chemical Physics Letters* 99.

encuentra determinado por las interacciones locales con los residuos cercanos en la estructura tridimensional.²¹⁸ Estos rotámeros pueden ser estudiados para determinar el proceso de auto-organización de una proteína.

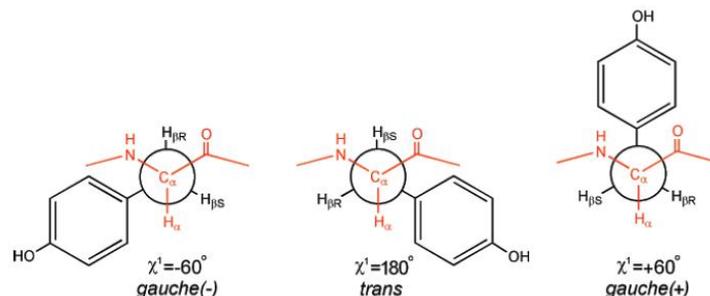


Figura 45. Rotámeros de la tirosina alrededor del enlace $C\alpha-C\beta$. Se observa un posible apagado de la fluorescencia por el grupo carbonilo al menos en la conformación gauche (-). (Extraído de Unruh et al, *J Phys Chem B*, 2007)

Como se comentó anteriormente, el péptido 33-mer posee tres tirosinas en su secuencia primaria, LQLQPFQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF. Las mismas se encuentran ubicadas en la región repetida de este péptido. Teniendo en cuenta estas características, es posible hipotetizar y simplificar el modelo considerando que el comportamiento foto-físico de los tres residuos es idéntico en este sistema. Es así que los cambios en los tiempos de vida o en las contribuciones de cada uno de ellos, se debería a modificaciones en el entorno de los rotámeros de estos aminoácidos, causados por un proceso de oligomerización en solución. De esta manera es posible obtener información del proceso de auto-asociación del péptido de manera no invasiva.

Cuando el péptido 33-mer se encuentra en solución acuosa, se puede determinar la existencia de tres tiempos de vida. (τ_1 , τ_2 , τ_3), cada uno es asignado a un rotámero característico, tal como se observó para el péptido β -amiloide.²³² En la figura 46 A se observan los tiempos de vida obtenidos en las concentraciones desde 100 μ M a 600 μ M. También la contribución de cada tiempo de vida es presentado en la figura 46 B.

²³² O. J. Rolinski, M. Amaro y D. J. S. Birch, 'Early detection of amyloid aggregation using intrinsic fluorescence' (2010) 25(10) *Biosensors and Bioelectronics* 2249.

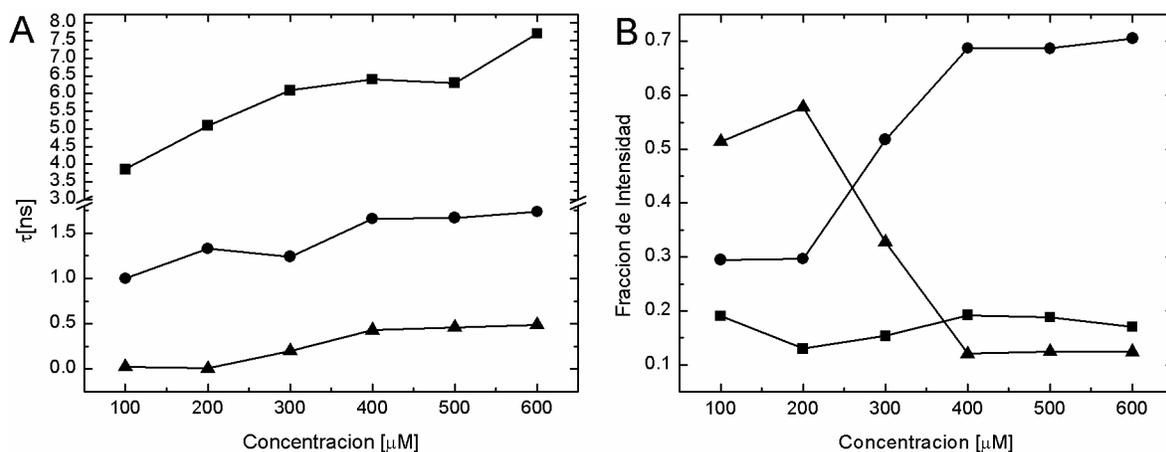


Figura 46. Fluorescencia resuelta en el tiempo del péptido 33-mer en agua a pH 7.0 desde 100 a 600 μM , determinado bajo un modelo tres exponenciales: A) Tiempos de vida, τ_1 (■), τ_2 (●) y τ_3 (▲) y B) fracción de intensidad de los tres tiempos observados f_1 (■), f_2 (●) y f_3 (▲).

En este caso se observó que desde la concentración 100 a 600 μM se producía un incremento notable de los tres tiempos de vida, especialmente de τ_1 , que pasa desde 3.86 a 7.3 ns. Estos cambios pronunciados serían producto de un proceso de oligomerización y agregación, debido a que moléculas del solvente podrían ser reemplazadas por otras del péptido a medida que la concentración de péptido se incrementa. Al observar la fracción de contribución de cada tiempo, se detectó que τ_1 es el mayor tiempo de vida y el que más aumenta pero su contribución permanece constante en el rango de concentraciones analizadas. No obstante τ_3 era el que más contribuyó, seguido por τ_2 . Pero luego τ_3 disminuyó su contribución desde aproximadamente 200 μM , mientras que τ_2 comienza a ser el mayor contribuyente alrededor de esa concentración.

Concentración [μM]	τ_1	f_1	τ_2	f_2	τ_3	f_3	χ^2
100	3.86	0.13	1.00	0.29	0.01	0.51	1.06
200	5.09	0.19	1.24	0.30	0.03	0.58	0.98
300	6.09	0.15	1.33	0.52	0.20	0.33	0.99
400	6.3	0.19	1.66	0.69	0.40	0.12	1.05
500	6.4	0.19	1.66	0.69	0.43	0.12	0.95
600	7.3	0.17	1.67	0.71	0.46	0.12	1.02

Tabla 10. Parámetros obtenidos mediante un ajuste multi-exponencial a cada concentración y los valores χ^2 del ajuste de cada ajuste.

Para determinar cuál es la concentración en la que se observa el mayor cambio en la contribución de la fluorescencia, se realizó un gráfico f_2/f_3 , tal como lo realizaron *Rolinski et al.* para estudiar la agregación temporal del péptido β amiloide.²³²

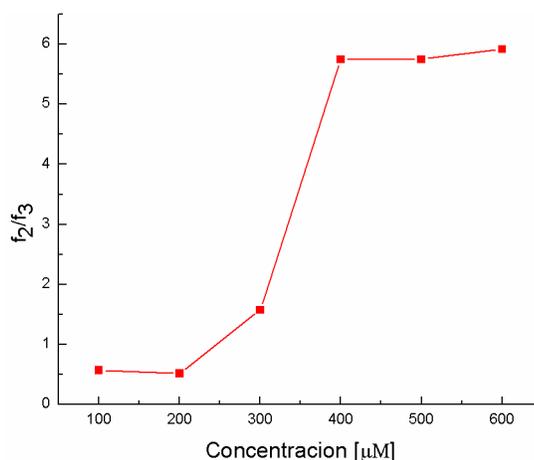


Figura 47. Relación entre las contribuciones de fluorescencia f_2/f_3 en función de la concentración del péptido 33-mer

En este caso se observó una variación sigmoidea de la relación f_2/f_3 . Realizando un ajuste del tipo Hill 1 con el software OriginLab, se pudo determinar que la concentración en la cual se produce el cambio de las contribuciones de cada f_2 y f_3 es $323 \pm 6 \text{ nm}$ ($r^2 = 0.99$). Esto puede deberse a que a dicha concentración se produce un cambio estructural que lleva a una contribución diferencial de los rotámeros debido a un cambio en la exposición en el solvente. Los valores obtenidos para cada concentración se presentan en la Tabla 10. Los cambios observados podrían deberse a que a concentraciones $<$ a $323 \mu\text{M}$ se encontraban presentes oligómeros en un proceso dinámico de interacción. A concentraciones $>$ a $323 \mu\text{M}$, se observó un mantenimiento de las contribuciones aunque los valores de cada uno de los tiempos de vida aumentaban. Esto podría explicarse considerando que a dichas concentraciones existe una estabilización de una estructura secundaria específica mientras que se continúa observando un proceso de oligomerización/ agregación dinámico. Resultados similares fueron en función de la concentración fueron encontrados para el péptido β -amiloide.²¹⁸

4.2.4.3. Evaluación de los decaimientos de anisotropía del 33-mer.

La anisotropía resuelta en el tiempo permite determinar la velocidad a la cual una molécula fluorescente se mueve en solución, ya que el reordenamiento de una partícula en solución depende de su tamaño. Es así que las medidas de anisotropía resuelta en el tiempo permiten obtener información sensible sobre la interacción de fluoróforo con el solvente y moléculas entre sí.²³³ La anisotropía resuelta en el tiempo utilizando TCSPC se base en excitar a la muestra con pulsos de radiación polarizada. Como se comentó anteriormente en la anisotropía de estado estacionario, la probabilidad de que las moléculas absorban radiación depende de la orientación de sus momentos electrónica de transición con respecto al plano de la luz polarizada incidente. Debido a ello, las moléculas son foto-seleccionadas, si su eje de absorción es paralelo al plano de la luz. La fluorescencia resultante se encuentra polarizada dependiendo del grado de movilidad del fluoróforo desde el momento que se produce la excitación hasta que se produce la emisión. Por lo tanto, midiendo el decaimiento de anisotropía es posible determinar el movimiento rotacional de la molécula mediante el cálculo del tiempo de correlación rotacional.²³⁴ Cuanto mayor es el tamaño de la molécula, mayor es el tiempo que esta requiere para reordenarse en solución y mayor es el tiempo de correlación rotacional.

En general, se ha determinado que en la anisotropía resuelta en el tiempo de proteínas, si existe al menos un tiempo de correlación rotacional se debe a la rotación de toda la molécula, siendo este mayor a 1 ns. Si este es menor a 1ns, se puede considerar que el fluoróforo se encuentra moviéndose independientemente de la proteína.²³⁵ Por otro lado, cuando se observa incremento del coeficiente rotacional de una proteína puede estar relacionado con un proceso de estructuración o aumento del tamaño de la proteína, posiblemente debido a un proceso de oligomerización / agregación, con formación de estructuras mayores y coeficientes rotacionales mayores.¹⁶⁹ Teniendo en cuenta esto, se

²³³ D.M. Jamenson, *Introduction to Fluorescence* (2014).

²³⁴ D. Allsop et al, 'Fluorescence anisotropy: a method for early detection of Alzheimer beta-peptide (Abeta) aggregation' (2001) 285(1) *Biochem Biophys Res Commun* 58.

²³⁵ T. M. Nordlund, X. Y. Liu y J. H. Sommer, 'Fluorescence polarization decay of tyrosine in lima bean trypsin inhibitor' (1986) 83(23) *Proc Natl Acad Sci U S A* 8977.

realizaron estudios de decaimiento de anisotropía de péptido 33-mer dependiente de la concentración en el rango comprendido entre 200 y 600 μM .

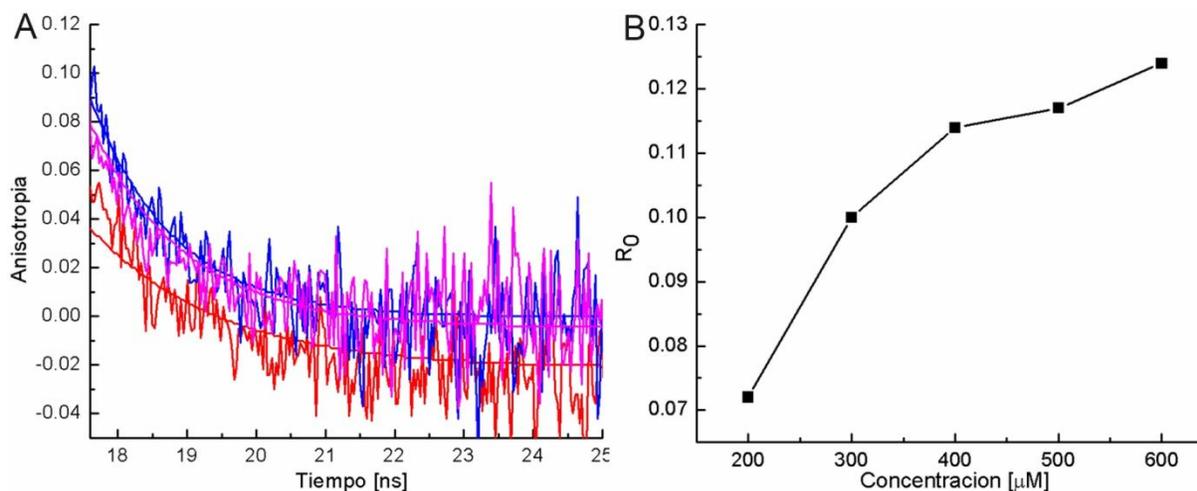


Figura 48. A) Decaimientos de anisotropía del péptido 33-mer en agua de las concentraciones 200 μM (rojo), 400 μM (rosa) y 600 μM (azul). B). representación de los tiempos de correlación rotacional θ obtenidos para cada concentración y la anisotropía en el tiempo inicial, donde no hay difusión rotacional (r_0)

Los decaimientos de anisotropía observados fueron ajustados mediante una curva mono-exponencial, por lo que se obtuvo un solo un tiempo de correlación rotacional (θ) para cada concentración. Sin embargo se esperaba obtener al menos dos tiempos de correlación rotacional, uno correspondiente al movimiento de los oligómeros, de mayor valor y otro correspondiente a los aminoácidos tirosina, con un tiempo de correlación pequeño, como se ha observado en diferentes proteínas, como el Inhibidor Pancreático de Tripsina Bovino, que posee cuatro tirosinas.²³⁶ Esto puede atribuirse que en estas condiciones el ajuste utilizado no logró resolver el componente que presenta el menor tiempo de correlación. Este comportamiento podría explicarse considerando la posibilidad de la existencia de transferencia no radiativa existente entre las tirosinas presentes en el péptido. Esto podría producirse si las tirosinas se encuentran cercanas entre sí espacialmente en el oligómero. Este proceso afecta a este tipo de medidas y pero no lo hace en la determinación de los tiempos de vida.²³⁷

²³⁶ J. R. Lakowicz, G. Laczko y I. Gryczynski, 'Picosecond resolution of tyrosine fluorescence and anisotropy decays by 2-GHz frequency-domain fluorometry' (1987) 26(1) *Biochemistry* 82.

²³⁷ Y. Yan y G. Marriott, 'Analysis of protein interactions using fluorescence technologies' (2003) 7(5) *Current Opinion in Chemical Biology* 635.

Por otro lado, es importante destacar que en la secuencia de este péptido, se observa que las tres tirosinas están presentes en la secuencia PYP. Estudios realizados por *Haas* demostraron que péptidos pequeños, por ejemplo el tripéptido Y-P-N que contienen la secuencia P-Y, presentan una curva de decaimiento mono-exponencial. Esto se explicó, teniendo en cuenta que ocurre un apagamiento estático producido por la rigidez de la prolina y la capacidad de generar isomerización cis/trans. Considerando que en nuestro péptido existen dos prolinas unidas a cada tirosina, este efecto podría ser mayor, induciendo a la inmovilización de las tirosinas.²³⁸

En procesos en los cuales existe la formación de oligómeros o agregados, se observa un incremento del tiempo de correlación rotacional.¹⁶⁹ En este caso se observó que el valor obtenido es cercano a 1 ns, el cual es esperable para péptidos pequeños. A medida que la concentración de proteína aumentaba, tal como se presenta en la tabla 11, la variación del tiempo de correlación rotacional aumentó ligeramente. Este comportamiento del tiempo de correlación rotacional puede atribuirse a que en estas condiciones se detecta la movilidad de una de las moléculas del péptido y que las mismas se encuentran en un equilibrio dinámico entre sí, tal como se observó mediante la técnica de Dispersión de Luz Dinámica-Correlación 3D, detectándose una sola contribución promedio (Figura 39 y Tabla 9).

Concentration [μ M]	θ [ns]	R_0
200	1.01	0.072
300	1.51	0.1
400	1.40	0.114
500	1.20	0.117
600	1.36	0.124

Tabla 11. Parámetros obtenidos a partir de un ajuste mono-exponencial de los decaimientos de anisotropía, siendo θ el tiempo de correlación rotacional y R_0 la anisotropía al tiempo inicial.

²³⁸ E. Haas et al, 'Local structure in a tryptic fragment of performic acid oxidized ribonuclease A corresponding to a proposed polypeptide chain-folding initiation site detected by tyrosine fluorescence lifetime and proton magnetic resonance measurements' (1987) 26(6) *Biochemistry* 1672.

Mediante esta técnica se determinó el valor de R_0 , el cual corresponde a la anisotropía antes de que se produzca la rotación de la molécula. Al estudiar la anisotropía (R_0) se observó el mismo comportamiento que la de estado estacionario, obteniéndose una curva de variación sigmoidea. La misma fue ajustada mediante una ecuación de Hill, determinándose que la concentración a la que se observa un cambio notable de R_0 es $183 \mu\text{M} \pm 5.5 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0.99$). Esta concentración coincide con la observada a través de CD, en la que se observó un cambio conformacional desde una estructura desordenada a PPII. Sin embargo la anisotropía al infinito a todas las concentraciones dio un valor cercano a cero, aunque se esperaría que este valor fuera mayor debido a un proceso de oligomerización. Esto se ha observado en péptidos cuyos oligómeros poseen un peso molecular menor a 50 Kda.¹⁶⁹ Este comportamiento podría explicarse considerando que las moléculas del péptido se encuentran en un equilibrio dinámico en solución.

Teniendo en cuenta estos resultados se propone realizar en estudios posteriores en los cuales el péptido se encuentre marcado con una sonda fluorométrica adecuada como pireno, dansyl o isotiocianato de fluoresceína y monitorear mediante fluorescencia de estado estacionario y resuelta en el tiempo el proceso de oligomerización del péptido 33-mer.

Sección III

Elucidación del mecanismo de auto-organización del péptido 33-mer en la interfase aire/mica mediante Microscopía de Fuerza Atómica.

4.3.1. Introducción:

La microscopía de fuerza atómica se basa en utilizar una sonda que se mueve sobre la superficie de a muestra generando un mapa topográfico de la misma. Esta sonda denominada cantilever, detecta las fuerzas capilares, electrostáticas, de Van der Waals y friccionales que se establecen con la muestra. Este sistema se encuentra constituido por el cantilever, que puede encontrarse inmóvil u oscilar, transductores piezoeléctricos (scanners), transductores de fuerza y el control de retroalimentación. El scanner mueve la punta respecto de la superficie o viceversa (dependiendo del modelo del equipo) en los tres ejes, mientras que el transductor de fuerza detecta el cambio de fuerzas que se establecen entre la punta y la muestra a medida que se recorre la muestra. El control de retroalimentación reenvía la señal al piezoeléctrico para mantener la fuerza fija entre la punta y la muestra y de esa manera poder obtener la imagen. La mayoría de los AFMs modernos utilizan un sistema de deflexión de rayo láser, donde el láser es reflejado desde un cantilever reflectivo hacia un foto-detector sensible a la posición (Foto-detector de fotodiodo de cuatro cuadrantes) (Figura 49). El camino óptico entre el cantilever y el fotodetector produce una amplificación mecánica de la señal del láser y, como consecuencia, el sistema llega a detectar los movimientos verticales de la punta con una precisión inferior a un Ångstrom.²³⁹

²³⁹ Peter.; West Eaton, Paul. , *Atomic Force Microscopy* ,Oxford University Press, (2010).

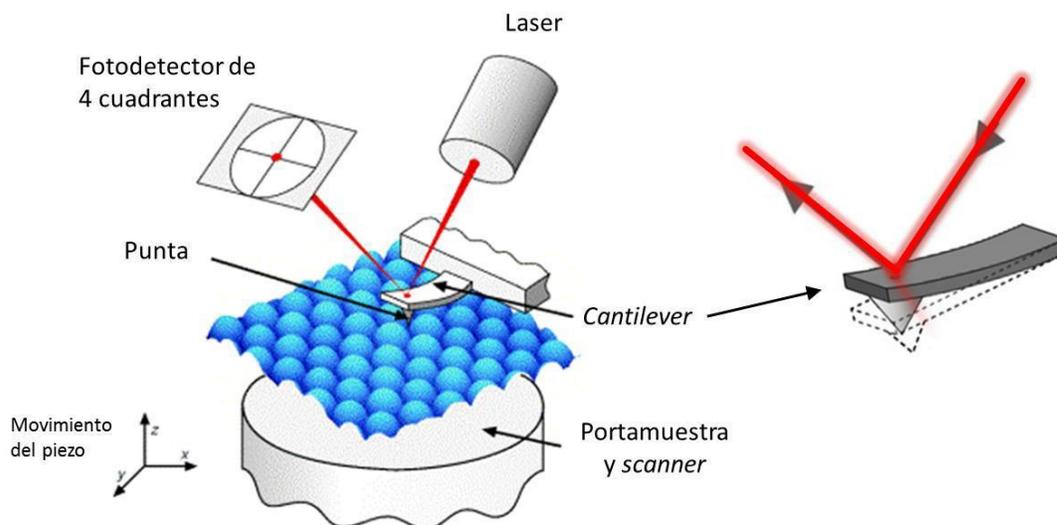


Figura 49. Esquema básico de un AFM y de su sistema de deflexión de láser.

Este sistema ha sido ampliamente utilizado en el estudio de procesos de oligomerización y agregación de proteínas, ya que permite evaluar este proceso sin dañar a la muestra, estudiando a la misma en medios hidratados y permite realizar el seguimiento de la muestra en función del tiempo.

²⁴⁰Es así que este sistema ha sido empleado en el estudio de sistemas auto-agregables como el péptido β -amiloide ²⁴¹y la alfa-sinucleína.²⁴²

En base a los resultados estructurales y microscópicos, presentados en los apartados anteriores, se decidió estudiar el proceso de oligomerización/agregación del péptido 33-mer, en función de la concentración sobre mica. Para este estudio se decidió aplicar la técnica de microscopía de fuerza atómica o AFM. Esta metodología fue seleccionada debido a que permite obtener una mejor resolución de las estructuras observadas, las mismas se encuentran en un estado hidratado y permite obtener información topográfica sin manipulación química. La elección de la mica (un aluminosilicato) se fundamenta en que este soporte es atómicamente plano, brindando así una adecuada

²⁴⁰ P.C. Braga y D. Ricci, *Atomic Force microscopy*, Humana Press, (2004).

²⁴¹ A. Parbhu et al, 'Imaging real-time aggregation of amyloid beta protein (1–42) by atomic force microscopy' (2002) 23(7) *Peptides* 1265.

²⁴² J. Fauerbach et al, 'Characterization of Alpha-Synuclein Early Aggregates by Atomic Force Microscopy' (Pt Elsevier) 98(3) *Biophysical Journal* 253a. (2010)

resolución de muestras con escaso espesor, como son aquellas empleadas en biología.²⁴³ Además las características superficiales como la carga y su hidrofiliidad elevada, hacen que este posea propiedades miméticas a las membranas biológicas.²⁴⁰ Para este estudio se seleccionaron cuatro concentraciones: 6, 60, 250 y 610 μM en medio acuoso. La elección de este medio se fundamenta en evitar la presencia de sales y artefactos que pudieran dificultar la medición, especialmente producir daños en el sensor del AFM. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo en modo contacto. La muestra fue preparada mediante deposición de la misma sobre la superficie de mica y a continuación secado a temperatura ambiente bajo un ambiente de nitrógeno.

4.3.2. Caracterización de los oligómeros de 33-mer a 6 μM .

Los datos de CD y de ATR-FTIR presentados, revelaron que el péptido presenta una estructura desordenada a bajas concentraciones. Sin embargo no se ha podido visualizar la presencia de agregados a estas concentraciones. Mediante AFM fue posible detectar la capacidad de 33-mer de auto-organizarse a baja concentración sobre una superficie mimética de una membrana biológica, como la mica.

A la concentración 6 μM se observó la presencia de esferas discretas y clusters, ambos con altura de $1.1 \pm 0.5\text{nm}$ (Figura 50)

²⁴³ H. G. Hansma y J. H. Hoh, 'Biomolecular imaging with the atomic force microscope' (1994) 23 *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 115.

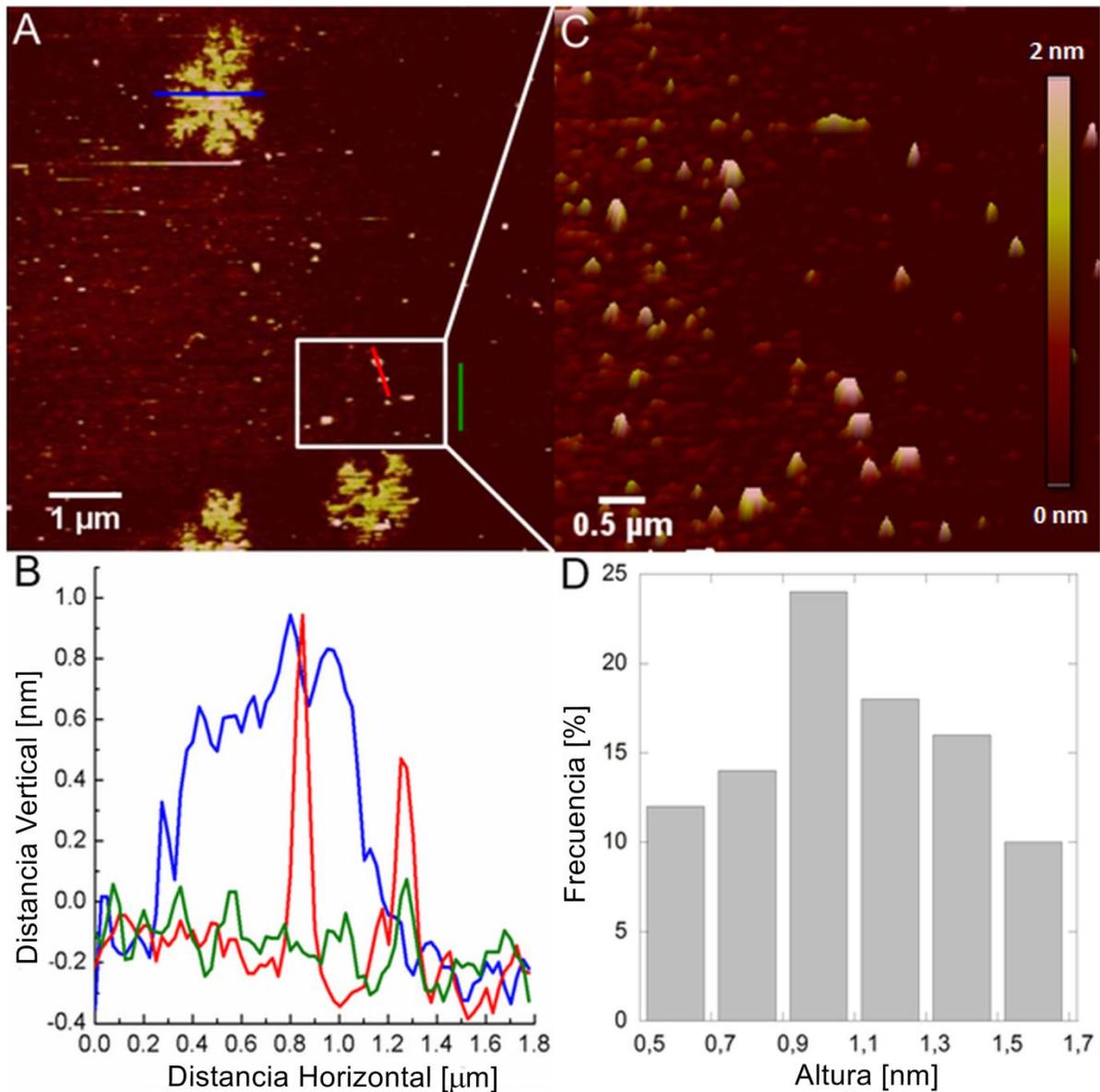


Figura 50. A). Imagen de AFM (modo contacto, $6 \times 6 \mu\text{m}^2$) del péptido 33-mer depositado en mica a partir de una solución acuosa a pH 7.0. B) Cortes por secciones de la imagen topográfica A: mica (línea verde) y las estructuras peptídicas adsorbidas (líneas roja y azul). C) Imagen 3D de la región marcada en la imagen A, mostrando los oligómeros esféricos discretos. D) Distribución de alturas del total de las estructuras detectadas en la imagen A del péptido 33-mer.

El radio medio de las esferas discretas es de 6.40 ± 0.72 nm. Este valor fue obtenido mediante las ecuaciones propuestas por *Pietrasanta et. al* (ver Materiales y Métodos). Considerando los oligómeros esféricos aislados, se estimó que 156 moléculas se encontraban formando las estructuras más pequeñas. Las arquitecturas tipo cluster son similares a los patrones fractales que han sido

previamente descritos en procesos de agregación de coloides y péptidos, como agregación limitada por la difusión (DLA).^{244,245} Para describir este tipo de estructuras se determina la Df . La dimensión fractal para sistemas que se agregan mediante DLA, presentan un valor teórico cercano a 1.715 (sin que existan interacciones del tipo dipolares). En este caso, al determinar la Df de los clusters del péptido 33-mer, mediante el método de conteo en caja, se obtuvo un valor de 1.62 ± 0.02 . Este valor menor puede deberse a un efecto de depleción que se observa en sistemas reales, por lo que el valor teórico se aleja del valor ideal anteriormente presentado.^{246, 247} Teniendo en cuenta que por técnicas como DLS, no fueron detectados oligómeros por debajo de la concentración $125 \mu\text{M}$, es posible hipotetizar que al depositar el péptido 33-mer, este queda confinado en un espacio bidimensional. El incremento de concentración sobre la superficie lleva a la nucleación, generando pequeños agregados esféricos. En un ambiente favorable, estas partículas pueden difundir mediante movimiento Browniano sobre el sustrato y dar lugar a la formación de clusters fractales. En este contexto, las partículas individuales pueden ser consideradas como "semillas" o sitios de nucleación para el proceso de auto-organización.

4.3.3. Caracterización de los oligómeros de 33-mer $60 \mu\text{M}$.

A la concentración $60 \mu\text{M}$ se observó un mayor cubrimiento de la superficie y la presencia de diferentes estructuras cuaternarias. Estas estructuras se encontraban formadas por oligómeros esféricos, dispuestas de manera lineal e interconectada y además se observó la formación estructuras del tipo anular y agregados planos. Teniendo en cuenta este comportamiento, podemos hipotetizar que la concentración de péptido sobre la superficie, juega un rol fundamental en su auto-

²⁴⁴ B Mandelbrot, *The Fractal Geometry of Nature* (W. H. Freeman and Company, 1983).

²⁴⁵ T. A. Witten y L. M. Sander, 'Diffusion-limited aggregation' (Pt American Physical Society) (1983) 27(9) *Physical Review B* 5686.

²⁴⁶ J-F. Gouyet, 'Natural Fractal Structures to the Microscopic' in Springer (ed), *Physics and Fractal Structures* (1996).

²⁴⁷ P. Meakin, 'Diffusion-controlled cluster formation in 6-dimensional space' (Pt American Physical Society) (1983) 27(3) *Physical Review A* 1495.

organización sobre mica. Esto fue observado previamente en sistemas como sericina¹²⁸ y colágeno.

248

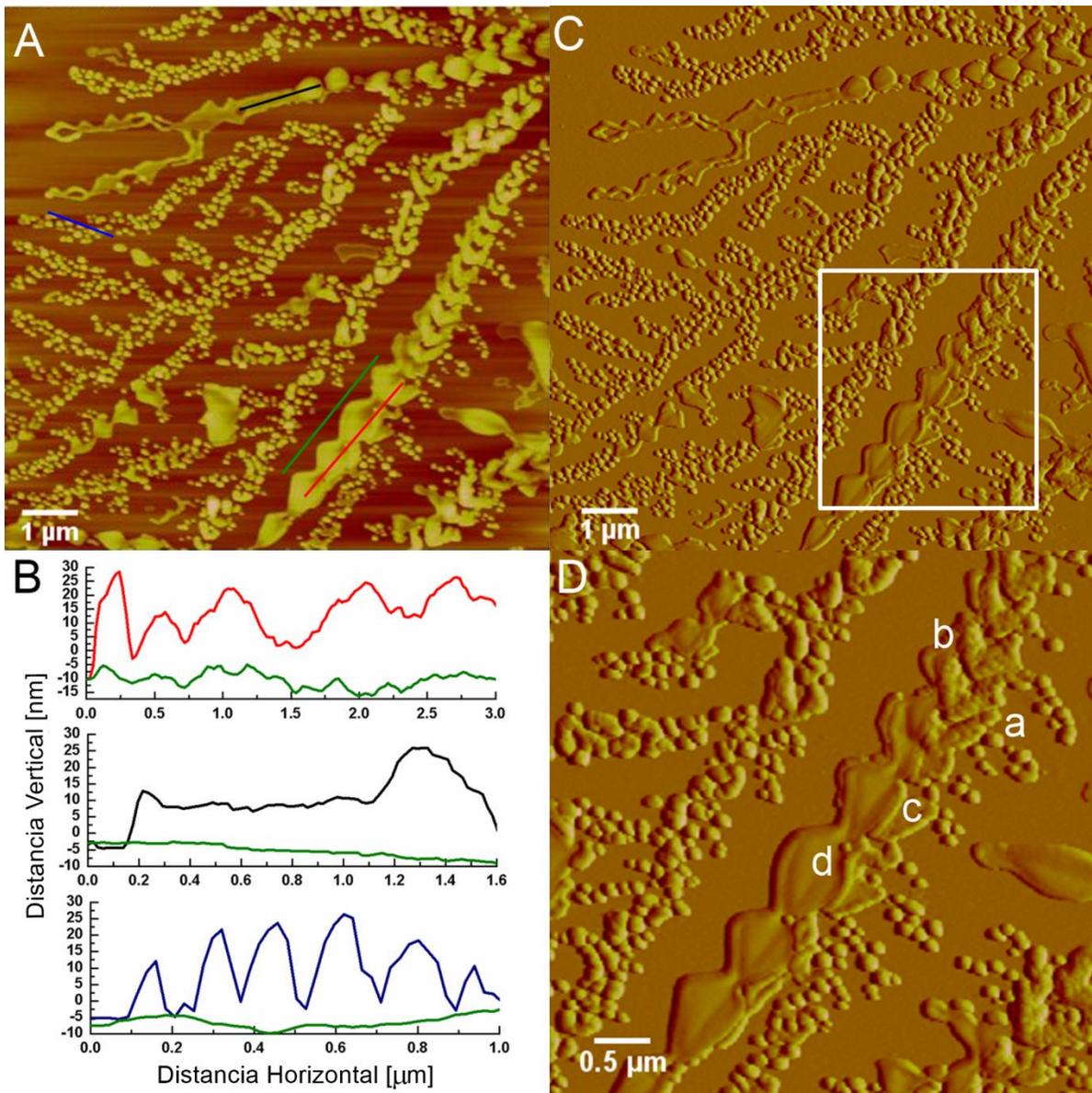


Figura 51. A) Imagen topográfica de AFM (modo contacto, $9.6 \times 9.6 \mu\text{m}^2$) del péptido 33-mer depositado de una solución acuosa $60 \mu\text{M}$, pH 7. Las diferentes estructuras se presentan con marcas coloreadas: placas (rojo), filamentos (negro) y esferas (azul). B) Corte por secciones de la imagen presentada en A): topografía del sustrato (línea verde) y estructuras peptídicas adsorbidas (líneas roja, azul y negra). C) Imagen de error de deflexión, permitiendo observar en detalle las estructuras presentes en la imagen A. D) Imagen de error de

²⁴⁸ V. K. Yadavalli, D. V. Svintradze y R. M. Pidaparti, 'Nanoscale measurements of the assembly of collagen to fibrils' (2010) 46(4) *International Journal of Biological Macromolecules* 458.

deflexión ($4.8 \times 4.8 \mu\text{m}^2$) de la sección marcadas en la imagen C, presentando la organización jerárquica del péptido 33-mer desde estructuras esféricas (a), anulares (b) estructuras planas: filamentos (c) y placas (d).

La altura media de las esferas se encontraba entre 27.5 ± 6.0 nm. La ausencia de las nanoesferas más pequeñas detectadas a $6 \mu\text{M}$ (1.1 ± 0.5 nm) puede deberse a que estas interactúan entre sí, mediante un fenómeno de coalescencia, generando las estructuras esféricas grandes, observadas en la Figura 51.

Además dos motivos diferentes de estructuras planas se observaron en una proporción menor, una con una altura media de 21.0 ± 5.4 nm y la segunda de 30.0 ± 5.6 nm. La morfología de las estructuras planas del tipo láminas, se asemejaban a filamentos del tipo lineares y placas (Figura 51 A and B: líneas negras y rojas). Una observación detallada de la imagen sugiere la existencia de una organización del tipo jerárquica desde oligómeros esféricos aislados pasando por estructuras del tipo anulares hasta llegar finalmente a aquellas del tipo planas, similares a láminas. (Figura 51 D). La existencia de diferentes morfologías en esta condición sugiere que el péptido 33-mer no solo se auto-organiza utilizando un mecanismo coloidal clásico, en el cual las moléculas interactúan por coalescencia.²⁴⁹ Probablemente las características intrínsecas de este péptido (como su tamaño y propiedades superficiales) favorecerían a la formación de las nuevas morfologías planas (Figura 51).

²⁴⁹ P. Meakin, 'Models for Colloidal Aggregation' (1988) 39 *Annual Review of Physical Chemistry* 237.

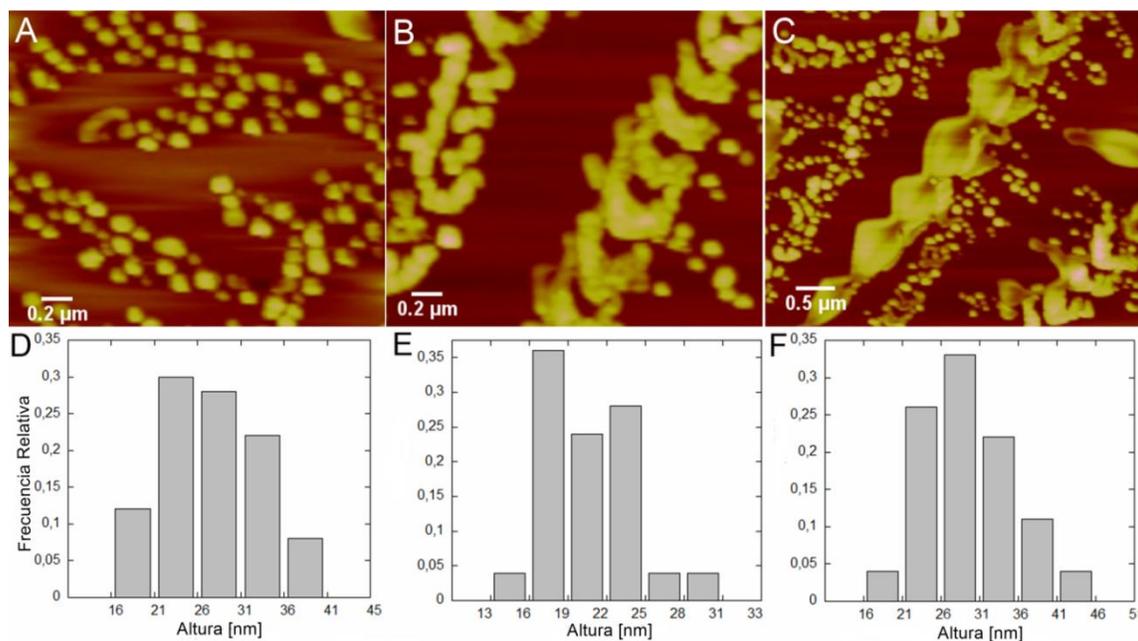


Figura 52. Imágenes topográficas seleccionadas de la figura anterior mostrando las diferentes especies observadas: A) Oligómeros esféricos, B) estructuras anulares, C) estructuras similares a láminas. D), E) and F) Distribución de altura de las imágenes A), B) y C) respectivamente. En el análisis estadístico correspondiente, se emplearon 50 partículas para cada uno de los motivos estructurales.

La Df obtenida de la imagen 51 A fue de 1.73 ± 0.02 . Este valor es consistente con lo reportado en diferentes modelos y permite explicar la elevada polidispersidad observada en los estudios de DLS -Correlación 3D.

4.3.4. Caracterización de los oligómeros de 33-mer a 250 μM.

A la concentración 250 μM se observó la presencia de estructuras esféricas, lineares y anulares, con una altura media de 14.0 ± 6.0 nm, 18.0 ± 2.0 nm and 28.0 ± 8.0 nm respectivamente. A esta concentración, también se observó la presencia de estructuras del tipo de láminas planas con una altura media de 65 ± 15 nm, ocupando la mayor parte de la superficie.

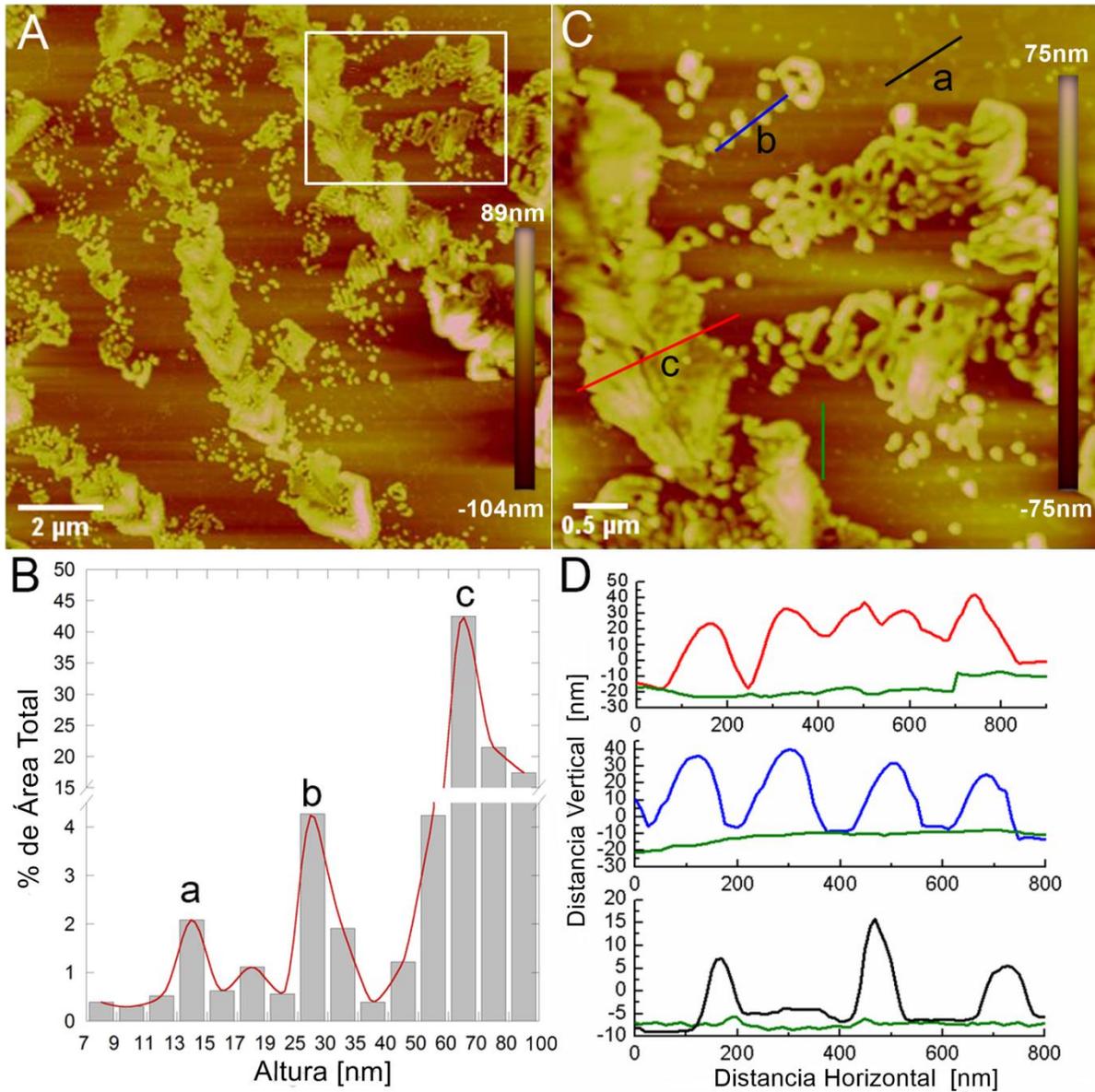


Figure 53. A) Imagen topográfica de AFM ($12.7 \times 12.7 \mu\text{m}^2$) del péptido 33-mer depositado en mica de una solución $250 \mu\text{M}$ en medio acuoso a pH 7.0. B) Distribución de alturas del total del péptido 33-mer observado en la imagen A: estructuras esféricas (a), Clúster de estructuras esféricas (b) y estructuras planas (c). C) Imagen topográfica de AFM (modo contacto, $5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de la sección marcada en la imagen A). Las diferentes estructuras son mostradas mediante las marcas coloreadas: placas (rojo), clúster de estructuras esféricas (azul) y esferas aisladas (negro). D) Corte por secciones de la Imagen de topografía C): mica (línea verde) y estructuras del péptido adsorbido (líneas color rojo, azul y negro).

Las estructuras del tipo planar podrían haberse generado a partir de un proceso de agregación en el cual se observa a la interacción y coalescencia de estructuras esféricas y las anulares (Figura 53). En este caso, se obtuvo un valor de D_f de 1.73 ± 0.03 , el cual es consistente con un tipo mecanismo

de auto-organización del tipo DLA. Aunque las estructuras finales observadas pueden modificarse por la interacción con la superficie, la distribución de tamaños obtenidos se correlaciona con las observaciones de DLS-Correlación 3D (Ver Sección II). En este caso tampoco se pudo detectar las esferas pequeñas (1.1 ± 0.5 nm), demostrado la capacidad de estos oligómeros de interactuar entre ellos para formar las estructuras observadas en las figura 53.

4.3.5. Caracterización de los oligómeros de 33-mer a 610 μ M.

A la concentración 610 μ M, la deposición del péptido 33-mer revela la presencia de agregados diferentes a los observados a concentraciones menores. A esta concentración la superficie se encuentra cubierta principalmente por filamentos interconectados y ensamblados similares a placas, rodeados de nano-estructuras esféricas (Figura 54). La morfología de dichos agregados interconectados ha sido observado previamente en sistemas como péptidos coil-coil²⁵⁰ y péptidos diseñados cuya estructura era del tipo láminas β .²⁵¹

²⁵⁰ A. Lomander, W. Hwang y S. Zhang, 'Hierarchical Self-Assembly of a Coiled-Coil Peptide into Fractal Structure' (Pt American Chemical Society) (2005) 5(7) *Nano Letters* 1255.

²⁵¹ R. Sneer et al, 'Parallel β -Sheet Assemblies at Interfaces' (Pt WILEY-VCH Verlag) (2004) 5(5) *ChemPhysChem* 747.

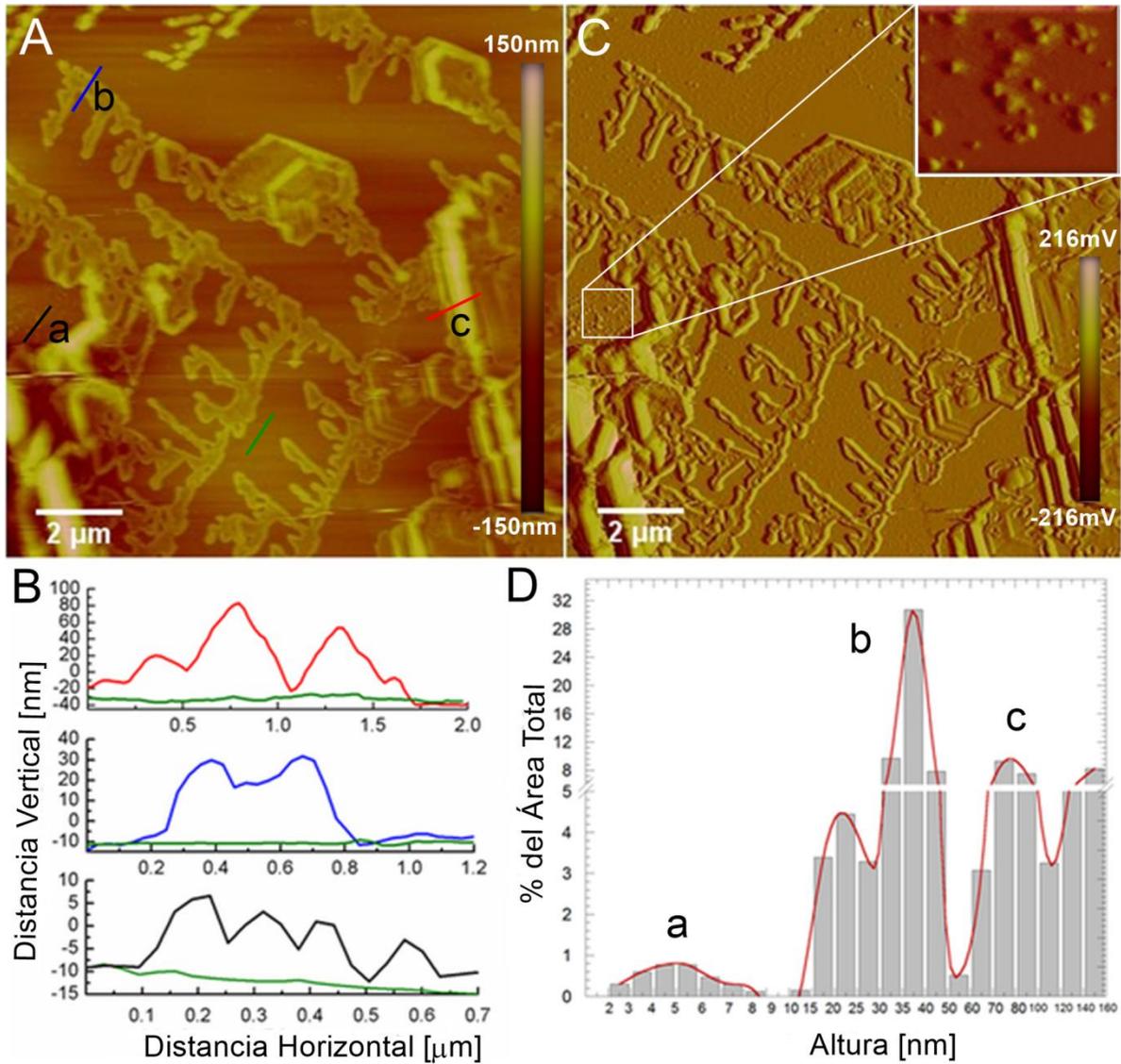


Figure 54. A) Imagen topográfica de AFM (modo contacto, $12.7 \times 12.7 \mu\text{m}^2$) del péptido 33-mer depositado sobre mica de una solución acuosa $610 \mu\text{M}$ a pH 7. Las diferentes estructuras se muestran mediante las siguientes marcas: placas (rojo), filamentos (azul) y nano-estructuras esféricas (negro). B) Corte por secciones de la imagen topográfica A: topografía del sustrato (mica, línea verde) y el péptido adsorbido (líneas de color rojo, azul y negro). C) Imagen de AFM de error de deflexión presentando un zoom de las nano-estructuras esféricas. D) Distribución de alturas del total de las estructuras detectadas del péptido 33-mer en la imagen A: nano-estructuras esféricas (a), filamentos (b) y placas (c).

La altura media de los filamentos fue de $35.8 \pm 6.0 \text{ nm}$. La altura máxima detectada ($80.0 \pm 20.0 \text{ nm}$) es consistente con la formación de placas organizadas en "forma de escalera". Como se mencionó

previamente, las placas se encuentran rodeadas de nanoesferas de estructuras de 5.1 ± 1.5 nm de altura promedio.

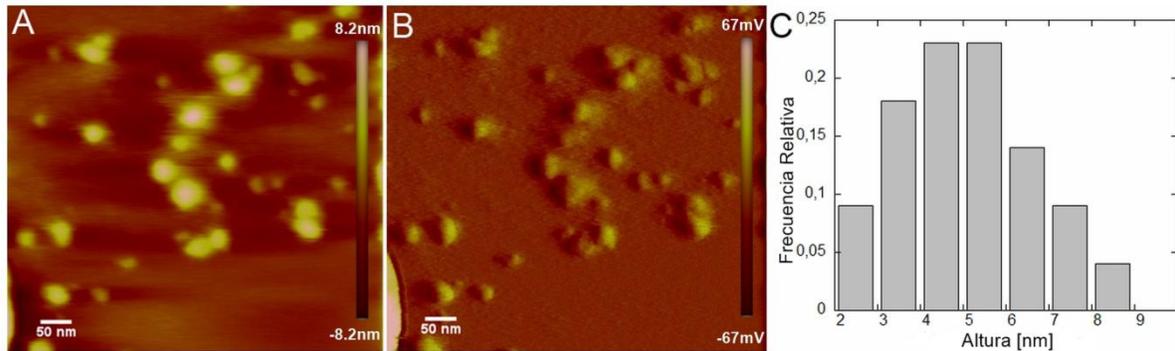


Figura 55. Oligómeros observados del péptido a $610\mu\text{M}$ en agua, pH7 en: A) topográfico y B) Imagen de error de deflexión. C) Distribución de altura de las partículas observadas (análisis estadístico realizado con un total de 50 partículas).

Cuando la muestra se deposita sobre la superficie, la disminución de grados de libertad, favorece a que los oligómeros interactúen entre sí, como vimos a baja concentración. Sin embargo si ya hubiera en solución filamentos, estos podrían actuar como segundo centro de nucleación. Los filamentos podrían establecer contactos laterales que dan lugar a la formación de las placas detectadas. La D_f calculada decae a 1.67 ± 0.04 ., y esto se puede explicar por efecto de depleción que se observa en diferentes sistemas fractales como péptido coil-coil ²⁵⁰, nanoesferas de silicateninas ²⁵²y sericina. ¹⁸⁸ Este comportamiento se debe a la anisotropía de los filamentos que favorecen la adición de pequeños oligómeros en un eje preferencial del agregado. Debido a esto se propone un tipo de mecanismo de auto-organización fractal regido por DLA.

La detección de los filamentos y las nano-estructuras esféricas de manera simultánea, sin la observación de intermediarios (Figura 54 y 56), implicaría que estos filamentos podrían actuar como nuevos sitios de nucleación de las partículas más pequeñas, limitando la interacción de estas nanopartículas entre sí. Este resultado es similar al observado mediante microscopía electrónica en mica y en Formvar a la misma concentración.

²⁵² M. M. Murr y D. E. Morse, 'Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments' (Pt National Academy of Sciences) (2005) 102(33) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 11657.

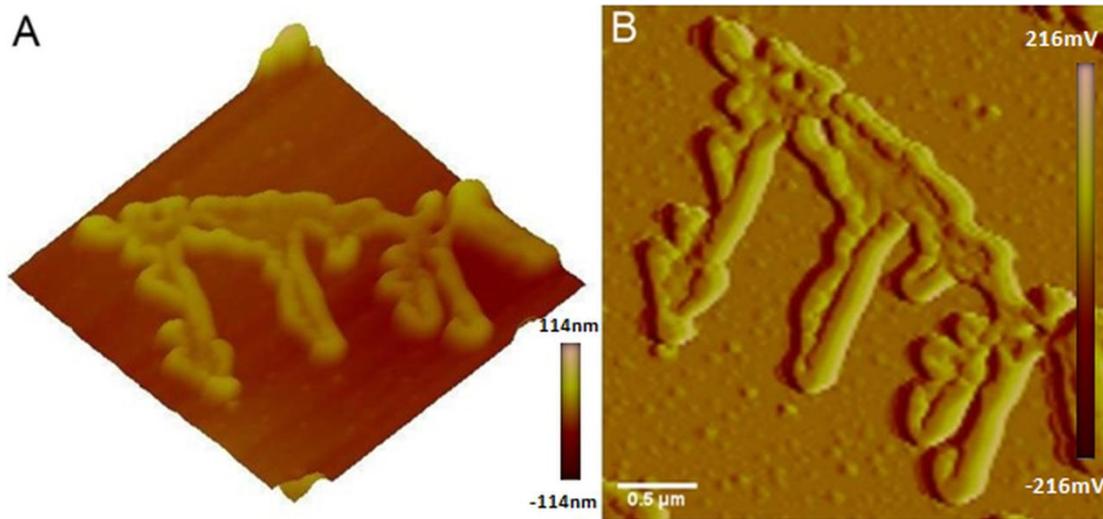


Figura 56. A) Imagen tridimensional de topografía (modo contacto, $3.2 \times 3.2 \mu\text{m}^2$) del péptido 33-mer depositado en mica, solución $610 \mu\text{M}$ en agua pH 7. B) Imagen de AFM (error deflexión) mostrando las nano-nano-estructuras esféricas del fondo que rodean a los filamentos lineares.

Por lo tanto, el péptido 33-mer es capaz de auto-organizarse en una superficie mimética a las membranas biológicas, generando nano-estructuras esféricas, anulares y lineales, como filamentos. Al aumentar la concentración se observa un incremento de la formación de estructuras planas similares a láminas. Esto permite proponer que este péptido es capaz de auto-organizarse ensamblarse mediante un mecanismo del tipo DLA.

4.3.6. Caracterización de los oligómeros de 33-mer en buffer HEPES.

Finalmente, se realizó una prueba de 33-mer a $60 \mu\text{M}$ utilizando un Buffer HEPES 20 mM, pH 7.4. Las muestras fueron preparadas de igual manera que las anteriormente presentadas en este capítulo pero la adquisición de las imágenes fue realizada en modo contacto intermitente (tapping). En este caso se observó que el péptido 33-mer se auto-asocia de manera similar a lo observado en agua, en nano-esferas, fibras y estructuras planas. (Figuras 57 y 58).

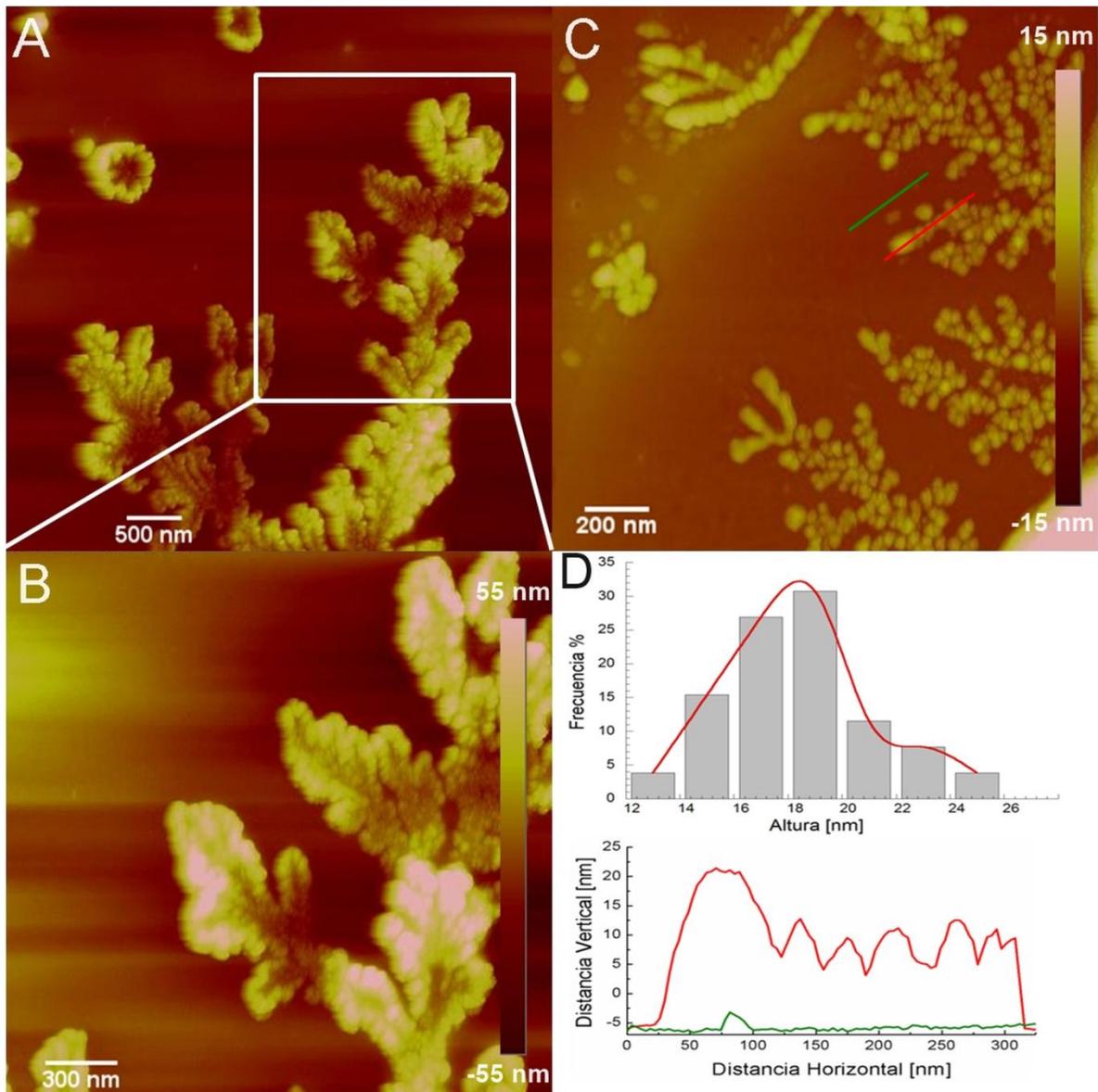


Figura 57. A) Imagen topográfica de AFM (modo intermitente, $5 \times 5 \mu\text{m}^2$) del péptido 33-mer depositado sobre mica de una solución acuosa de HEPES 20 mM, $60 \mu\text{M}$ a pH 7.4. En este caso se observan fibras cubriendo una amplia región del campo estudiado. B) Ampliación de la región seleccionado en A), (modo intermitente, $2.3 \times 2.3 \mu\text{m}^2$). C) Ampliación de otra región en la que se observan las fibras (modo intermitente, $1.6 \times 1.6 \mu\text{m}^2$). En esta imagen es posible apreciar en detalle que estas se encuentran compuestas por nanosferas. D) Distribución de alturas del total de las estructuras detectadas del péptido 33-mer en la figura y corte de la sección de la imagen C), verde: superficie, rojo fibras.

En esta condición se pudo observar que el péptido 33-mer, al igual que en agua, es capaz de auto-organizarse generando fibras (Figura 57) y estructuras planas similares a placas. En la Figura 57 C se puede ver claramente que las fibras se encontraban constituidas por la asociación lateral de nano-

esferas, que luego coalescen para generar nano-estructuras mayores similares a placas de altura media 71 ± 17 nm. Este comportamiento es similar a lo detectado anteriormente en agua a $60 \mu\text{M}$. La D_f de los agregados observados en la Figura 57 C, fue de 1.60 ± 0.04 . Si bien este valor es menor al esperado, este se encuentra en el rango de los valores que describen a un mecanismo de auto-ensamblado mediado por DLA.

Además de las fibras y los agregados eran similares a placas observadas en la figura 56. Se detectaron varios campos cubiertos por nano-esferas, tal como se presenta en la figura 58.

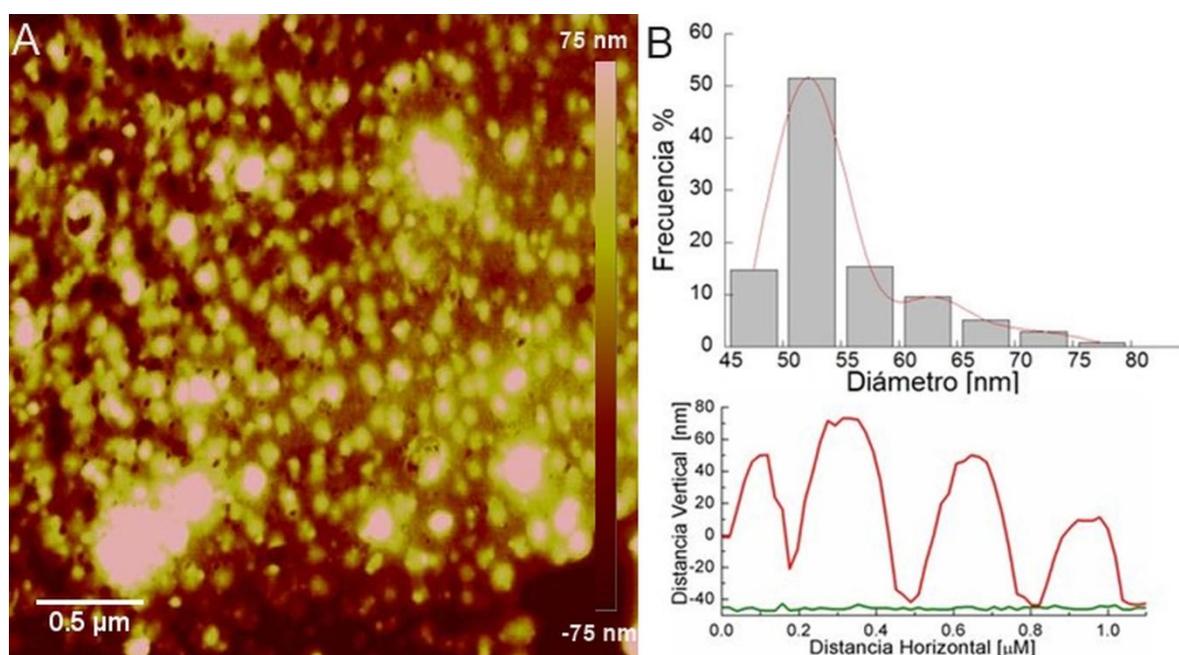


Figura 58. A) Imagen topográfica de AFM (modo intermitente, $3 \times 3 \mu\text{m}^2$) del péptido 33-mer depositado sobre mica de una solución acuosa de HEPES 20 mM, $60 \mu\text{M}$ a pH 7.4. En este caso se observan la presencia de nano-esferas, algunas de ellas interactuando con otras. B) Distribución de alturas del total de las estructuras detectadas del péptido 33-mer en la figura y corte de la sección de la imagen A), verde: superficie, rojo fibras.

En la Imagen 58, se muestra un elevado cubrimiento del campo con nano-esferas, cuya altura media era de 53 ± 9 nm. Algunas de estas nano-estructuras esféricas interactúan con otras, formando arreglos lineales. La D_f calculada para esta imagen fue de 1.75 ± 0.04 , lo cual corrobora un mecanismo de auto-ensamblado regido por DLA:

En resumen, el péptido 33-mer demostró que posee la capacidad de formar oligómeros a concentraciones bajas como 6 μM cuando se deposita sobre mica. Al incrementar la concentración se observa la presencia de esferas alineadas, arreglos del tipo anulares y estructuras filamentosas. A la máxima concentración estudiada, la cercanía establecida por los oligómeros y la reducción de grados de libertad sobre la superficie, puede favorecer a que los oligómeros se organicen en filamentos. Estos, a través de interacciones laterales pudieron haber generado las placas detectadas. Este tipo de morfologías han sido observadas previamente en sistemas amiloides, tales como el del péptido β -amiloide y en la proteína α -sinucleína. En estas proteínas, además de observarse la existencia de fibras, se ha detectado la formación de "globulómeros", cuyos tamaños abarcan desde los nanómetros a varios micrómetros de diámetro.^{253, 254} Para cuantificar la auto-similitud de estas estructuras se determinó la dimensión fractal. Los valores obtenidos fueron entre 1.62 ± 0.02 y 1.73 ± 0.03 . Estos valores se encuentran cercanos a aquellos teóricos calculados para una *Agregación Limitada por la Difusión*. En nuestras condiciones experimentales, los oligómeros del péptido 33-mer se encuentran en un equilibrio dependiente de la concentración, cuyo comportamiento es similar a micelas coloidales. Este comportamiento coloidal que da lugar a la formación de estructuras del tipo fractal ha sido previamente observado en diferentes sistemas proteicos, tales como péptidos beta amiloide^{195 255} y de polialanina²⁵⁶ y proteínas tales como silicateninas²⁵² y sericinas¹⁸⁸

²⁵³ M. Hoshi et al, 'Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β ' (Pt National Academy of Sciences) (2003) 100(11) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 6370.

²⁵⁴ R. Roychaudhuri et al, 'Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease' (2009) 284(8) *J Biol Chem* 4749.

²⁵⁵ R. Sabate y J. Estelrich, 'Evidence of the existence of micelles in the fibrillogenesis of beta-amyloid peptide' (2005) 109(21) *J Phys Chem B* 11027.

²⁵⁶ K. Giri, N. P. Bhattacharyya y S. Basak, 'pH-Dependent Self-Assembly of Polyalanine Peptides' (2007) 92(1) *Biophysical Journal* 293.

Sección IV

Elucidación de la auto-organización del péptido 33-mer en interfases hidrofóbicas.

4.4.1. Introducción.

Las diferentes superficies, biológicas y no biológicas, exponen diversos grupos químicos que permiten que estas interactúen con las moléculas que son depositadas en ellas. En particular la hidrofobicidad/hidrofilicidad son propiedades determinantes de la interacción molécula-superficie, especialmente en los medios biológicos.²⁵⁷ Hoyer *et. al.* han demostrado mediante un estudio utilizando la técnica de AFM que proteínas como la alfa-sinucleína forma agregados fibrilares con una estructura del tipo β sobre mica, superficie hidrofílica cargada negativamente. Sin embargo sobre grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG), cuya naturaleza es hidrofóbica, estas estructuras no eran detectadas, lo cual sugiere la necesidad de una región cargada negativamente para la auto-organización de la alfa-sinucleína.²⁵⁸

Desde el punto de vista fisiológico, la superficie del intestino delgado juega un rol fundamental en la fisiología normal. Este órgano es el que posee mayor área (aproximadamente 30 m²) en el cuerpo humano, por lo que las características superficiales de este órgano, juegan un factor fundamental para mantener el adecuado funcionamiento del aparato digestivo.²⁵⁹ El intestino se caracteriza por estar recubierto por una fina capa de moco hidrofóbico, que atrapa partículas grandes y permite la difusión de moléculas pequeñas. La hidrofobicidad de la superficie intestinal ha sido determinada mediante ángulo de contacto. El ángulo de contacto es un parámetro que se usa en

²⁵⁷ R. A. Jr Latour, 'Biomaterials: Protein-Surface Interactions', *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* (Taylor & Francis, 2005).

²⁵⁸ W. Hoyer et al, 'Rapid self-assembly of alpha-synuclein observed by in situ atomic force microscopy' (2004) 340(1) *J Mol Biol* 127.

²⁵⁹ H. F. Helander y L. Fandriks, 'Surface area of the digestive tract - revisited' (2014) 49(6) *Scand J Gastroenterol* 681.

materiales para caracterizar sus propiedades de humectabilidad. Este método permite determinar el ángulo en el punto en el que coinciden las interfaces líquido-sólido, sólido-líquido y aire-líquido cuando se coloca una gota de un fluido sobre una superficie. Una gota de agua tiende a esparcirse rápidamente sobre una la superficie hidrofílica ($\theta < 10^\circ$), generando un ángulo de contacto pequeño y el proceso contrario surge cuando la superficie es hidrofóbica.²⁶⁰ Bertolazzi *et al.* determinaron que el ángulo de contacto de la superficie luminal del intestino de pacientes celíacos se vuelve menos hidrofóbica ($56^\circ \pm 10^\circ$) con respecto a controles normales ($69^\circ \pm 9^\circ$), demostrando que la mucosa es más permeable en pacientes celíacos.²⁶¹ Considerando este hallazgo y el conocimiento de la existencia de una agregación diferencial de las proteínas sobre distintas superficies, se decidió estudiar la morfología de los oligómeros de 33-mer sobre dos superficies como el Silicio (52°)²⁶² y el HOPG ($71^\circ \pm 11.1^\circ$)²⁶³ con un mayor hidrofobicidad que la mica $\leq 10^\circ$, mimetizando así *in vitro* la superficie del lumen intestinal.

4.4.2 Evaluación de la auto-agregación del péptido 33-mer sobre HOPG.

4.4.2.1. Propiedades del HOPG:

El HOPG es una superficie hidrofóbica ($71^\circ \pm 11.1^\circ$) con un alto orden tridimensional. De igual forma que la mica, es un material laminar cuya estructura cristalina se caracteriza por ser un arreglo de los átomos de carbono en placas paralelas. La capa bidimensional y de un espesor de un átomo, se denomina grafeno, el cual se caracteriza por ser una estructura hexagonal plana. Este elevado orden se obtiene gracias a un tratamiento térmico del grafito ($>3000^\circ\text{C}$). Esta superficie es una herramienta muy utilizada como sustrato en microscopías, especialmente en AFM debido a que esta superficie es atómicamente plana, requerimiento necesario para este tipo de microscopias y además la limpieza de

²⁶⁰ Y. Yuan y T. Randall Lee, 'Contact Angle and Wetting Properties' in Gianangelo Bracco and Bodil Holst (eds), *Surface Science Techniques* (Springer Berlin Heidelberg, 2013) vol 51, 3-34.

²⁶¹ S. Bertolazzi *et al.*, 'Bio-physical characteristics of gastrointestinal mucosa of celiac patients: comparison with control subjects and effect of gluten free diet' (2011) 11 *BMC Gastroenterol* 119.

²⁶² F. Zhang *et al.*, 'Surface and Interface Characterization of Sequentially Plasma Activated Silicon, Silicon dioxide and Germanium Wafers for Low Temperature Bonding Applications' (2010) 33(4) *ECS Transactions* 329.

²⁶³ H. Yang *et al.*, 'Modification of hydrophilic and hydrophobic surfaces using an ionic-complementary peptide' (2007) 2(12) *PLoS One* e1325.

la misma resulta fácil y rápida.²⁴² Esta superficie ha sido anteriormente utilizada en el estudio de diferentes proteínas portales como la Inmunoglobulina G y glucosa oxidasa,²⁶⁴ la alfa-sinucleína,²⁵⁹ y péptido sintéticos.²⁶⁵

4.4.2.2. Evaluación de los oligómeros del péptido 33-mer sobre HOPG.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en mica y en solución, se decidió evaluar las características de los oligómeros de 33-mer a 200 μM en agua a pH 7.0. Se depositó la muestra sobre la superficie de HOPG y se permitió la evaporación del solvente mediante un ambiente controlado de Nitrógeno. Las imágenes fueron obtenidas mediante AFM en modo contacto intermitente (tapping). Como se observa en la Figura 59 A (imagen obtenida con el microscopio óptico acoplado al AFM), el espécimen está conformado principalmente de estructuras planas interconectadas. Un zoom de estas estructuras utilizando el AFM revela que principalmente están formadas por un eje central que actúa como núcleo. Las ramificaciones lineales se encuentran compuestas de esferas. A diferencia de las observadas en mica estas ramificaciones son de menor longitud y de carácter más compacto que las observadas en mica. Si bien estas estructuras son similares a las detectadas en mica a la misma concentración (Figura 53), en HOPG, la superficie cubierta fue notablemente superior.

²⁶⁴ D. C. Cullen y C. R. Lowe, 'AFM Studies of Protein Adsorption: 1. Time-Resolved Protein Adsorption to Highly Oriented Pyrolytic Graphite' (1994) 166(1) *Journal of Colloid and Interface Science* 102.

²⁶⁵ H. Yang et al, 'Modification of hydrophilic and hydrophobic surfaces using an ionic-complementary peptide' (2007) 2(12) *PLoS One* e1325.

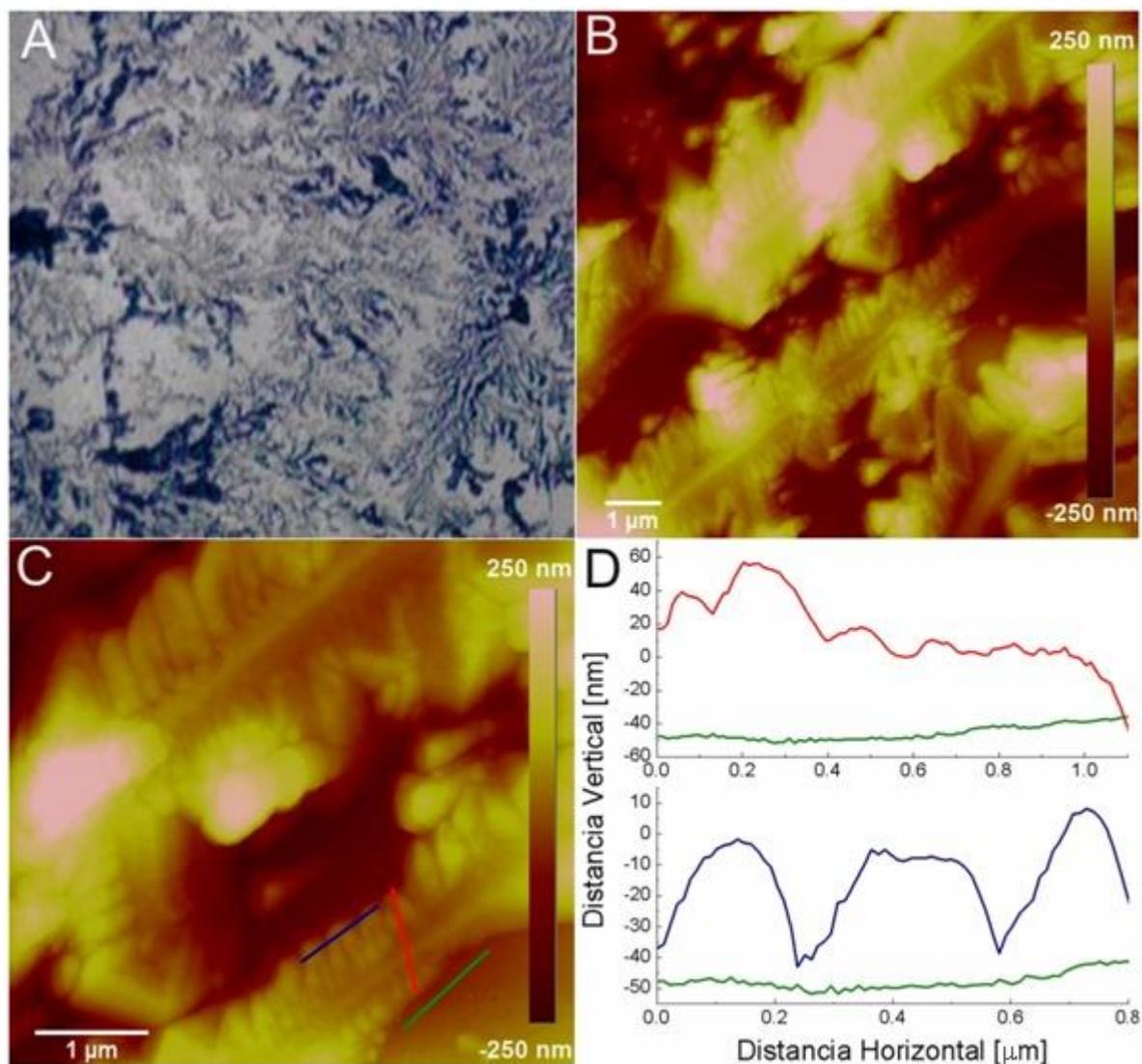


Figura 59. Imágenes de 33-mer en agua pH 7.0, concentración 200 μM sobre la superficie de HOPG A) Fotografía de microscopía óptica de la superficie de HOPG B) Imagen topográfica del péptido obtenida mediante AFM en modo intermitente ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). C) Imagen topográfica de AFM utilizando el modo intermitente ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$), en esta se detecta en detalle las características de las asociaciones fibrilares. D) Corte de las secciones marcadas en C) (verde silicio, rojo corte transversal del péptido y azul corte de las ramificaciones).

Por otro lado se puede observar en ciertas regiones, la deposición de nanoesferas, que se encontraban cubriendo una amplia región de la superficie analizada, tal como se detectó en la figura 60. Estas se encontraban dispersas en otros campos cuyos tamaños se podían agrupar en dos poblaciones, una de ellas tiene una altura media de 37.03 ± 7.14 y las otras de 66.16 ± 11.41 nm. La D_f calculada es de 1.84 ± 0.03 . La morfología y forma de los agregados, así como la D_f es

compatible con un mecanismo de DLA, similar a lo observado previamente para la proteína sericina.¹⁸⁸ En esta superficie de alta hidrofobicidad, existen interacciones péptido-superficie y péptido-péptido. El aumento de la Df en HOPG puede deberse a que estas últimas se vuelven aún más predominantes, dando lugar a una mayor asociación del péptido, observándose estructuras más compactas y por lo tanto un mayor valor de Df .

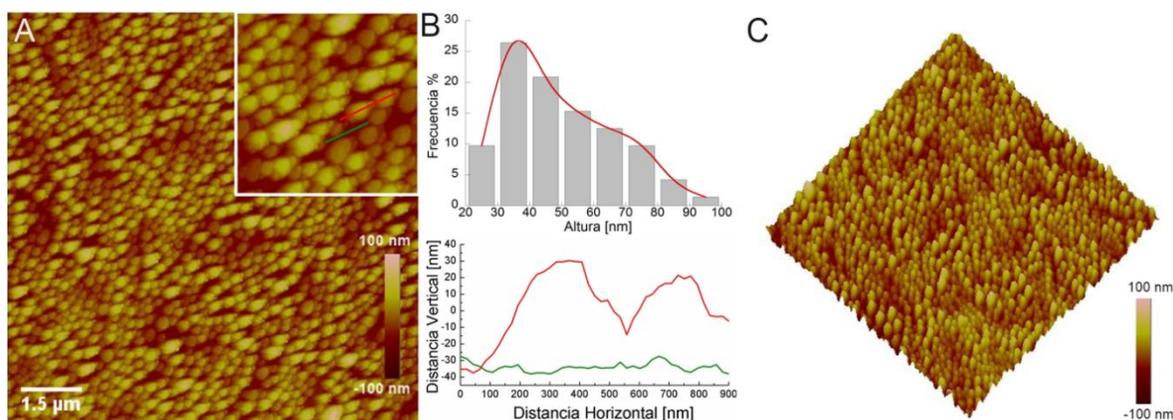


Figura 60. A) Imagen topográfica de otro campo del péptido 33-mer en agua pH 7.0, concentración 200 μM sobre la superficie de HOPG obtenida mediante AFM en modo intermitente ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). B) Distribución de alturas de los agregados observados en A) ($n= 50$) y representación de un corte de las secciones marcadas en A) (verde silicio, rojo esferas del péptido). C) Imagen tridimensional de topografía de la imagen A.

Para evaluar el grado de interacción de 33-mer sobre el HOPG cuando este es sometido a un estrés como es el pasaje de líquidos, situación que ocurre durante el proceso de digestión, se decidió dejar interactuar la muestra por 10 minutos y luego se aplicaron lavados. La superficie fue lavada cinco veces con agua Milli Q y la muestra se dejó secar a temperatura ambiente bajo un leve flujo de Nitrógeno, observándose que los oligómeros de 33-mer interaccionan fuertemente con la superficie de HOPG (Figura 61).

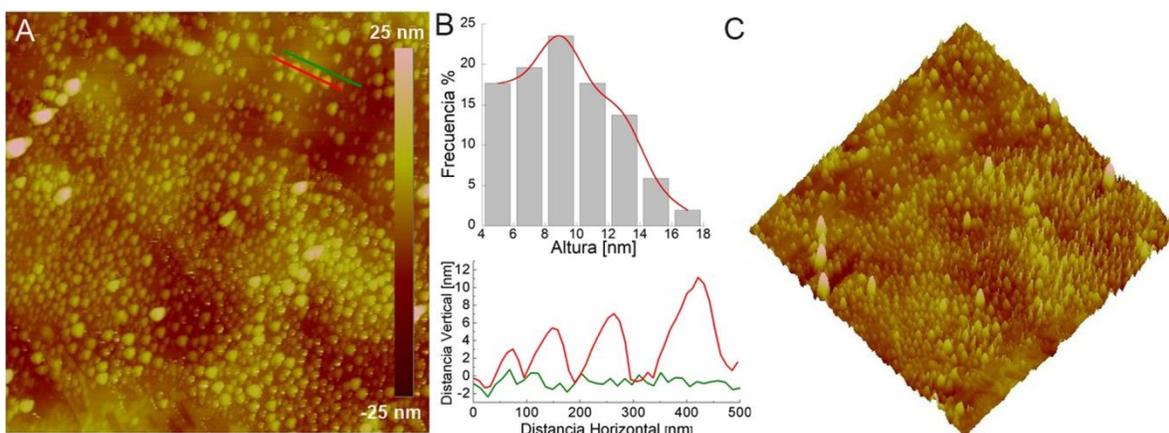


Figura 61. A) Imagen topográfica del péptido 33-mer en agua pH 7.0, concentración 200 μM sobre la superficie de HOPG. La muestra fue preparada dejando interactuar y luego se aplicaron lavados. La muestra fue obtenida mediante AFM en modo intermitente ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$). B) Distribución de alturas de los agregados observados en A) ($n= 50$) y representación de un corte de las secciones marcadas en A) (verde silicio, rojo esferas del péptido). C) Imagen tridimensional de topografía de la imagen A.

Al realizar los lavados, se observó que el péptido 33-mer permanece interactuando con la superficie en forma de nano-estructuras esféricas, cuya altura media es de 9.23 ± 3.2 nm. Estas son de altura menor que las observadas anteriormente. Las nano-estructuras esféricas detectadas aquí podrían actuar como precursoras del proceso de oligomerización del 33-mer sobre esta superficie. Por otro lado, se ha calculado la Df de la Figura 61 A, siendo esta de 1.76 ± 0.05 .

A pesar que en HOPG el grado de cubrimiento y la Df eran mayores que la mica, los oligómeros del péptido 33-mer son capaces de auto-ensamblarse en forma de nanoesferas y agregados planos. Las nano-estructuras esféricas son fuertemente retenidas sobre la superficie luego del proceso de lavado. Si se considera que el mucus del intestino tiene características hidrofóbicas, el hecho de que el 33-mer se adhiera fuertemente sobre la superficie de HOPG, podría ser un hecho importante ya que se podría favorecer la acumulación de los oligómeros de 33-mer sobre la superficie luminal. Considerando que estos resultados fueron similares a los obtenidos sobre mica y a la limitada disponibilidad del microscopio de AFM, se decidió continuar la evaluación de 33-mer sobre dióxido de silicio.

4.4.3. Evaluación de los oligómeros del péptido 33-mer sobre dióxido de silicio en función de la concentración.

4.4.3.1. Propiedades del dióxido de silicio y preparación de las muestras.

El Silicio es una superficie que es ampliamente utilizada en la observación de proteínas y como una superficie utilizada para la fabricación de biosensores debido sus características superficiales. Este ha sido empleado en el estudio de la adsorción de diversas proteínas entre ellas la proteína A.²⁶⁶ Mientras que el silicio es hidrofóbico (similar al HOPG), el dióxido de silicio tiene características más hidrofílicas, su ángulo de contacto es de 52°. En esta tesis fueron utilizadas las superficies de dióxido silicio (wafer) y grids de dióxido de silicio. Los wafers de silicio se caracterizan por estar constituidos por silicio cristalino, sin embargo, en la superficie expuesta de éste se forma una capa de SiO₂²⁶⁷. Los grids de SiO₂ empleados en las diferentes microscopias electrónicas de esta sección fueron obtenidos mediante una modificación térmica. Estos grids presentan notables ventajas frente a los de Formvar y otros grids de silicio empleados comúnmente, ya que estos últimos presentan una mezcla de SiO y SiO₂, lo cual puede hacer que su reactividad química sea variable.²⁶⁸ Entre las ventajas de los grids utilizados por nosotros en esta tesis, podemos mencionar que la superficie es electrónicamente transparente con escasa rugosidad, permitiendo lograr una mejor observación microscópica sin la necesidad de usar agentes de contraste. Además es física y químicamente estable, ya que puede ser sometido a elevadas temperaturas (>1000°C) y a ácidos, sin que se modifique la superficie y es la superficie utilizada mayormente para realizar funcionalizaciones que permitan modificar las propiedades superficiales del grid.^{269, 270}

²⁶⁶ M. C. Coen et al, 'Adsorption and Bioactivity of Protein A on Silicon Surfaces Studied by AFM and XPS' (2001) 233(2) *J Colloid Interface Sci* 180.

²⁶⁷ M. Grundner y H. Jacob, 'Investigations on hydrophilic and hydrophobic silicon (100) wafer surfaces by X-ray photoelectron and high-resolution electron energy loss-spectroscopy' (Pt Springer-Verlag) (1986) 39(2) *Applied Physics A* 73.

²⁶⁸ <http://www.2spi.com/catalog/grids/cusctgrd.html>.

²⁶⁹ J.M. Kearns, G.J. Hutchison y J.E. Miller, 'Windows of Opportunity: A New Platform to Understand Structure-Property Relationships in Nanotechnology', *Technical Proceedings of the 2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show* (2007) vol 1.

²⁷⁰ G. J. Kearns, Evan W. Foster y James E. Hutchison, 'Substrates for Direct Imaging of Chemically Functionalized SiO₂ Surfaces by Transmission Electron Microscopy' (Pt American Chemical Society) (2006) 78(1) *Analytical Chemistry* 298.

El estudio del péptido 33-mer sobre esta superficie fue realizado en diversas concentraciones y las muestras fueron preparadas de maneras diferentes. Esto se debió a que se observó que la forma de preparación de la muestra influenciaba el mecanismo de agregación y tipo y morfología de los agregados finales. Por lo tanto, para lograr una mejor caracterización del proceso de la auto-organización del péptido 33-mer, se han empleado diferentes técnicas de preparación de las muestras y diversas tinciones y microscopías. Se utilizaron las técnicas de: a) secado a temperatura ambiente, b) eliminación del exceso de líquido mediante capilaridad, haciendo uso de un papel absorbente y c) la técnica de congelado (-78°C) y secado por sublimación. Esta última se destaca porque la muestra es sometida a un congelamiento con nitrógeno líquido y posterior secado rápido utilizando alto vacío. Esta metodología es ampliamente empleada en muestras biológicas y se ha utilizado en la observación de proteínas involucradas en la fisiología del cobre en plantas ²⁷¹ y en el estudio de diversas proteínas amiloide. ²⁷² Mediante esta técnica se evita la distorsión de la muestra cuando esta se seca mediante evaporación a temperatura ambiente. La distorsión observada se debe a la tensión superficial que se produce cuando se genera el cambio de fase desde líquido a vapor. A través de esta metodología, al congelar el espécimen y luego eliminar el agua mediante sublimación aplicando vacío, se produce una disminución de la tensión superficial y se evita la distorsión de la muestra. La velocidad de sublimación es dependiente de la temperatura lograda y el vacío. En la práctica se utilizó la temperatura del nitrógeno líquido -78°C y un liofilizador para obtener un secado rápido. ²⁷³ Mediante esta técnica es posible fijar la muestra y los procesos que se encuentran produciendo en la misma. ²⁷⁴

En este apartado se realizó el estudio microscópico del péptido mediante las microscopias SEM (EVO 40), TEM (80 kV, Philips CM 100) y AFM que son convencionalmente empleadas y las

²⁷¹ H. Mira et al, 'Ionic self-complementarity induces amyloid-like fibril formation in an isolated domain of a plant copper metallochaperone protein' (2004) 4(1) *BMC Structural Biology* 7.

²⁷² C. Goldsbury et al, 'Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy1' (1999) 285(1) *Journal of Molecular Biology* 33.

²⁷³ https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/freeze_drying.aspx

²⁷⁴ P. Echlin, 'Sample Dehydration', *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (2009).

novedosas microscopías STEM y de ion Helio. La microscopía STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy, LEO Gemini 1530) presenta una serie de ventajas sobre SEM y TEM ya que en este caso se utiliza un detector angular anular de campo oscuro (HAADF), que permite mejorar el contraste de las muestras y estudiar la composición química de la muestra (en el caso de especímenes metálicos). Además mediante las correcciones en las aberraciones ópticas que se han establecido en este sistema, es posible tener una gran resolución.²⁷⁵ En todos los casos no fue necesario la tinción de la muestra debido a las características de transparencia del grid utilizado, a excepción del SEM que se utilizó ácido fosfotungsténico. Finalmente se presenta la caracterización de los oligómeros de 33-mer utilizando un microscopio de resolución sub-nanométrica como el microscopio de ion de Helio.²⁷⁶

4.4.3.2. Estudio del 33-mer en la concentración 80 μM .

En primer lugar se evaluó el péptido 33-mer mediante microscopías STEM y TEM a la concentración 80 μM ; dejando secar la muestra a temperatura ambiente (25°C) bajo campana. Las imágenes obtenidas se presentan en la Figura 62.

²⁷⁵ A. Ponce, S. Mejía-Rosales and M. J. Yacamán, 'Scanning Transmission Electron Microscopy Methods for the Analysis of Nanoparticles' in Mikhail Soloviev (ed), *Nanoparticles in Biology and Medicine* (Humana Press, 2012) vol 906, 453-471.

²⁷⁶ M. S. Joens et al, 'Helium Ion Microscopy (HIM) for the imaging of biological samples at sub-nanometer resolution' (2013) 3 *Sci Rep* 3514.

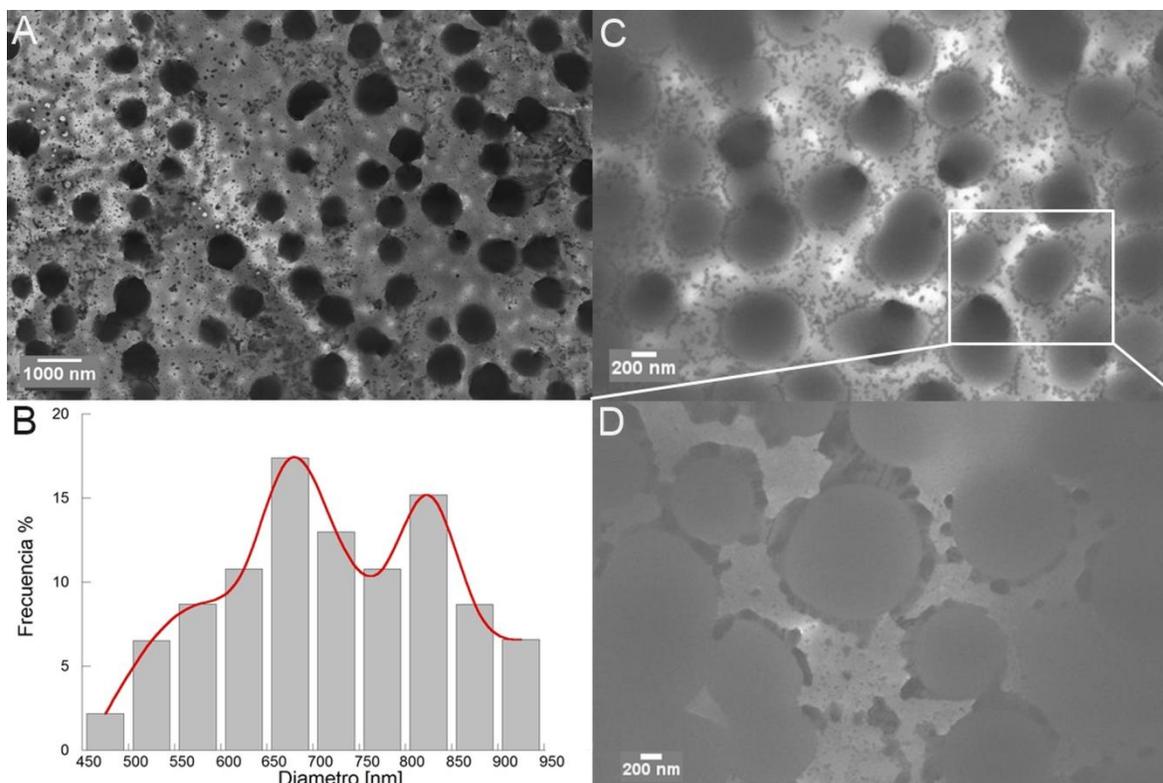


Figura 62. Imágenes del péptido 33-mer (80 μM , pH 7.0) en agua sobre un grid de SiO_2 . La muestra se dejó evaporar el agua a temperatura ambiente. A) STEM en el cual se observan estructuras esféricas de gran tamaño y otras más pequeñas B) Distribución de diámetros de las esferas de mayor tamaño observadas en A, ($n=50$). C) TEM en el cual se detectan las nano-estructuras del péptido33-mer. D) Ampliación de la imagen C) en la cual se puede observar en detalle las características de las estructuras esféricas de gran tamaño que interactúan con nano-estructuras más pequeñas en la superficie.

En este caso se observó que el péptido 33-mer es capaz de auto-organizarse en estructuras esféricas sobre la superficie de silicio, debido a sus tamaños, las mismas se clasificaron en dos poblaciones, unas de un diámetro medio de $675 \pm 200\text{nm}$ y otras de $825 \pm 100\text{ nm}$ (Figura 62). Los tamaños de las esferas son mucho mayores a los detectados sobre otras superficies. Además, se observaron nano-partículas más pequeñas, cuyo diámetro se encuentra entre 17-38 nm, estas estructuras pequeñas interactúan entre sí y con la superficie de las partículas más grandes (Figura 62 D). Considerando que en solución a esta concentración por experimentos de DLS-Correlación 3D, no se ha detectado la presencia de agregados, es posible hipotetizar que los observados aquí son el resultado de la difusión superficial del péptido y la evaporación. Esto generó la formación de esferas

de gran tamaño, lo cual es característico de la existencia de distintas morfologías en equilibrio. Además, como se mencionó en la figura 66 D es posible apreciar las partículas pequeñas cercanas y en contacto con las esferas mayores. Este tipo de comportamiento, podría ser explicado mediante el fenómeno de crecimiento por difusión conocido como maduración de Ostwald (Ostwald ripening).²⁷⁷

La maduración de Ostwald es un fenómeno observado en soluciones líquidas de coloides, y describe el cambio de una estructura homogénea con el tiempo. Este proceso espontáneo, controlado termodinámicamente, se produce porque las partículas más grandes están energéticamente favorecidas con respecto a las más pequeñas, induciendo a la coalescencia de estas últimas. Este fenómeno es explicado por la teoría de LSW propuesta por Lifshitz, Slyozov y Wagner^{278, 279} y modificaciones más recientes de la misma, utilizada en ciencia de materiales y física de coloides,²⁸⁰ Recientemente *Levin et. al*²⁸¹ mostraron que el fenómeno de Ostwald gobierna las transiciones estructurales y morfológicas de polímeros supramoleculares basados en Boc-difenilalanina. Según, esta teoría, el radio de los agregados en sistemas 2D es proporcional al tiempo, por lo que la velocidad del secado (evaporación) podría tener un rol importante en el comportamiento de soluciones de 33-mer sobre la superficie de dióxido silicio.

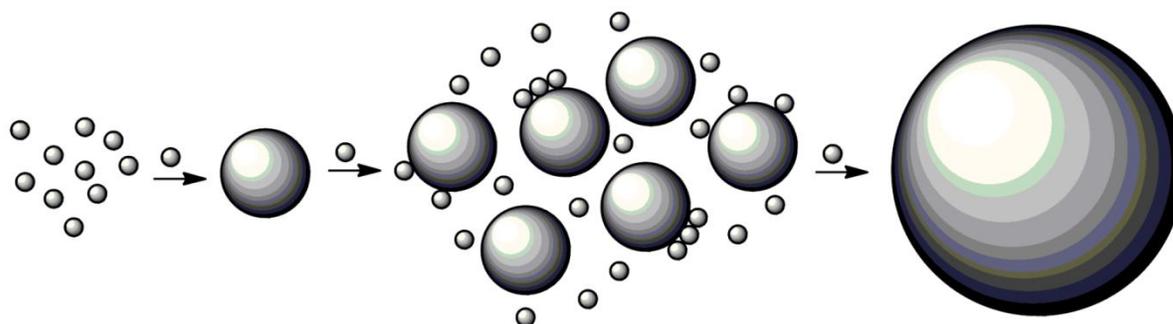
²⁷⁷ M. Kahlweit, 'Ostwald ripening of precipitates' (1975) 5(1) *Advances in Colloid and Interface Science* 1.

²⁷⁸ I. M. Lifshitz y V. V. Slyozov, 'The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions' (1961) 19(1) *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 35.

²⁷⁹ C. Wagner, 'Theorie der Alterung von Niederschlägen durch Umlösen (Ostwald-Reifung)' (Pt Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA) (1961) 65(7-8) *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 581.

²⁸⁰ L. Ratke, y Voorhees, P. W., *Growth and Coarsening, Ostwald Ripening in Material Processing* (Material Processing. Springer, 2002).

²⁸¹ A. Levin et al, 'Ostwald's rule of stages governs structural transitions and morphology of dipeptide supramolecular polymers' (2014) 5 *Nat Commun* 5219.



Esquema 4. Representación en la cual se demuestra la maduración de Ostwald. En este, las nano-esferas se asocian para generar siempre nano-estructuras esféricas de mayor radio. Este proceso es dependiente del tiempo de secado y produce la coalescencia de estructuras.

Teniendo en cuenta que la D_f fue de 1.84 ± 0.03 y la morfología de los agregados, es posible hipotetizar que una vez generadas las partículas de 33-mer, mediante el proceso de Ostwald en solución durante el secado sobre esta superficie, el crecimiento de los clusters sobre Silicio seguiría un modelo de percolación, lo cual favorecería a la formación de un film o película.²⁸² Este modelo predice que la formación del clúster solamente depende del ambiente de la partícula que se asociará al agregado o clúster ya formado, a diferencia del mecanismo DLA que considera que la estructura de los agregados formados favorece la probabilidad de incorporación de la nueva partícula. Explicando este proceso de un modo más simple, el movimiento del solvente generado por la evaporación sobre la superficie (donde las partículas crecerían mediante maduración de Ostwald) y las características de la superficie son los procesos implicados que conducen a la distribución final de las esferas del 33-mer sobre la superficie de dióxido de silicio mediante el mecanismo de percolación.²⁸²

Para entender la influencia de la superficie de silicio en la organización del péptido y compararla con las observadas previamente sobre la superficie de Formvar utilizando TEM (Capítulo IV Sección I), se llevó a cabo la deposición de la muestra sobre un grid de Silicio y se tincionó utilizando acetato de uranilo. La muestra fue secada por capilaridad. El acetato de uranilo es un agente de tinción

²⁸² T. Vicsek, 'Fractal Growth Phenomena' (World Scientific, 1992).

negativa, por lo que a diferencia de otros, rodea a las estructuras proteicas.^{283 284} De esta manera, las proteínas se observan como una región clara con un borde oscuro debido a la interacción de este agente con la superficie de las mismas. Las imágenes obtenidas se presentan en la Figura 63.

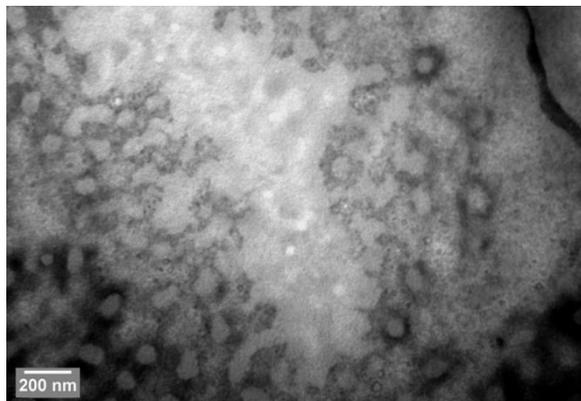


Figura 63. Imagen TEM del péptido 33-mer (80 μ M, pH 7.0.) en agua sobre la superficie de dióxido de silicio. La muestra se preparó dejando interactuar con la superficie por 10 minutos y se retiró el exceso de la misma mediante capilaridad. A continuación se realizó una tinción con acetato de uranilo.

En la figura 63 se pudo observar la existencia de esferas cuyos diámetros se encuentran entre los ~ 63 a 150 nm. Se observó que estas esferas tienden a auto-asociarse, formando una estructura similar a un film. Es interesante considerar que ambos experimentos además de diferenciarse en el agente de tinción (sin y con acetato de uranilo respectivamente), la muestra fue secada de manera diferente, lo cual resultaría relevante. En el primer caso este fue realizado de manera lenta, mediante evaporación bajo campana. Mientras que en el segundo, se utilizó como método de secado la absorción por capilaridad. Esto permitió determinar que existe una tendencia a aumentar el tamaño de los agregados a medida que la velocidad de evaporación del agua disminuye. Estas observaciones podrían correlacionarse con el fenómeno de maduración de Ostwald propuesto y de percolación.

Con el objetivo de comprobar lo descrito anteriormente, y contando con los recursos, se realizó el tratamiento de congelado - secado rápido de la muestra mediante sublimación. Utilizando esta

²⁸³ D. S. Booth, Agustin Avila-Sakar y Yifan Cheng, 'Visualizing Proteins and Macromolecular Complexes by Negative Stain EM: from Grid Preparation to Image Acquisition' (Pt MyJove Corporation) (2011)(58) *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 3227.

²⁸⁴ M. A. Hayat, *Principles and techniques of electron microscopy* (University Press: Cambridge, 2000).

técnica, normalmente el efecto de difusión mediado por evaporación es inhibido. En este caso se detectaron escasos agregados del péptido 33-mer que se encontraban dispersos sobre la superficie. Los tamaños de los mismos se distribuyeron en tres poblaciones cuyo diámetro medio es: 20 ± 4.2 nm, 31.76 ± 1.62 nm y 42.06 ± 3.63 nm como se observa en la figura 64.

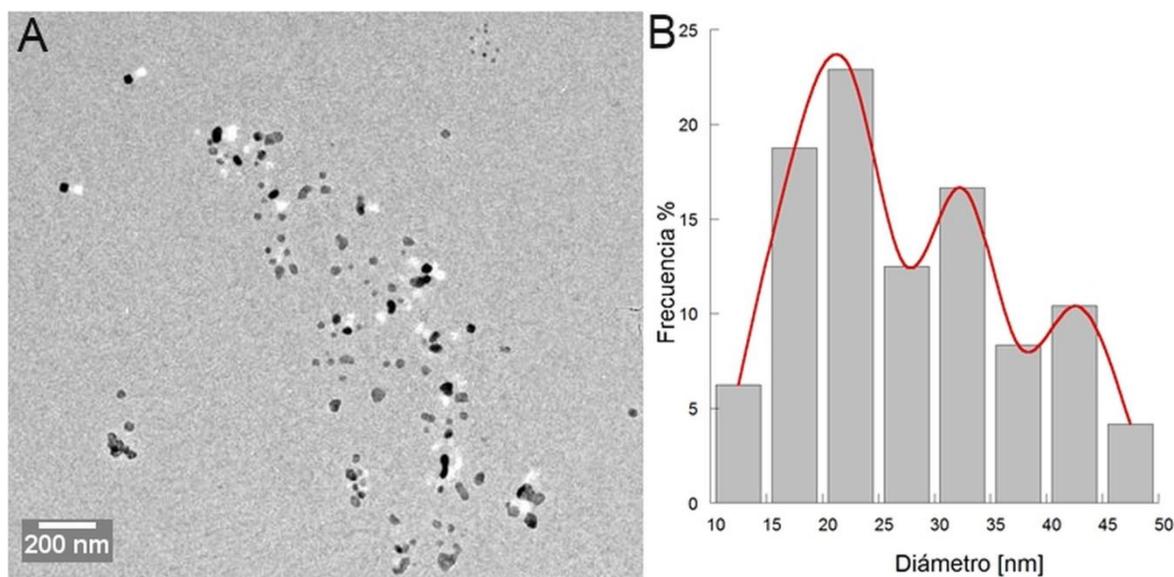


Figura 64. Imagen TEM del péptido 33-mer en agua ($80 \mu\text{M}$, pH 7.0) sobre un grid de dióxido de silicio. La muestra fue preparada mediante congelado-secado rápido por sublimación. B) Distribución de diámetros de las esferas observadas ($n=50$).

4.4.3.3 Estudio del péptido 33-mer a la concentración $200 \mu\text{M}$.

A la concentración $200 \mu\text{M}$, 33-mer fue depositado en el grid de dióxido de silicio, y fue dejado evaporar a temperatura ambiente bajo campana, durante un período de una hora. A continuación se realizó microscopias TEM y STEM (sin tinción) en las cuales se detectaron la formación de un gel denso (Figura 65 A) y la presencia de nano-estructuras de distintos tamaños (Figura 65 C). Al estudiar detenidamente las imágenes, fue posible correlacionar la asociación de las esferas pequeñas que dan lugar a la formación de las esferas mayores, agregados tubulares y finalmente el film observado. Las nanoesferas más grandes poseían un diámetro de 389 ± 76 nm, mientras que las pequeñas son 25.4 ± 7.6 nm. La Df fue determinada de la imagen 65 B, siendo esta de 1.73 ± 0.03 . Considerando que a esta concentración los oligómeros de 33-mer ya están formados en solución, la interacción sobre silicio aparentemente promueve una agregación jerárquica de los

mismos desde esferas a un gel por un mecanismo que podría ser compatible con el modelo de percolación.

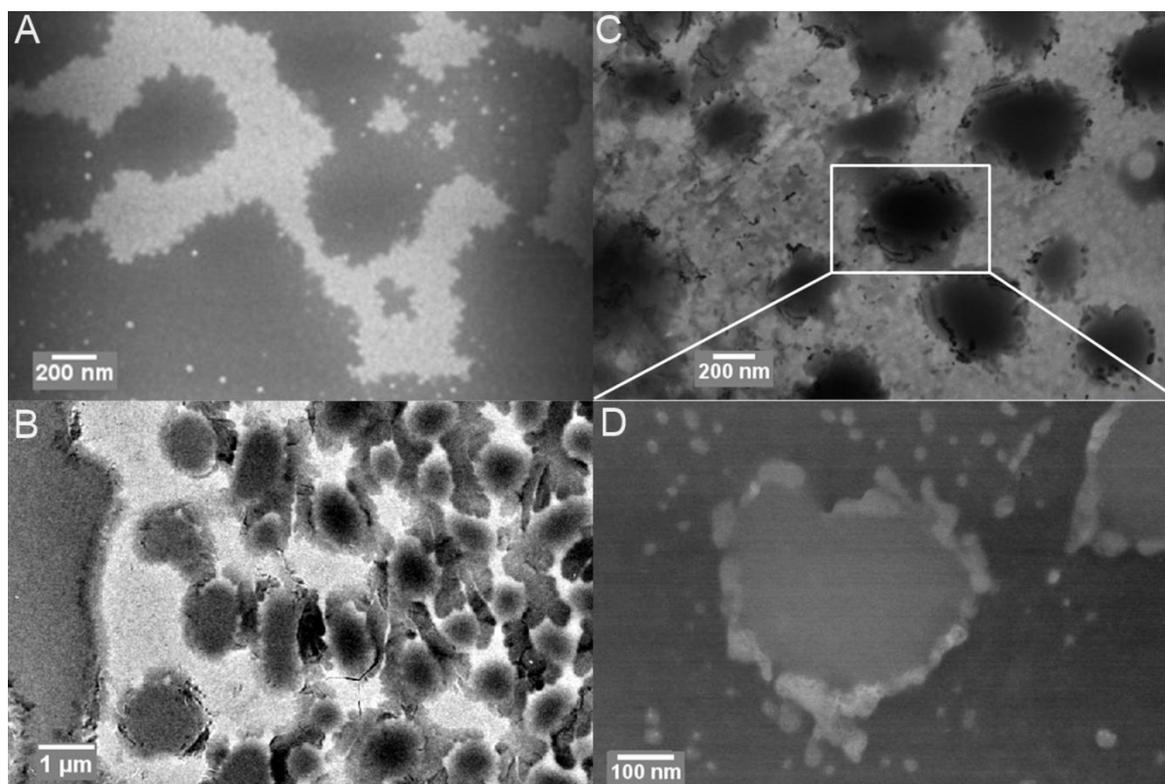


Figura 65. Imagen STEM del péptido 33-mer (200 μ M, pH 7.0) en agua sobre la superficie de dióxido de silicio, habiendo dejado evaporar el agua a temperatura ambiente bajo campana. A) Film. B) Estructuras esféricas interconectadas que tienden a formar estructuras tubulares y un film. C). Esferas. D) Ampliación de la imagen C) en la que se puede observar las características de las estructuras esféricas y en donde se puede distinguir la presencia de nanoesferas pequeñas rodeando a las mayores.

Resultados, similares se obtuvieron mediante AFM del 33-mer a la misma concentración (Figura 66). En este caso se depositó la muestra sobre la superficie y el agua fue eliminada mediante un secado en un ambiente de nitrógeno.

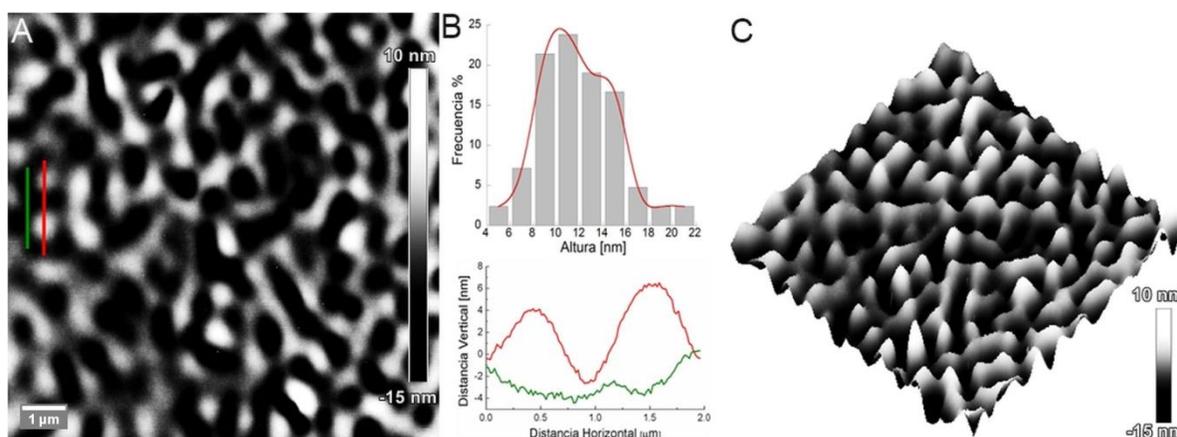


Figura 66. A) Imagen topográfica del péptido 33-mer en agua (200 μM , pH 7.0), sobre la superficie de dióxido de silicio obtenida mediante AFM en modo intermitente ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). La muestra fue preparada mediante bajo secado en un ambiente de nitrógeno. B) Distribución de alturas de los agregados observados en A ($n= 50$) y representación de un corte de las secciones marcadas en A (verde silicio, rojo esferas del péptido). C) Imagen tridimensional de topografía (modo intermitente, $10 \times 10 \mu\text{m}^2$).

En este caso se obtuvo resultados similares a los observados por TEM sobre dióxido de silicio (comparar las figuras 65 y 66). Esto se puede apreciar claramente en la imagen de topografía 3D (Figura 66 C). La altura media de las esferas, es 11.87 ± 3.2 nm. Por otro lado, de la imagen 66 A, se determinó la Df , siendo esta de 1.67 ± 0.04 , lo cual sería compatible con un mecanismo percolación.

Para evaluar el grado de interacción de 33-mer sobre la superficie de Silicio, cuanto este es sometido a un estrés como es el pasaje de líquidos, situación que ocurre durante el proceso de digestión, se decidió aplicar lavados a la muestra. Para ello se realizó la deposición del péptido sobre la superficie y se permitió que este interactúe con la superficie por un período de 5-10 minutos. A continuación se realizaron cinco lavados y secado por capilaridad para retirar la fracción del péptido que no interactúa con la superficie. Luego la muestra fue colocada bajo un ambiente de nitrógeno y posteriormente, se realizó la observación mediante AFM, en modo intermitente.

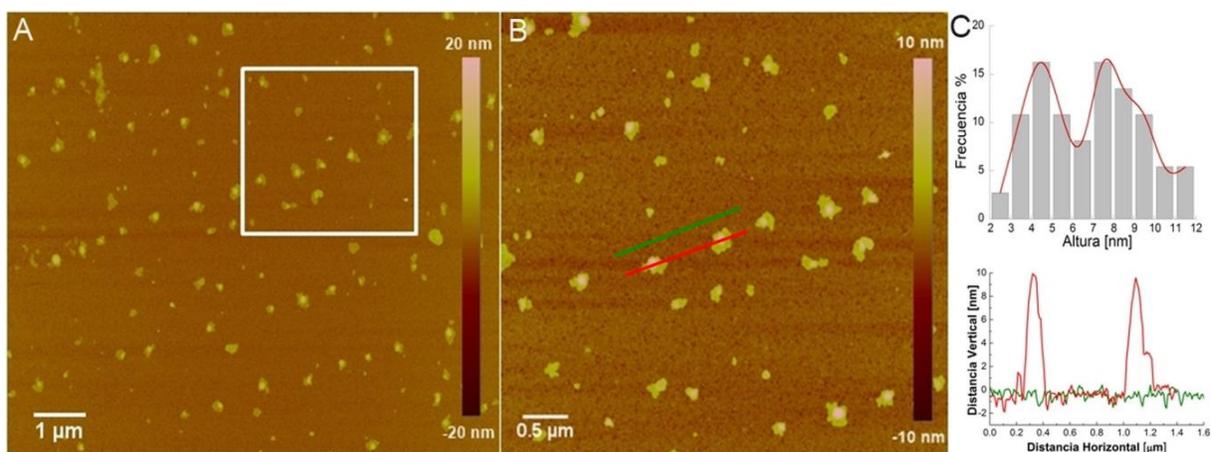


Figura 67. Imagen Topográfica de AFM del péptido 33-mer (200 μM en agua pH 7.0) depositada sobre la superficie de dióxido de silicio obtenida mediante en modo intermitente. La muestra fue preparada dejando interactuar la muestra durante 5 minutos y luego se realizaron lavados con agua Milli Q. A) Imagen topográfica del péptido ($9.8 \times 9.8 \mu\text{m}^2$). B) Zoom de la región marcada en A. C) Distribución de alturas de los agregados observados en A ($n= 50$) y representación de un corte de las secciones marcadas en B) (verde silicio, rojo esferas del péptido).

Al estudiar la distribución de alturas, se observó la existencia de dos tipos de agregados distintos en esta condición. Unos de altura de 4.6 ± 1.00 nm y otros de 8.83 ± 1.3 nm. La altura de las partículas después del lavado es menor, lo que muestra la capacidad de 33-mer de agregarse sobre las partículas ya depositadas en superficie. También se determinó la Df , la cual fue de 1.36 ± 0.03 que compatible el mecanismo de crecimiento por percolación en donde las partículas se evitan mutuamente.²⁸² Se repitió este procedimiento de lavado y secado por capilaridad de la solución de 33-mer sobre un grid de dióxido silicio y el espécimen fue observado mediante TEM. Las imágenes obtenidas se presentan en la siguiente figura.

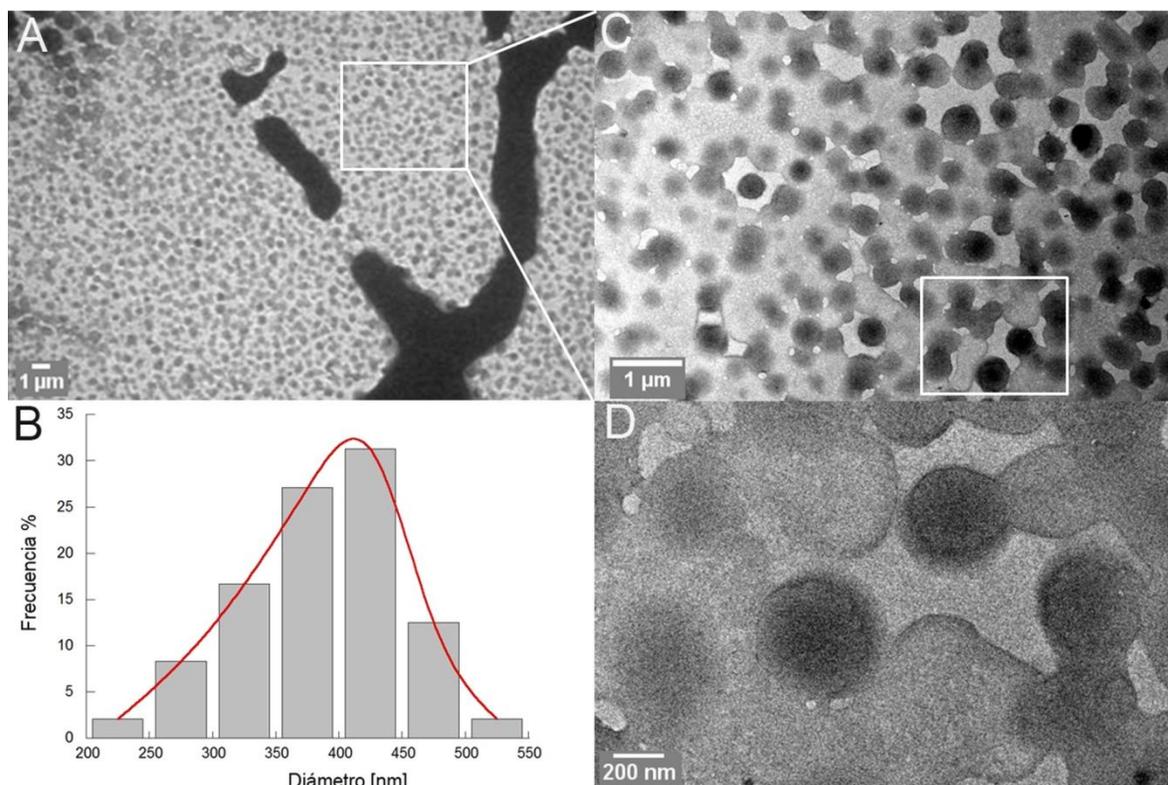


Figura 68. Imágenes del péptido 33-mer en agua (200 μM, pH 7.0) sobre la superficie de dióxido de silicio. La muestra fue preparada dejando interactuar la solución con el grid y luego retirando el agua mediante capilaridad. A) Imagen TEM en la que se observa la presencia de nano-estructuras esféricas y una región agregada del péptido 33-mer interconectadas como un film. B) Distribución de los diámetros observados en la imagen A (n=100). C) Ampliación de la imagen. D) Ampliación de la región marcada en la figura C.

A través de esta metodología, fue posible detectar un elevado cubrimiento de la superficie con agregados esféricos, cuyo diámetro promedio fue de 388 ± 64 nm. Además se observó una menor formación del gel denso previamente detectado. La Df de los agregados del 33-mer (Figura 68 C) fue de 1.79 ± 0.04 , posiblemente compatible con un mecanismo de percolación.

Finalmente, se realizó la deposición de la muestra en el grid y la fijación y secado se llevó a cabo mediante el proceso de congelado-secado rápido, eliminando las moléculas de agua mediante sublimación. En este caso se detectaron nano-partículas de correspondientes a dos poblaciones cuyo diámetro medio fue de 36 ± 8 nm y otras, que estaban en una menor proporción, de 56.3 ± 5 nm, las cuales estaban formando clústers o se encontraban aisladas pero incluidas en un film (Figura 69 A y C respectivamente). La existencia de asociaciones no covalentes en el péptido y las dimensiones de

los oligómeros detectados, se correlacionan con la elevada polidispersidad y dinámica de los agregados de 33-mer obtenidos por DLS-correlación 3D a esta concentración en solución.

Todos estos experimentos ponen de manifiesto que el tiempo de interacción de la muestra sobre la superficie y la velocidad de secado tendría un rol importante en el comportamiento de los oligómeros de 33-mer sobre la superficie de dióxido silicio.

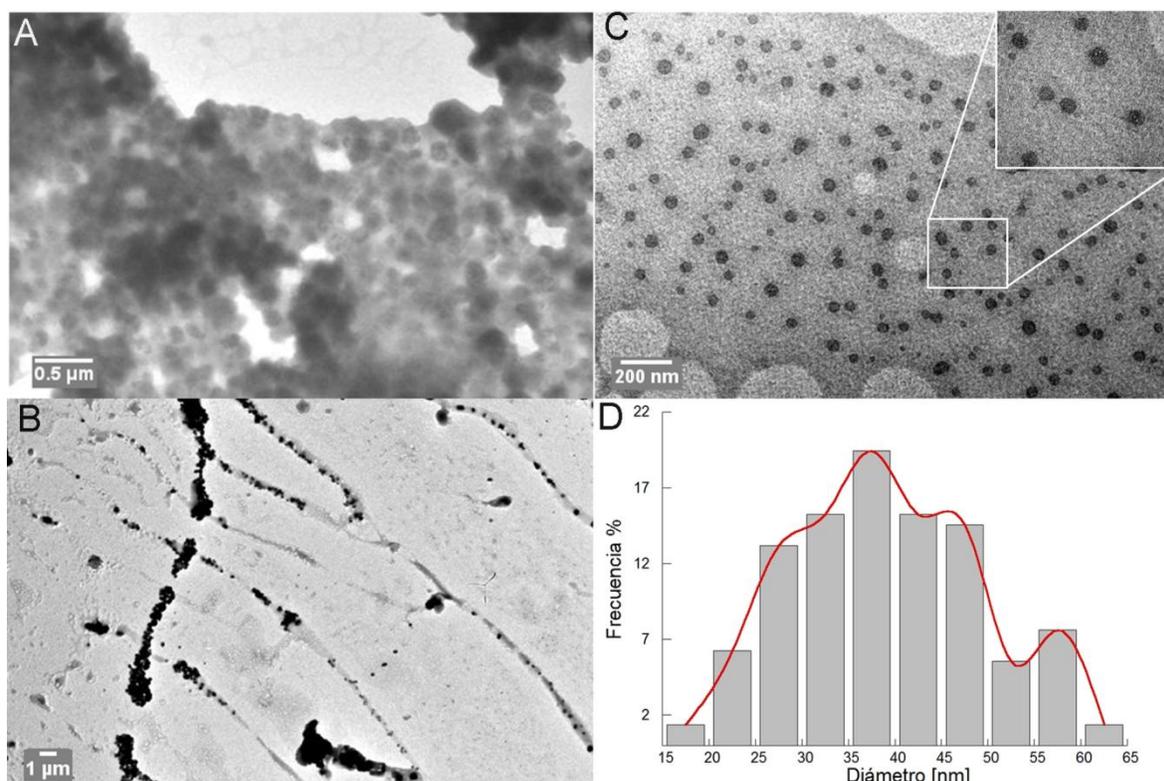


Figura 69. Imágenes TEM del péptido 33-mer en agua (200 μ M, pH 7.0) sobre un grid de dióxido de silicio. La muestra fue preparada mediante congelado-secado rápido por sublimación. A) Imagen en la que se observa el péptido 33-mer que se ensambla formando nanoesferas interconectadas como un film. B) Organización lineal de las nano-partículas. C) Ampliación de una región del film observado en A, en el cual se detecta la presencia de nanoesferas de menor diámetro. D) Distribución de diámetros de las esferas observadas en C, (n=50).

El incremento del tamaño de los agregados del 33-mer sobre dióxido silicio dependiendo de la velocidad de evaporación, pone manifiesto la capacidad de los oligómeros pequeños de 33-mer agruparse en estructuras esféricas más grandes, lo que es compatible con la hipótesis de que el crecimiento de los agregados en solución estaría mediado por el fenómeno de maduración de

Ostwald.²⁷⁸ La interacción de estos agregados preformados continuaría sobre la superficie, mediado por un modelo de percolación, llevando a la formación de un gel o film.

4.4.3.4. Evaluación del péptido 33-mer a la concentración 613 μM . Preparación de la muestra mediante secado a temperatura ambiente.

Inicialmente, la muestra fue depositada sobre la superficie y se permitió que se evapore el agua a temperatura ambiente, bajo campana tal como se realizó en concentraciones anteriores. Luego, la muestra fue analizada mediante STEM.

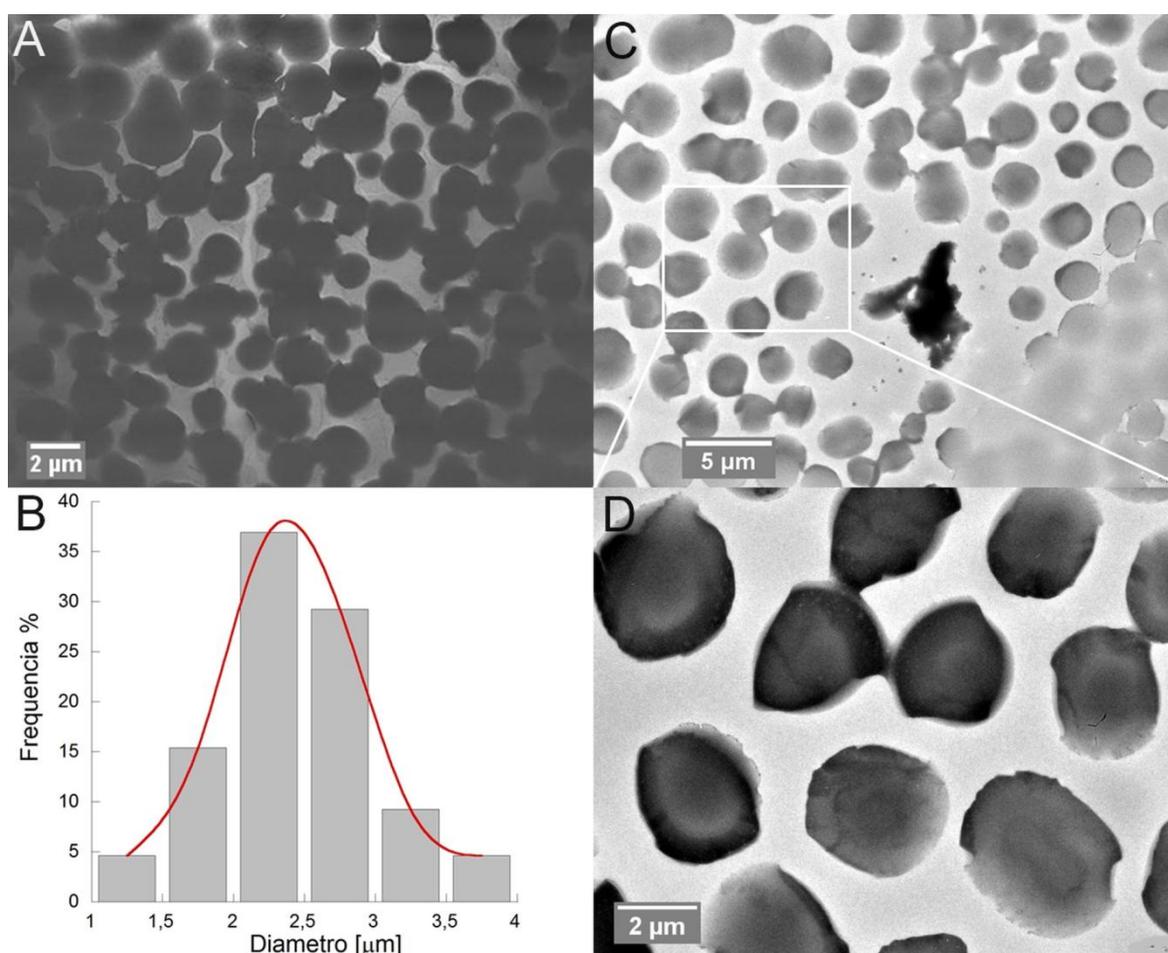


Figura 70. Imágenes STEM del péptido 33-mer en agua (613 μM , pH 7.0) sobre la superficie de dióxido de silicio. La muestra fue depositada y secada a temperatura ambiente. A) En este caso se pudo observar la presencia de estructuras esféricas. B) Distribución de diámetros de las esferas observadas en A (n=50) C) Ampliación de la región señalada de la figura A. D) Zoom de la región marcada en C, en la cual se puede observar en detalle las características de las estructuras formadas por el péptido33-mer.

En este caso se observó la presencia de esferas de mayor diámetro que las detectadas a

concentraciones menores ($2.42 \pm 0.54 \mu\text{m}$, $n=50$) y se evidencio la ausencia de las nano partículas y también del gel denso. Las imágenes obtenidas se presentan en la figura 70. La dimensión fractal fue calculada a partir de la Imagen A, siendo de 1.52 ± 0.03 , compatible con el mecanismo de percolación propuesto. A esta concentración, el 33-mer fue evaluado también por SEM. La muestra fue depositada sobre la superficie, y metalizada con ácido fosfotungstínico. Este agente de tinción negativa ha sido ampliamente usado para la observación de diversas muestras biológicas, entre ellas el virus del mosaico de tabaco, con una elevada resolución.²⁸⁵ Luego la muestra fue lavada con agua y secada por capilaridad. Las imágenes obtenidas se presentan en la figura 71. Nuevamente se observa la influencia del secado de la muestra sobre la morfología final, poniendo de manifiesto que los oligómeros del 33-mer son capaces de auto-organizarse sobre la superficie de silicio de manera diferencial, dependiendo de las condiciones de preparación de la muestra. En este caso fue posible detectar dos morfologías, por un lado la característica arquitectura de un hidrogel y nano partículas. En esta muestra, utilizando este agente químico fue posible detectar que las nano-partículas se tincionan diferencialmente. Además, fue posible observar como las nano-partículas interaccionan entre sí, dando lugar a dímeros o trímeros, estos últimos dispuestos linealmente. El diámetro promedio de las partículas aisladas es del orden de los de $207.0 \pm 42.7 \text{ nm}$. También se determinó la Df de la figura 71 B, la cual fue de 1.78 ± 0.04 , que es consistente con el mecanismo de percolación.

²⁸⁵ S. Brenner y R. W. Horne, 'A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses' (1959) 34 *Biochim Biophys Acta* 103.

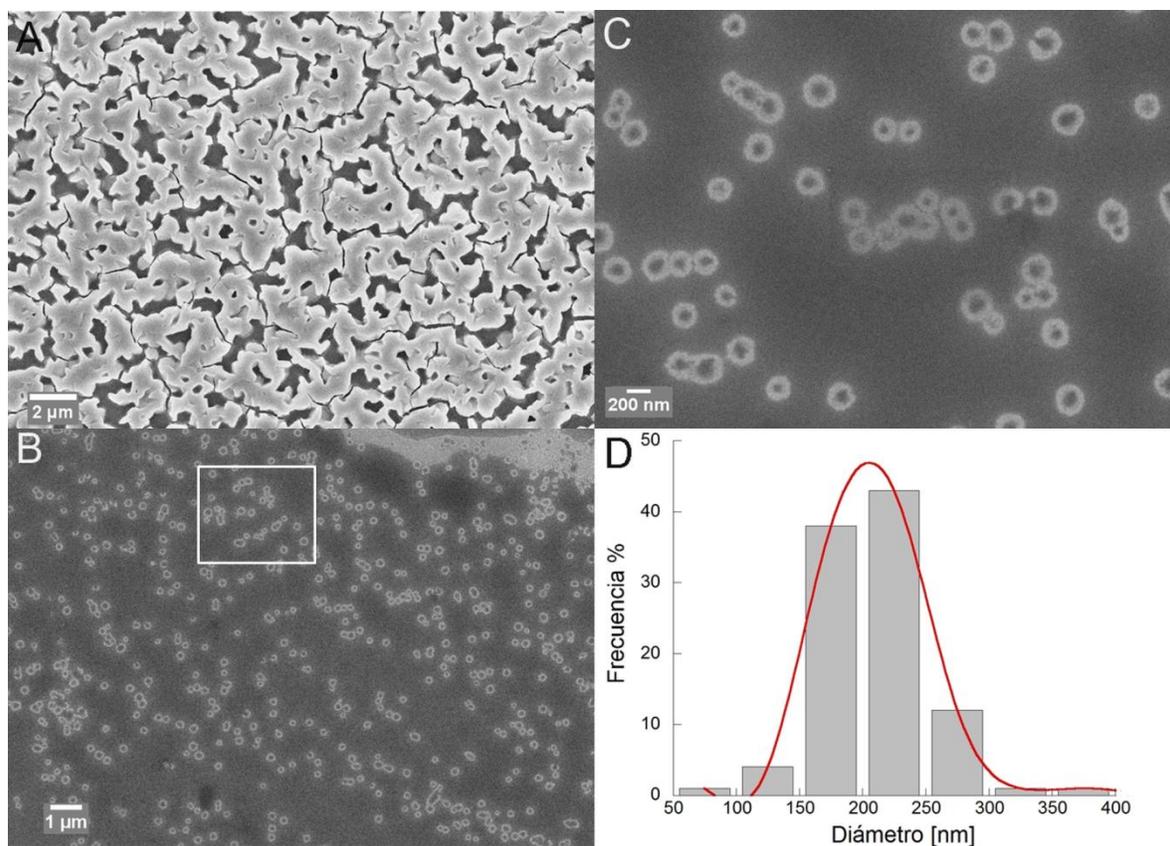


Figura 71. Imágenes SEM del péptido 33-mer en agua (613 μM , pH 7.0) sobre la superficie de dióxido de silicio. A) Estructura final del film formado B) Nano-partículas halladas alrededor del film. C) Ampliación de la región señalada de la figura B. D) Distribución de diámetros de las esferas observadas en B (n=50).

4.4.3.5. Evaluación del péptido 33-mer en presencia de un buffer salino a pH 7.0.

La presencia de sales es un factor importante que puede influenciar la interacción de partículas con una superficie. En este apartado se estudió como influyen las sales en la deposición del péptido sobre la superficie de Silicio. Para ello, el péptido fue disuelto logrando una concentración 613 μM en un buffer (1 mM de citrato de sodio, 1 mM de borato de sodio, 1 mM de fosfato de sodio y 15mM de NaCl). La muestra fue depositada, secada por capilaridad y posterior tinción con ácido fosfotungstínico seguido por lavados con agua y posterior secado por capilaridad. Los resultados obtenidos se observan en la figura 72.

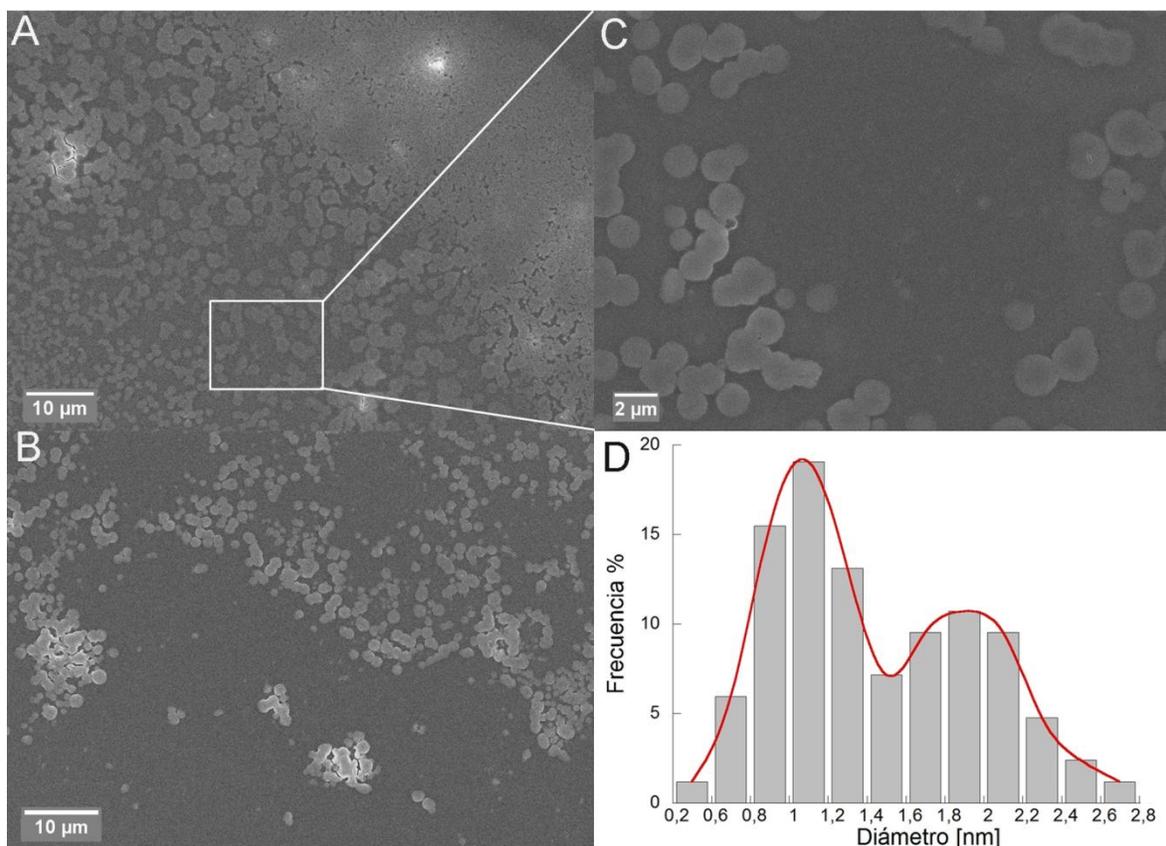


Figura 72. Imágenes SEM del péptido 33-mer en agua (613 μM , pH 7.0) sobre la superficie de dióxido de silicio, buffer (1 mM de citrato de sodio, 1 mM de borato de sodio, 1 mM de fosfato de sodio y 15mM de NaCl). La muestra fue secada mediante capilaridad y con tinción utilizando ácido fosfotungstínico. A) y B) Se observa la presencia de estructuras esféricas pequeñas que se asocian para generar estructuras mayores hasta formar una película sobre la superficie. C) Ampliación de la región señalada de la figura A, mostrando la estructura de las esferas. .D) Distribución de diámetros de las esferas observadas en A (n=100).

Se observó que el péptido 33-mer en este buffer era capaz de auto-asociarse en estructuras esféricas, cuyos tamaños están comprometidos entre $1.19 \pm 0.20 \mu\text{m}$ y otras de $2.03 \pm 0.35 \mu\text{m}$. Se determinó la Df de la imagen A, obteniéndose un valor de 1.85 ± 0.03 , probablemente compatible con el mecanismo de crecimiento por percolación (Figura 72).

Estos tamaños son mayores a los informados previamente en agua para la misma preparación de la muestra y en este caso la tinción de las esferas no fue diferencial, por lo que posiblemente se trate de agregados compactos. En este caso la presencia de sales podría favorecer el proceso de maduración de Ostwald (Comparar Figura 71 y 72 respectivamente).

4.4.3.6. Evaluación de la agregación del péptido 33-mer cuando este es sometido a un estrés mecánico.

Diversas proteínas, entre ellas las proteínas de la seda, presentan una organización diferencial sobre una superficie cuando estas son sometidas a un estrés mecánico a través de la técnica de spin coating.²⁸⁶ En esta técnica se hace rotar a la muestra líquida sobre un sustrato a una velocidad angular constante. De esta manera se favorece a la formación de film uniforme cuyo espesor puede ser desde el orden de nanómetros a micrómetros. En este caso se depositó la muestra sobre la superficie y se aplicó una velocidad de 1000 rpm por 4 minutos, obteniéndose una muestra seca. Luego se realizó la tinción con ácido fosfotungstínico. Este procedimiento se realizó sobre muestras del péptido en agua (Figura 73A) y en buffer (1 mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15mM de NaCl) (Figura 73B), en ambos casos la concentración de péptido fue de 613 μ M.

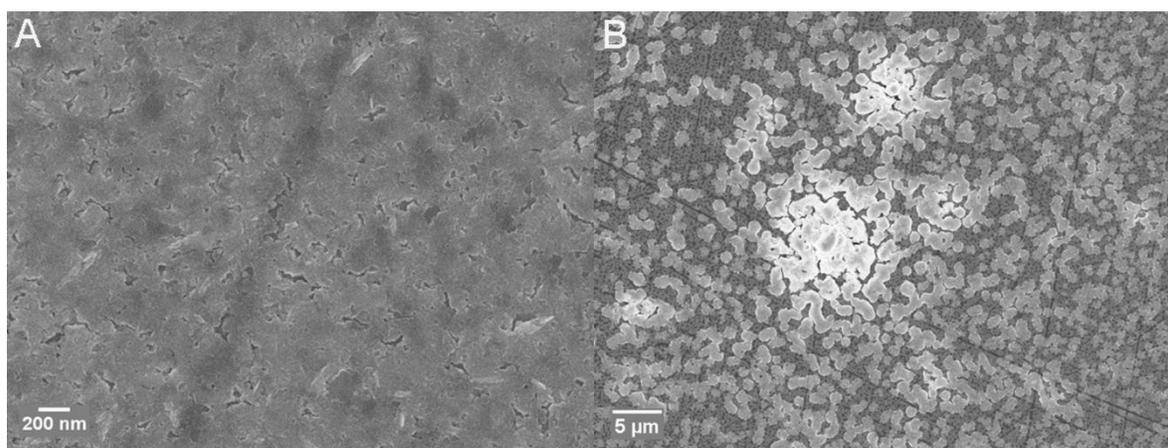


Figura 73. Imágenes SEM del péptido 33-mer (613 μ M, pH 7.0) sobre la superficie de dióxido de silicio. Las muestras fueron preparadas mediante spin-coating. A) Imagen del péptido en agua en la se observa la formación de una película. B) Imagen del péptido en buffer (1 mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato de sodio y 15mM de NaCl en la se observan esferas auto-asociadas).

Al analizar las características de ambos agregados finales, es posible determinar que cuando los oligómeros se encuentra en agua, el estrés mecánico favorece la formación de un film, no pudiéndose detectar nanoesferas aisladas. (Comparar con Figura 71 del mismo espécimen sin spin-coating). Por

²⁸⁶ I. Greving et al, 'Shear-induced self-assembly of native silk proteins into fibrils studied by atomic force microscopy' (2012) 13(3) *Biomacromolecules* 676.

otro lado, en la condición de buffer, es posible detectar la presencia de esferas interconectadas entre sí, de manera similar a lo observado cuando el espécimen no fue tratado con spin coating (Figura 72). Se puede concluir que la presencia de sales, en situaciones de estrés mecánico disminuiría la interacción inter-partícula, y así se inhibiría la formación un film a la misma concentración, si la comparamos con la muestra del péptido en agua.

4.4.3.7. Congelado y secado del péptido 33-mer a 613 μM .

Finalmente, se realizó el método de preparación de la muestra mediante congelado y secado por sublimación. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

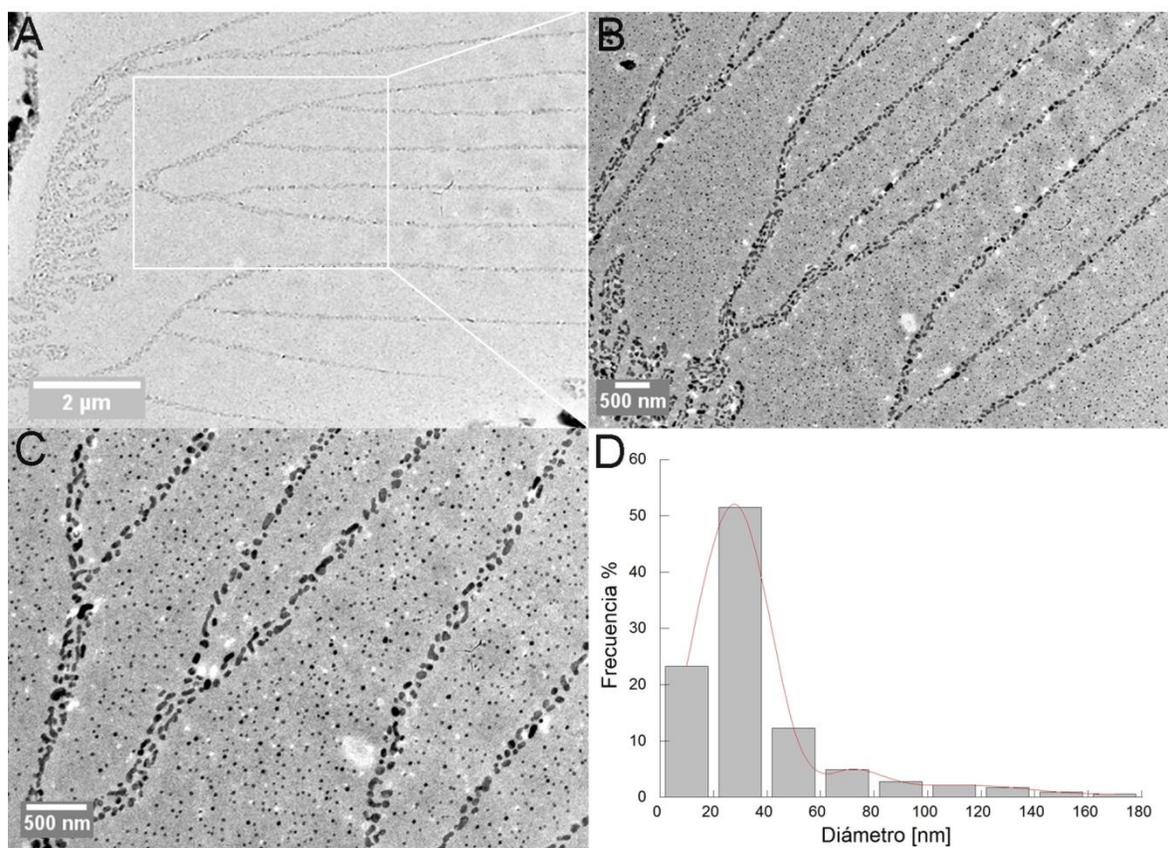


Figura 74. Imágenes TEM del péptido 33-mer en agua sobre un grid recubierto de dióxido de silicio en la concentración 613 μM , pH 7.0. La muestra fue preparada mediante congelado-secado rápido por sublimación. A) Imagen en la que se observa que péptido 33-mer que se ensambla formando estructuras lineales que se ramifican, presentando una estructura del tipo fractal. B) Ampliación de la imagen A en la cual se puede observar en detalle la distribución lineal del péptido. C). Ampliación de la imagen B) en la cual se detecta las nano-estructuras que conforman a los agregados y aquellos que rodean al mismo. D) Distribución de

diámetros de las nano-estructuras observadas en B), (n=4000).

En la figura 74 se presentan las diferentes morfologías que el péptido 33-mer era capaz de formar a esta concentración y en estas condiciones. El 33-mer se auto-organizó generando arreglos lineales ramificados, los mismos se encontraban rodeados por nano-estructuras aisladas de un diámetro menor. Al analizar la distribución presentada en la figura 74, se pudo corroborar la existencia de dos clases de nano-estructuras, unas que se encontraban en una alta proporción, con un diámetro medio $24.6 \pm 6.9\text{nm}$ y las otras en menor número, presentando un diámetro de $70 \pm 7.5\text{nm}$ y estas están alienadas formando los clusters. En este caso, se determinó que el proceso de agregación presenta un comportamiento jerárquico, detectándose diferentes niveles de complejidad. La Df determinada fue de 1.78 ± 0.04 , en este caso es posible suponer un mecanismo de crecimiento limitado por difusión (DLA), en donde la anisotropía del agregado es el que rige incorporación de la partícula y no el medio como en el caso del mecanismo de percolación. Es importante destacar que a esta concentración por otros métodos hemos mostrado que el sistema es capaz de organizarse en forma de oligómeros esféricos pero también en estructuras lineales. Además, es posible hipotetizar la presencia de fibras, teniendo en cuenta que por efecto del filtrado fue posible eliminar una elevada concentración proteínica (ver experimento de DLS a $613\mu\text{M}$).

Al igual que en las concentraciones anteriores, la metodología empleada en la preparación de la muestra modificó la morfología y el tamaño de los oligómeros de 33-mer sobre la superficie de dióxido de silicio. Teniendo en cuenta esto es interesante destacar que los oligómeros del péptido 33-mer presentaron la capacidad de formar diferentes estructuras dependiendo de las condiciones de deshidratación (solo en el caso del dióxido de silicio) y la hidrofobicidad de la superficie en la cual se depositan.

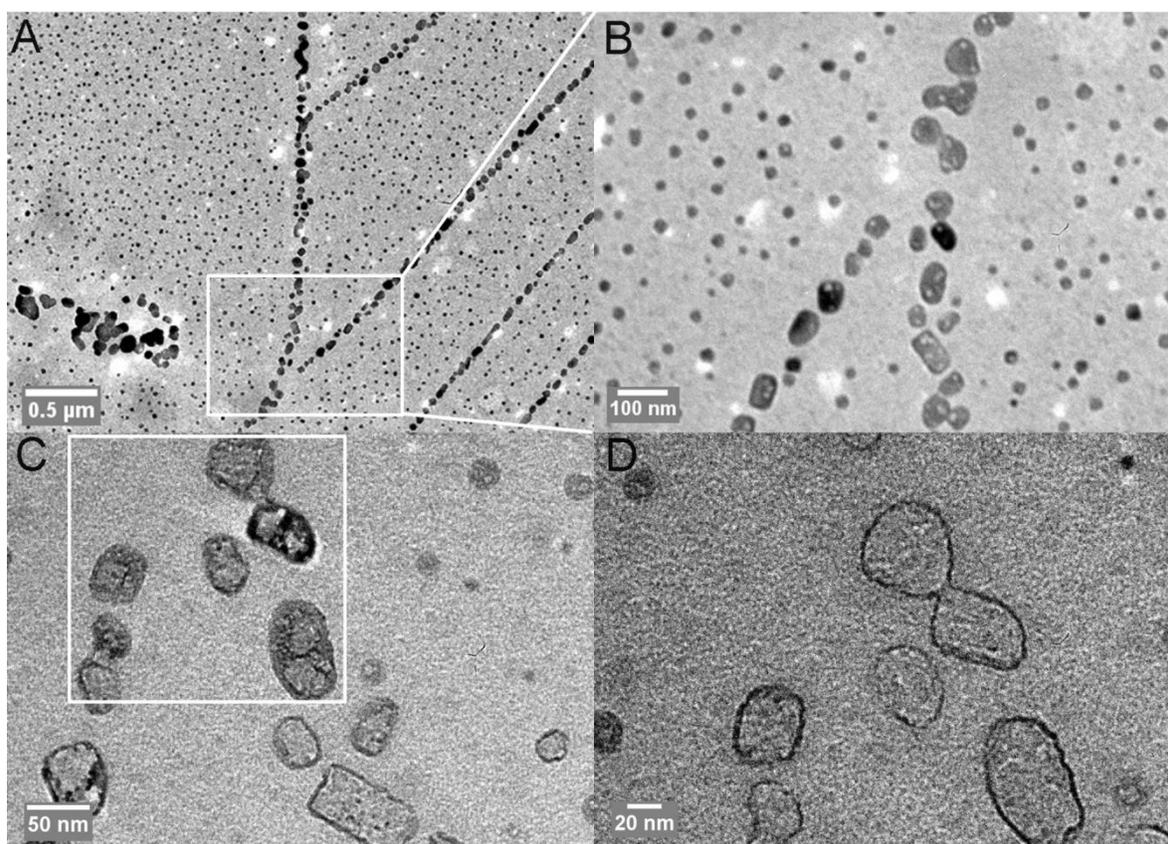


Figura 75. Imágenes de TEM del péptido 33-mer en agua (613 μM , pH 7.0) depositado sobre un grid recubierto de dióxido de silicio A) Imagen en la que se observan nanoesferas rodeando nano-cilindros dispuestos linealmente. B) Ampliación de la región marcada en A). C) Imagen mostrando la arquitectura interna de los nano-cilindros. D) Ampliación de C).

En la figura 75 fue posible observar la presencia de al menos dos tipos de nano-estructuras, aquellas que se encontraban formando parte de los arreglos lineales, que poseían principalmente una morfología similar cilíndricos, mientras que aquellas que no eran parte de los agregados lineales, eran esféricas y más pequeñas. Esta diferencia podría deberse a que en los arreglos lineales, varias nanoesferas se auto-asociaron para dar lugar a la formación de las nuevas estructuras como los arreglos lineales. En este caso, es importante destacar que estos resultados se correlacionan adecuadamente con los datos en los que se detectaron un cambio de estructura secundaria desde PPII a una estructura de tipo β observados por CD y ATR-FT-IR. También estos se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos mediante DLS- Correlación 3D, los cuales determinaron que a todas las concentraciones, el sistema se encontraba en equilibrio con estructuras de diámetros <

100 nm pero también > 1000 nm, una vez que la muestra fue filtrada con un filtro de 200 nm de cut-off. Las estructuras aquí detectadas podrían explicar el comportamiento dinámico observado en solución.

Para evaluar la topología de estos agregados, la muestra fue analizada a través de STEM, lo cual se presenta en la figura 76. Aquí fue posible observar las características cilíndricas de los agregados que forman los arreglos lineales. Estudios previos han determinado que en sistemas modelos como Phe-Phe, los nano-cilindros (nanorods) son precursores de fibras amiloide.²⁸²

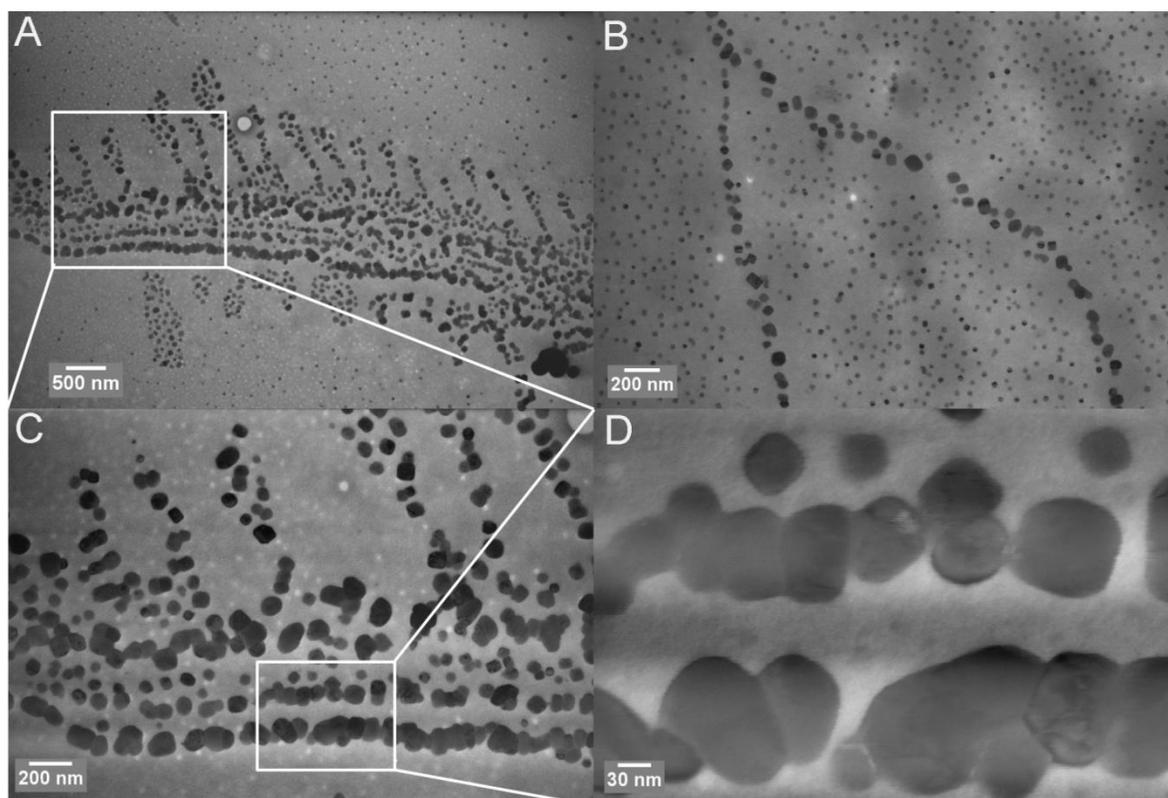


Figura 76. Imágenes STEM del péptido 33-mer en agua (613 μ M, pH 7.0) sobre un grid recubierto de dióxido de silicio. La muestra fue preparada mediante congelado-secado rápido por sublimación. A) En esta imagen se observan los agregados lineales rodeados de nanoesferas. B) Imagen en la que se presenta otra región de la muestra donde se observan nano-estructuras esféricas rodeando nano-cilindros dispuestos linealmente. C) Ampliación de la Imagen A). D) Ampliación de la imagen C) presentando en detalle la morfología de los nano-cilindros.

Con el objetivo de estudiar con una mayor resolución las nano-estructuras y teniendo la disponibilidad del microscopio de Helio (Carl Zeiss Orion Plus) de la Universidad de Bielefeld, se

estudió el espécimen con este microscopio. El Microscopio de Helio, se caracteriza por presentar grandes ventajas sobre los microscopios convencionales como reducción de la carga, disminución del daño de la muestra, elevada resolución superficial sin la necesidad de realizar una metalización, incremento de la profundidad de campo y una resolución de 5 Ångstrom. La clave de este sistema es su fuente, la cual es una punta (tip) que tiene la morfología de una pirámide con un ápice de tres átomos. Cuando punta es enfriado criogénicamente y expuesto a un elevado voltaje, (30 kV) en presencia de Helio, el gas ionizado es generado en el ápice de la punta. Esto se debe a que el campo generado es solo lo suficientemente fuerte para ionizar al gas en esos tres átomos. De estos se genera una emisión de iones, de los cuales solo la producida por uno de los átomos será seleccionada. Por lo tanto las imágenes se producen de la ionización generada por uno de los átomos que actúa como fuente. Los iones generados son acelerados mediante la columna del microscopio en un haz que posee la misma forma y patrón que el microscopio SEM. Debido a su elevada fuente de iones, la apertura del haz usado es muy pequeña, por lo que aberraciones esféricas y cromáticas de la columna de iones son insignificantes. Este microscopio exhibe una sustancial mejora en la resolución, la cual es 5 veces mayor que la de los modernos SEM. Además como la longitud de onda de Broglie de los iones helio es muy pequeña, (debajo de un picómetro para 30 kV de voltaje de aceleración), el tamaño del punto de iluminación no se encuentra limitado por aberraciones de difracción. Además, se incrementa de la resolución debido a la elevada masa del ion Helio que resulta en una elevada cantidad de iones dispersados causando que la mayoría de la energía del haz se deposite en áreas más profundas de la muestra. Esto resulta en la generación de electrones secundarios que producen un gran contraste y que provienen del Haz de iones. Normalmente, se producen entre 2-5 electrones por ion de Helio. Debido a la elevada penetración de los iones dispersados en las muestras biológicas, hay menor probabilidad de que el haz produzca un daño sobre la superficie de estas muestras que poseen baja densidad. Al no depositar energía en la muestra, se genera un mínimo daño a 30 kV, que es el empleado para observar en el rango de 0.1–0.4 pico- Ångstrom. Por último, la velocidad de pulverización catódica es dos órdenes de magnitud menor que el galio a la misma energía del haz.

Esto resulta en que las muestras biológicas pueden ser observadas de manera repetida por tiempos prolongados antes de detectar un notable daño.²⁸⁷

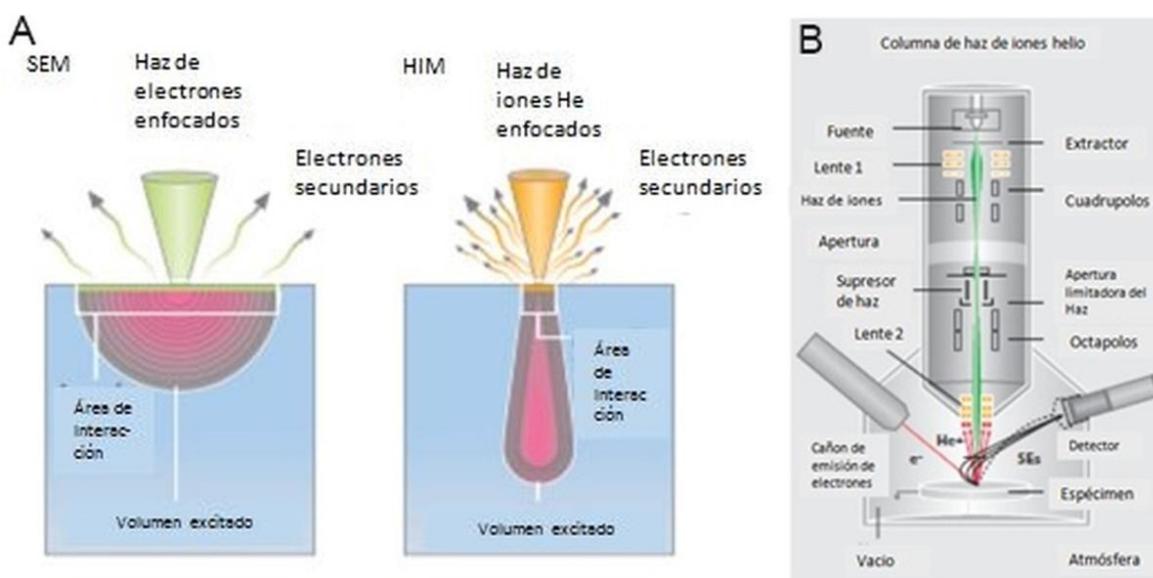


Figura 77. A) Comparación de la penetración del Haz en un Microscopio SEM convencional con respecto al Microscopio de Helio. B) Diagrama presentando la estructura interna del microscopio de Helio.

Utilizando esta microscopia, fue posible visualizar con mayor resolución los agregados lineales del 33-mer como fibras y filamentos (Figura 78A). Estos poseían un diámetro de alrededor de 20 nm (Figura 78B) y se encontraban rodeados por nano partículas más pequeñas. Estas imágenes son similares, a las observadas previamente y a las obtenidas por TEM en un grid de Formvar utilizando acetato de uranilo y también por AFM sobre mica a una concentración similar (Comparar figuras 33, 34 y 54, 55), lo cual nos permite afirmar que el péptido 33-mer es capaz de formar agregados supramoleculares, lo cual justifica la polidispersidad y dinámica observada en DLS y experimentos de anisotropía de estado estacionario.

²⁸⁷ J. Notte et al, 'An Introduction to the Helium Ion Microscope' (2007) 931(1) *AIP Conference Proceedings* 489.

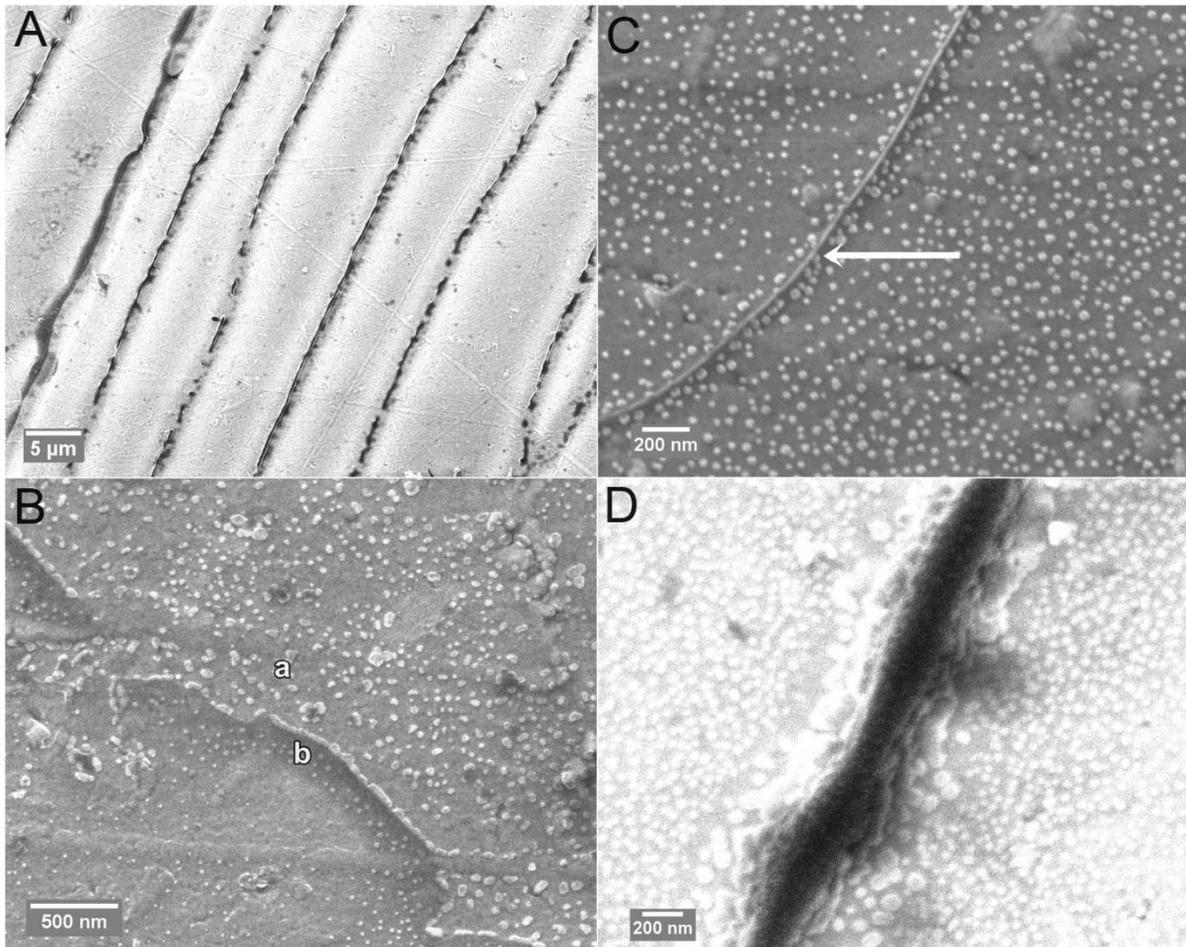


Figura 78. Imágenes obtenidas con el Microscopio de ion Helio del péptido 33-mer ($613 \mu\text{M}$, pH 7.0) en agua depositado sobre un grid recubierto con SiO_2 . La muestra fue preparada mediante congelado y secado por sublimación. A) Imagen tomada en otra región de la muestra en la cual se puede observar agregados dispuestos linealmente que se generan a partir de la asociación de estructuras menores. B) Imagen en la que se detecta nano-estructuras de morfología cilíndrica (a), estas forman estructuras lineales (b) mediante auto-asociación. En las imágenes C) y D) se pueden observar en detalle la arquitectura de las estructuras lineales y las nanoesferas que la rodean. En C) se señala la estructura fibrilar.

Por otro lado, se observaron diferentes nano-estructuras, las cuales son presentadas en la figura 79.

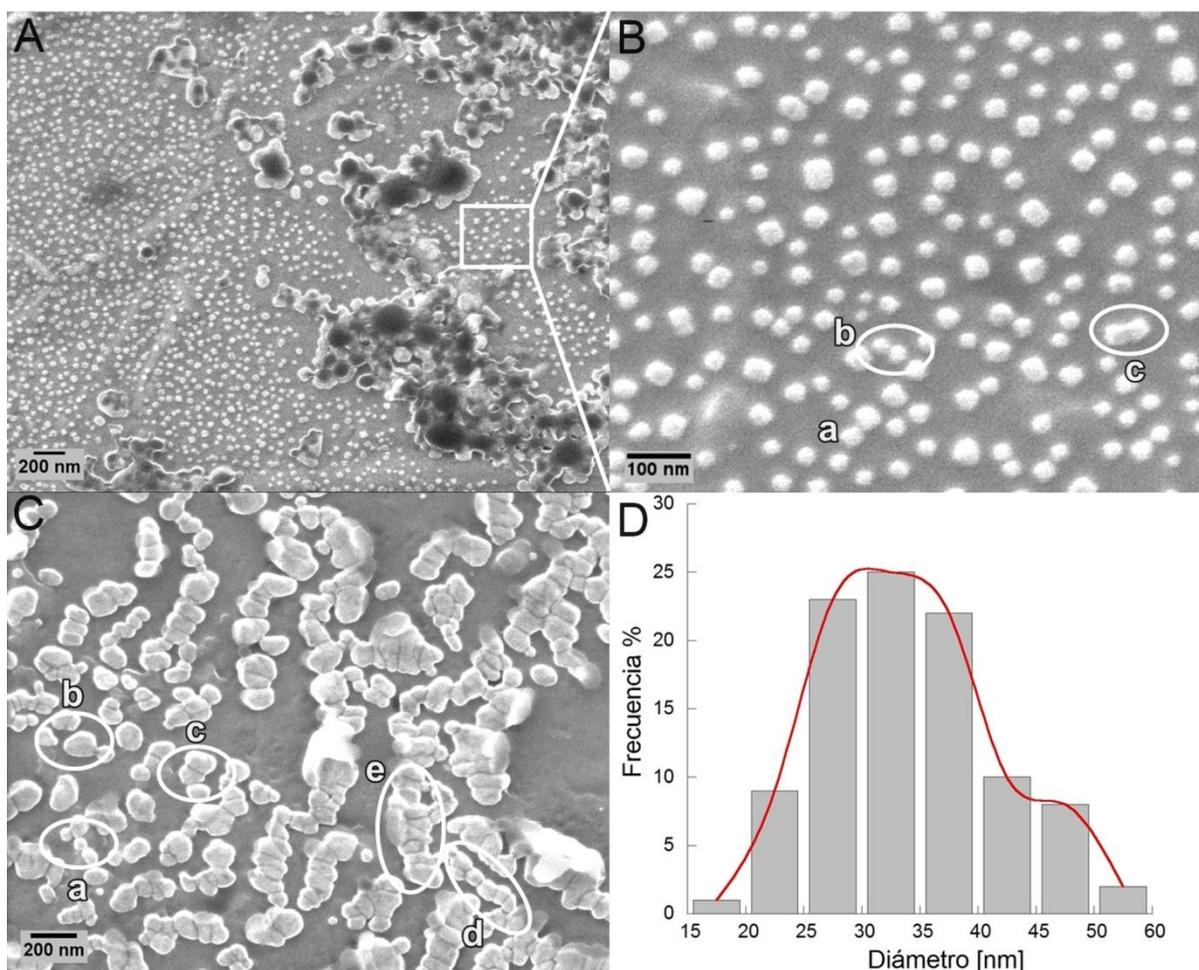


Figura 79. Imágenes obtenidas con el Microscopio de ion Helio del péptido 33-mer ($613 \mu\text{M}$, pH 7.0) en agua depositado sobre un grid recubierto con SiO_2 . La muestra fue preparada mediante congelado y secado por sublimación. A) Imagen en la que se observa nano-estructuras esféricas y agregados amorfos. B) Ampliación de una región señalada en A en la que se observan diferentes nano-estructuras: a) nanoesferas aisladas, b) acercamiento entre las estructuras detectadas en a) y en c) formación de un nano-cilindros mediante la asociación de dos nano-estructuras esféricas. C) Imagen obtenida en otra región de la muestra en la cual se puede observar: a) acercamiento entre nano-esferas aisladas, b) formación de un nano-cilindros, c) asociación de nano-cilindros en los extremos, d) asociación de nano-cilindros dispuestos de manera lineal. e) estructura lineal formada por la asociación lateral de agregados lineales de nano-cilindros. D) Distribución de diámetros de las esferas observadas en B ($n=50$).

Las nanoesferas aisladas poseen un diámetro medio de 33.8 ± 7.6 nm. Estas se asocian para dar lugar a nano-cilindros. Los nano-cilindros, tienen una dimensión de 127.04 ± 30.61 nm de largo y de 70.136 ± 16.39 de ancho, es posible hipotetizar que se formaron por interacción de las nano-esferas. (Figura 79 B y C) Además, fue posible detectar que los nano-cilindros se asociaban dando lugar a

estructuras lineales. Además estas estructuras lineales interactuaban de manera lateral formando agregados mayores. Se determinó la Df de la imagen 79 B, siendo esta de 1.72 ± 0.04 , compatible con el mecanismo de DLA. El cambio estructural, esfera-cilindro, observado a esta concentración, se correlaciona con los resultados estructurales obtenidos en solución (CD) y superficie (ATR-FT-IR). Por otro lado, se detectaron estructuras lineales preformadas, como fibras y filamentos y nanoesferas (aisladas y parte de agregados lineales), además nano-cilindros formando parte de los agregados lineales. Este hallazgo se correlaciona con los datos obtenidos mediante DLS. Mediante esta técnica, se observó que los agregados más grandes se retenían en el filtro, mientras que los más pequeños eran capaces de formar estructuras más grandes después de la filtración. Además es de gran importancia destacar que estos resultados son compatibles con los obtenidos en mica por AFM, por TEM y SEM, en grid de Formvar y vidrio respectivamente. Las imágenes obtenidas por el Microscopio de Helio han permitido obtener una mejor resolución y contraste para todas las estructuras presentes en la muestra. Esto permite hipotetizar un mecanismo jerárquico de auto-ensamblado, iniciado por nano-esferas, luego formando nano-cilindros, los que luego se agrupan en arreglos lineales y generando nano-cilindros apilados y finalmente filamentos y fibras.

Resumiendo, podemos concluir que 33-mer es capaz de auto-organizarse en las superficies de HOPG y de dióxido de silicio. En el HOPG fue posible detectar nanoesferas y estructuras planas similares a las obtenidas en mica. Los oligómeros de 33-mer interaccionan fuertemente en esta superficie con lo que es posible hipotetizar que en medio hidrofóbico, como la superficie intestinal de un individuo sano, estos podrían acumularse. En la superficie de dióxido de silicio, el auto-ensamblado del 33-mer fue dinámico y dependiente de las condiciones de preparación del espécimen, observándose que el aumento en la velocidad y metodología de secado influía en la morfología final de los oligómeros, obteniéndose agregados posiblemente a través de un mecanismo de percolación. Esta capacidad de cambio en la agregación mediado por la superficie y la deshidratación también podría ser un evento importante en el balance entre la tolerancia y el desarrollo de las enfermedades relacionadas. A través de la técnica de congelado y secado por

sublimación sobre dióxido de silicio y el uso de microscopio de Helio se pudo caracterizar la morfología de todos los agregados presentes a 613 μM , aportando herramientas para justificar el mecanismo de auto-organización propuesto.

Capítulo V:

Conclusiones

Conclusiones del Capítulo III

Se evaluó la capacidad de la proteína gliadina de formar estructuras supramoleculares en dos pHs relacionados con el proceso de digestión humana. Las principales isoformas de los sistemas estudiados estaban constituidas por alfa y beta gliadinas. Estas demostraron auto-organizarse tanto a pH 3.0 como a 7.0.

A pH 3.0 se observó un comportamiento del tipo micelar o core-shell del sistema, en el cual existía una incipiente inestabilidad, reportada por el potencial Z, sin embargo las estructuras se encontraban estabilizadas en solución probablemente por interacciones con el solvente. Se observó mediante TEM que las nano-estructuras se disponían aisladas pero cercanas entre sí. Al realizar las microscopías SEM sobre vidrio, se determinó la existencia de un arreglo del tipo fractal, regido por un mecanismo DLA. Este comportamiento ha sido reportado para proteínas como la sericina¹²⁸ y silicateninas²⁵² bajo condiciones de baja fuerza iónica. Además estas nano-partículas han demostrado unir la sonda Rojo Nilo, permitiendo determinar que estas exponen regiones hidrofóbicas.

Luego, al incrementar el pH de 3.0 a 7.0, se observó un aumento de la atracción de las partículas, debido a la cercanía al punto isoeléctrico. Esto provocaría que las partículas se encuentren mediante movimiento Browniano y tiendan a auto-asociarse. Luego de realizar la correspondiente centrifugación a este pH, permanecieron en solución aquellas estructuras que poseían la capacidad de interactuar con las moléculas del agua mediante puente hidrógeno. Al observarlas mediante ME, se determinó que estas nano-estructuras, se asocian formando clusters y agregados del tipo amorfo. El cambio de pH como modulador de las estructuras auto-organizadas ha sido descripto para la proteína caseína pero con la disminución de este parámetro. En el caso de la caseína los agregados permanecen estables a pH 6.8, una vez que se disminuye el pH, el sistema forma agregados coloidales precipitando.¹⁸⁵ Por otro lado, se ha observado que a pH 7.0 la sonda Rojo Nilo no es

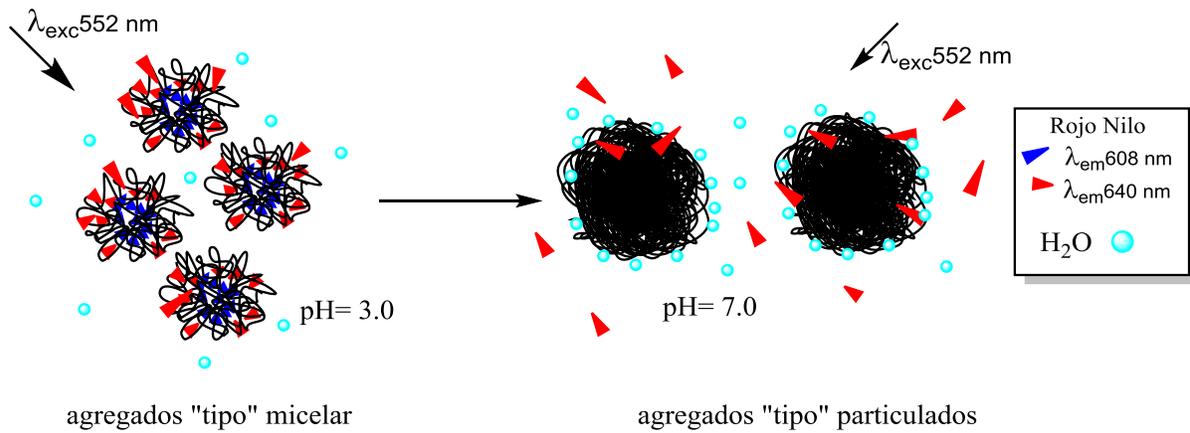
capaz de unirse. Esto podría explicarse mediante un cambio en el grado de compactación de las cadenas laterales de las proteínas cuando se produce la transición de pH 3.0 a 7.0. Estas partículas estarían estabilizadas en solución por puente hidrogeno con el agua, con lo que si hubiera interacción con el Rojo Nilo, ocurriría un apagamiento de la fluorescencia.

Por otro lado, previamente se ha reportado que la gliadina no puede ser degradar completamente por las enzimas digestivas como la pepsina (pH de actividad 2-3) y tripsina (pH 7), tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.⁵³ Utilizando técnicas bioinformáticas como Peptide Cutter de Expsy, se ha podido proponer la existencia de aproximadamente 89 sitios de corte con las enzimas digestivas pepsina, tripsina y quimiotripsina. Además, se ha podido predecir que estas proteínas tendrían un elevado componente de desorden en su estructura, lo cual se encuentra en concordancia con lo observado mediante CD. También, estas proteínas presentarían una elevada accesibilidad al solvente, por lo que el corte con estas enzimas debería encontrarse favorecido, sino estuvieran agregadas. Teniendo en cuenta que este proceso de degradación enzimática no ocurre completamente y considerando los hallazgos realizados en este trabajo, es posible hipotetizar que las gliadinas podrían adoptar una estructura del tipo coloidal, la cual disminuiría la accesibilidad de las enzimas a sitios de corte específicos. Por otro lado, considerando que los ensayos inmunológicos en los que se emplea esta mezcla proteica son llevados a cabo a pH neutro,^{288 289} se podría hipotetizar que los agregados de gliadina podrían inducir una respuesta inmune.

Como perspectiva para continuar estos estudios, se propone utilizar la técnica de SAXS y Dispersión de Luz Dinámica para evaluar los agregados en solución y la evolución del proceso de digestión por la enzima pepsina. Además, sería interesante aislar los agregados de gliadina y probar la capacidad de inducción de respuesta inmune en células.

²⁸⁸ S. Drago et al, 'Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines' (2006/04/26) (2006) 41(4) *Scand J Gastroenterol* 408.

²⁸⁹ M. Sellitto et al, 'Proof of concept of microbiome-metabolome analysis and delayed gluten exposure on celiac disease autoimmunity in genetically at-risk infants' (2012/03/21) (2012) 7(3) *PLoS One* e33387.



Esquema 5. Hipótesis de la auto-agregación de la proteína gliadina. La gliadina a pH 3.0 forma nanoestructuras esféricas que exponen sitio de unión a sondas hidrofóbicas como el Rojo Nilo, tanto de manera profunda como superficial. Cuando estas nano-partículas sufren un cambio de pH a 7.0, las mismas se agregan y compactan, reduciendo la exposición de sitios de unión al Rojo Nilo, permaneciendo solo algunas moléculas depositadas sobre las superficies del agregado, las cuales interaccionarían con el agua superficial, apagando la fluorescencia .

Conclusiones del Capítulo IV

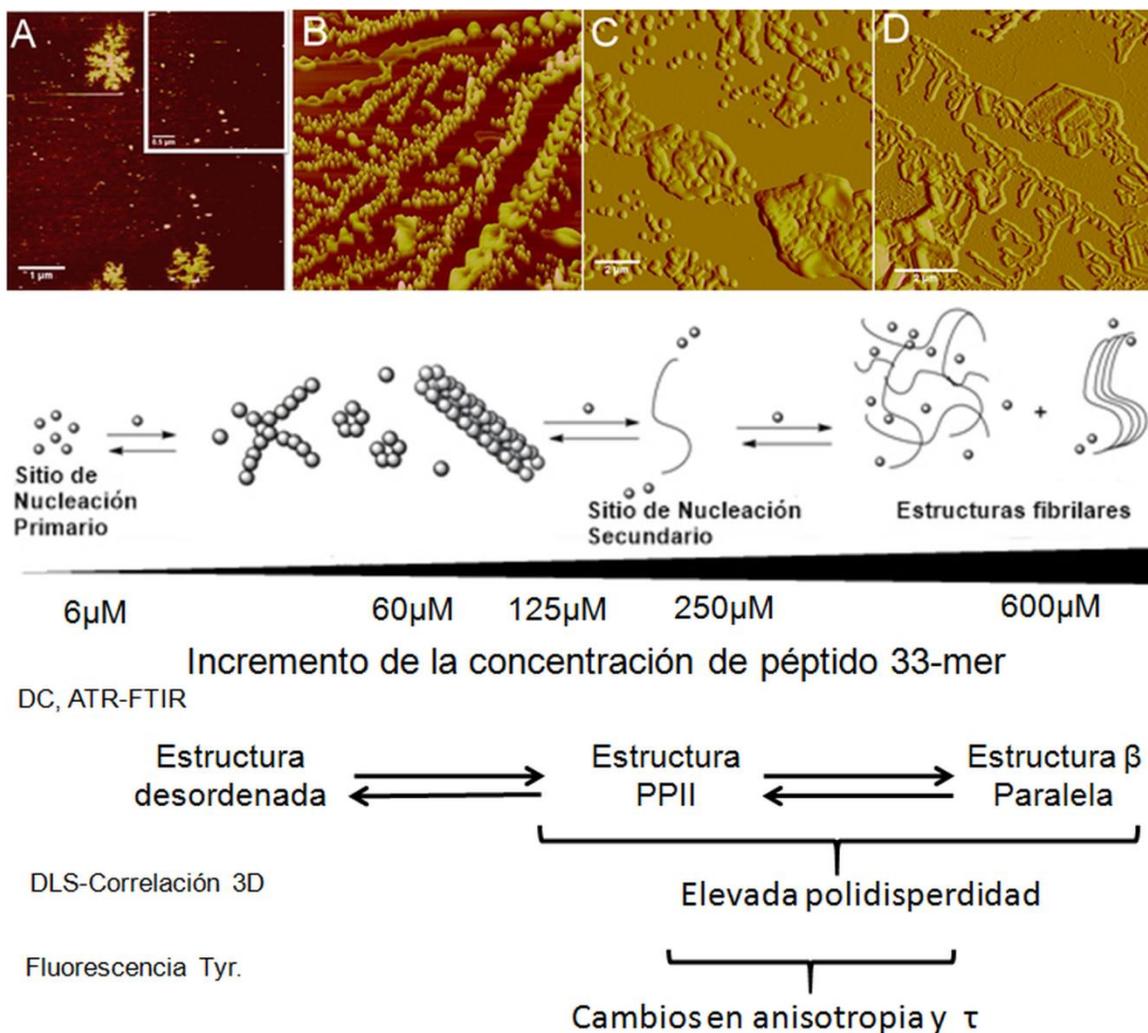
Se ha investigado la estructura secundaria del péptido 33-mer de la proteína alfa-2 gliadina, y su capacidad de auto-organizarse en solución y sobre superficies de diferente hidrofobicidad. En primer lugar se pudo establecer que 33-mer es capaz de auto-organizarse en solución y presentar cambios conformacionales, dependientes de la concentración. Inicialmente a bajas concentraciones (46-197 μM) el equilibrio se produce entre una estructura desordenada a una PPII, y a concentraciones mayores de 197 μM el porcentaje de estructura de tipo β aumentó. Esta transición conformacional ocurrió tanto en agua como en presencia de sales, de manera reversibles. Para visualizar las características de los oligómeros se realizaron estudios de microscopia electrónica, detectando diferentes estructuras cuaternarias a la concentración de 613 μM como nano-esferas, filamentos y fibras. Al hacer uso de técnicas bioinformáticas simples, se puso de manifiesto la hidrofiliidad de 33-mer, lo que no era evidente de su estructura primaria. Se calculó la distribución de cargas parciales, poniendo de manifiesto la naturaleza anfifílica, lo cual explicaría, inicialmente, la capacidad de formar oligómeros en agua. Además, se construyó un modelo de dímero utilizando herramientas de dinámica molecular. Posiblemente las interacciones del tipo hidrofóbica y la capacidad de formar puente hidrógenos de los residuos glutamina juegan un rol importante en la estabilización de los agregados en solución.

Para evaluar el tamaño de los oligómeros en solución, se utilizó la técnica de DLS- Correlación 3D. Mediante esta fue posible determinar que este péptido era capaz de formar oligómeros en solución de distintos tamaños, y estos se encontraban en un equilibrio dinámico entre sí, evidenciando meta-estabilidad y continua remodelación. Además, fue posible determinar que a concentraciones mayores de 200 μM , existen agregados de gran tamaño como fibras, las cuales fueron separadas por filtración. Por otro lado, el sistema fue estudiado utilizando la fluorescencia

intrínseca de tirosina de estado estacionario y fluorescencia resuelta en el tiempo, corroborando los hallazgos observados mediante CD y DLS-Correlación 3 D, confirmando los cambios estructurales observados a diferentes concentraciones y la dinámica de asociación de este sistema. Finalmente, mediante el uso de la técnica de ATR-FTIR, se observó un comportamiento conformacional en superficie, similar al observado mediante CD. Esto indica que al producirse un incremento de la concentración del mismo, se genera un cambio conformacional desde un tipo de estructura desordenada/PPII a un tipo de estructuras del tipo β paralela, estructura secundaria relacionada con enfermedades conformacionales, como Alzheimer y Parkinson. Teniendo en cuenta la relación entre nano-partículas y respuesta inmune, la existencia de oligómeros del 33-mer en solución, podría explicar la respuesta inmune inicial, la resistencia a la proteólisis previamente informada y que éste péptido sea capaz de atravesar membranas celulares.

Utilizando la técnica de AFM en modo contacto, fue posible evaluar la oligomerización del péptido 33-mer en función de la concentración sobre una superficie mimética de membranas celulares como la superficie de mica. Es posible concluir que el péptido 33-mer es capaz de auto-organizarse de manera dependiente de la concentración sobre esta superficie, originando diferentes estructuras cuaternarias. A 6 μM se detectaron nano-estructuras esféricas y pequeños clústeres. A 60 y 250 μM , se observaron esferas alineadas, arreglos del tipo anulares y estructuras filamentosas. Este tipo de estructuras no solo fueron detectadas en agua, sino que también en presencia de buffer HEPES, por lo que el sistema tiende a organizarse de una manera estable y reproducible. Mediante la determinación de la D_f , se pudo establecer que este péptido se auto-organiza por un mecanismo de *Agregación Limitada por la Difusión*. A 600 μM se observó que además de oligómeros pequeños, filamentos interconectados y placas, estas últimas podrían ser el producto de interacciones laterales de los filamentos. Este proceso de auto-ensamblado puede ser descrito mediante un mecanismo de agregación limitado por la difusión de partículas coloidales. La presencia de diferentes morfologías, sugiere que la geometría específica del 33-mer juega un rol importante en la organización del péptido en fibras. Incrementando la concentración se detectó la presencia de agregados pequeños y

filamentos, sin estructuras intermedias lo cual es característico de sistemas en los que la geometría de los contactos presenta una anisotropía que favorece la interacción de las nano-estructuras en un eje preferencial, lo cual es un mecanismo de organización típico de estructuras β -paralelas. Es así que los filamentos generados actúan como centros de nucleación secundaria, dirigiendo el crecimiento hacia la formación de fibras y placas. El conocimiento actual del comportamiento del 33-mer en solución y sobre mica se resume en el Esquema 6.



Esquema 6. Resumen de los resultados de la auto-organización del péptido 33-mer. Resultados obtenidos mediante AFM en mica, CD., ATR-FTIR, DLS-Correlación 3D y fluorescencia intrínseca realizados de manera concentración dependiente.

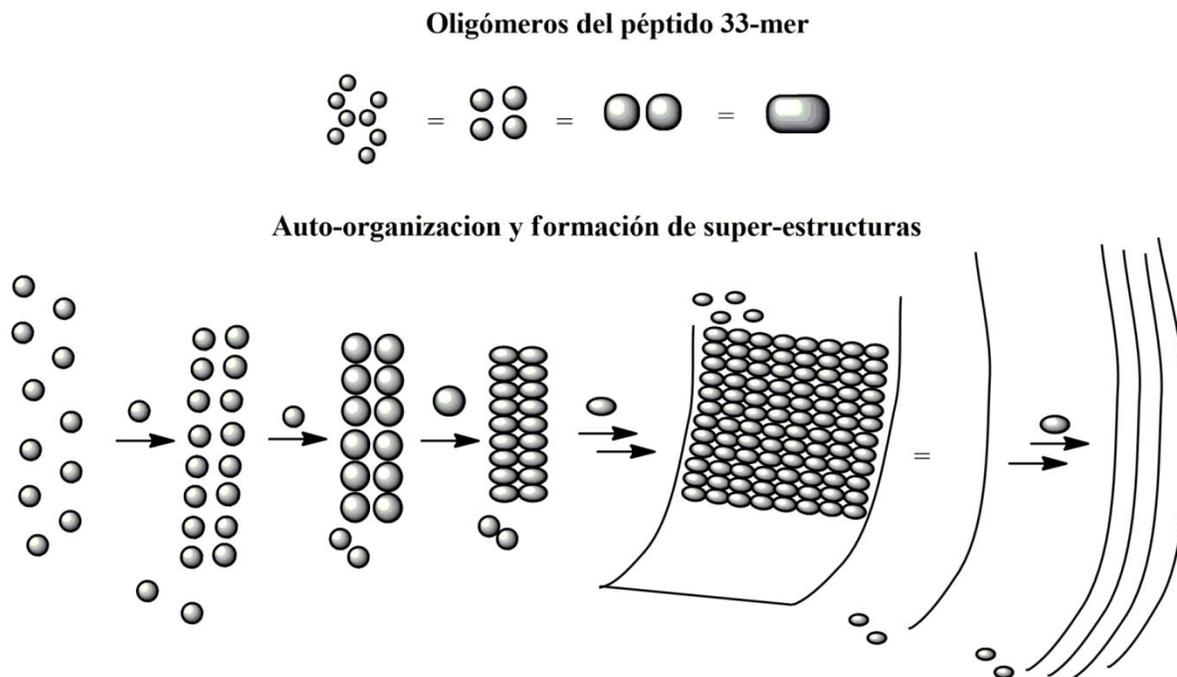
Finalmente se evaluó el proceso de auto-organización de 33-mer sobre dos superficies miméticas del lumen intestinal, como son el HOPG (intestino normal, impermeable) dióxido de silicio (aumento de la permeabilidad intestinal, como en el caso del intestino de pacientes celíacos). En el HOPG se detectaron nanoesferas y estructuras planas similares a las observadas en mica. Al realizar los lavados, se ha observado que el péptido 33-mer interactúa fuertemente con esta superficie. Debido a ello, es posible hipotetizar que en un medio hidrofóbico, como la superficie intestinal de un individuo sano, estos podrían permanecer y acumularse. Este hecho junto a la capacidad del péptido de presentar cambios conformacionales hacia una estructura β paralela a medida que se incrementa la concentración, podría ser un disparador de diversas patologías, en particular la enfermedad celíaca y la sensibilidad al gluten, al menos en estadios iniciales, antes del evento inflamatorio y al aumento de la permeabilidad.

En el caso de la superficie de dióxido de silicio, el auto-ensamblado del 33-mer fue dinámico y dependiente de las condiciones de deshidratación. En este caso se observó como el aumento en la velocidad y metodología de secado, influía en la morfología final de las estructuras observadas. A diferencia de la superficie mica y HOPG en la cuales el crecimiento de los agregados sigue claramente un mecanismo fractal DLA, en dióxido de silicio la agregación sigue un mecanismo que de percolación.

Finalmente a través de la técnica de congelado y secado por sublimación, fue posible obtener imágenes muy similares a las observadas sobre otras superficies y mediante otras microscopias, por lo que se hipotetiza que estas nano-estructuras se encuentran en solución.

Las imágenes obtenidas por el HIM, permitieron revelar las distintas estructuras cuaternarias que el 33-mer es capaz de formar, y esto permite proponer un orden jerárquico entre ellas, desde nano-estructuras esféricas aisladas a la formación de nano-cilindros, seguido por la asociación de estos nano-cilindros en forma lineal y finalmente la formación de fibras por asociación lateral de estas estructuras lineales. La existencia de estos agregados nano- cilíndricos como un motivo estructural

intermedio en el proceso de agregación, podría explicar el cambio de conformación del sistema desde PPII a una estructura del tipo β paralela observado.



Esquema 7. Hipótesis de la auto-organización del péptido 33-mer utilizando la información obtenida a partir de HIM:

Como conclusión final, es posible comentar que durante el desarrollo de este trabajo doctoral, se ha demostrado que el péptido 33-mer se encuentra en un equilibrio dinámico entre diferentes nano-estructuras, en solución acuosa y en superficies mimético de membranas, como la mica. Sobre una superficie mimética del lumen intestinal (HOPG) es capaz de auto-ensamblarse y permanecer interactuando sobre dicha superficie. Además, este posee una elevada ductilidad, ya que la morfología de los agregados puede cambiar de acuerdo a factores como las características de la superficie y condiciones tales como la deshidratación de la muestra.

Estas propiedades que presenta el péptido, podrían ser las responsables de permanencia y concentración en la mucosa intestinal, y su elevada resistencia a la degradación, detectado en experimentos de perfusión en murinos. Además, es posible hipotetizar que cuando se produce un

cambio o estrés en el lumen intestinal que lleve a un aumento de su permeabilidad, el péptido sería capaz de remodelarse estructural y morfológicamente e ingresar hacia la lámina propia. El ingreso del péptido en forma de agregados esféricos sería un disparador molecular, aún desconocido.

En estudios posteriores se debería realizar estudios de difracción de rayos x y SAXS para estudiar la estructura, morfología y características de los agregados en solución, para confirmar estos hallazgos. Además se propone realizar protocolo de cross-linking en el cual se fijen los agregados en solución, permitiendo luego aislar a los mismos y evaluarlos tanto sus propiedades estructurales como la respuesta inmunológica que estos producen.

Por lo expuesto, estos resultados de investigación básica podrían aportar información relevante a la investigación biomédica de las patologías relacionadas con el consumo de gluten.

Capítulo VI:

Materialles y Métodos

En esta tesis se estudiaron dos sistemas relacionados, la gliadina y su péptido 33-mer. Considerando las diferencias metodológicas entre ambos, se decidió tratar este capítulo en dos apartados, correspondientes a cada uno de los sistemas.

6.1. Métodos del Capítulo III.

6.1.1. Preparación de las muestras.

Se preparó una solución de gliadina (Sigma-Aldrich) de concentración 1mg / ml en HCl 0.01M, 10 mM de NaCl, pH 3.0. Es importante destacar que esta preparación comercial está constituida por una mezcla de gliadinas α , β , γ y ω . Con el objetivo de lograr la disolución de las proteínas, se la incubó por 12 horas en heladera. La solución obtenida fue centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, separándose un sobrenadante y un pellet. Se retiró el sobrenadante, el cual fue fraccionado en dos alícuotas. Una de ellas fue llevada a pH 7.0 con una concentración adecuada de NaOH, mientras que la otra no fue mantenida a pH 3.0.

Las soluciones a pH 3.0 y 7.0, fueron nuevamente centrifugadas a 14000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos fueron empleados en los estudios de caracterización desarrollados.

6.1.2. Espectroscopia UV-Visible.

Se adquirieron los espectros UV-Visibles de las soluciones de gliadina a pH 3.0 y 7.0, antes de la centrifugación, considerando a estas como soluciones totales, y a las obtenidas luego de aplicar este procedimiento. Estas últimas son las soluciones a estudiar, que serán nombradas en forma convencional como soluciones pH 3.0 y 7.0. Este estudio fue llevado a cabo mediante un barrido espectral entre 240 a 400 nm. Para esto se utilizó un espectrofotómetro V-630 BIO JASCO acoplado a un sistema de Peltier, que permite controlar la temperatura. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C. Se realizaron las derivadas segundas. Se calculó el índice de agregación, a través de la siguiente ecuación:

$$I.A. [\%] = \left(\frac{100 \times A_{350}}{A_{280} - A_{350}} \right). \quad (\text{Ecuación 2})$$

De acuerdo a este índice la escala usada fue la siguiente: a) entre 0-2: solución; b) entre 2-5; formación de algunos agregados; c) > 5: agregación elevada.

La determinación de la tirosina fue realizada mediante el método de *Bencze et. al.* Para esto, las soluciones de gliadina a pH 3.0 y 7.0 fueron tratadas con NaOH para lograr la concentración final de 0.1 M NaOH, pH 12.0. Los espectros UV-Vis fueron adquiridos y la relación entre ambos aminoácidos fue determinado mediante un análisis de regresión utilizando datos teóricos presentados por Bencze, et.al.¹¹⁴

6.1.3. SDS-PAGE.

Las fracciones de gliadina fueron identificadas mediante SDS-PAGE. Para ello 15 µg de proteína de las soluciones pH 3.0 y pH 7.0, fueron preparadas en buffer Laemmli (1.5 M Tris pH 6.8, 20% SDS, 10% 2-ME, 20% glicerol, 2% Azul de bromofenol). Las mismas fueron sembradas en un gel al 8% y la electroforesis fue llevada a cabo a 150 Volts, en un tiempo de 1.5 hs. Como marcador de peso molecular, fue empleado Fibrinógeno cuyas fracciones son A α de 65 Kda, B β de 55 Kda y γ de 47 Kda.²⁹⁰ Para realizar la identificación, de las proteínas, se utilizó una adaptación de una tinción estándar de plata²⁹¹.

6.1.4. Determinación del Potencial Z.

Se empleó un equipo Zetasizer Nano de Malvern. Mediante la aplicación de las ecuaciones adecuadas, se pudo determinar la carga superficial de las partículas en solución.

6.1.5. Microscopías electrónicas.

Las muestras para estas microscopías fueron realizadas por duplicado. Los controles correspondientes usando la solución sin péptido fueron preparados. En estos no se observaron ni fibras ni nano-esferas.

²⁹⁰ M. Okuda, Y. Uemura y N. Tatsumi, 'Quality control material for plasma fibrinogen test produced from purified human fibrinogen' (2003) 25(4) *J Autom Methods Manag Chem* 79.

²⁹¹ H. Blum, H. Beier y H. J. Gross, 'Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels' (Pt Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company) (1987) 8(2) *ELECTROPHORESIS* 93.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Para estas observaciones se utilizó un microscopio Philips CM 100 con un haz de 80kV. La muestra fue depositada sobre un grid cubierto con Formvar y teñida usando acetato de uranilo.

Microscopía Electrónica de Escaneo (SEM). Una alícuota de la solución de gliadina (20 μ L) fue depositada sobre una superficie de vidrio y se dejó secar en una caja de Petri. La muestra fue metalizada usando Au(0) utilizando un Sputter coater Pelco 91000 y observada mediante un equipo JSM-35 CF equipado con un detector de electrones secundarios (EVO 40). Todas las Imágenes fueron analizadas utilizando el software Image J.

6.1.6. Análisis fractal

El análisis de la fractalidad de las imágenes de SEM de la proteína gliadina a pH 3.0 fue realizada utilizando el método de conteo por caja. Esta es una medida de la complejidad del sistema. Es una regla escalar usada para comparar como el detalle de un patrón cambia cuando la escala varía desde una menor a una mayor resolución. Matemáticamente se expresa como:

$$N \propto \epsilon^{-Df} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde Df es la dimensión fractal, N es el número de piezas observadas en cada nueva resolución y ϵ es la escala usada para cada pieza.

El plugin Frac Lac del software Image J fue empleado para determinación Df . El método de conteo de caja se basa en colocar varios grids o cuadrados sobre la imagen, se decrece su tamaño sobre esta y se adquieren los datos para cada grid generado. El programa brinda una Df obtenida mediante la aplicación de varios algoritmos matemáticos.

Para el análisis de la imagen, estas fueron transformadas a un formato 8-bit y se utilizaron los valores de caja de 4, 8, 16, 32, 64 and 128 para cada imagen, con el objetivo de obtener la Dimensión fractal (Df) en toda la imagen.

6.1.7. Dicroísmo Circular.

Los espectros de CD de los sistemas de gliadina a pH 3.0 y pH 7.0 fueron adquiridos utilizando un espectrofotómetro Jasco J-810 CD usando un sistema Peltier a temperatura controlada. Se

realizaron 3 scans en el rango de 190-250 nm a 20°C. La velocidad de escaneo fue de 50 nm / min y se utilizaron cubetas de 1 mm de Cuarzo. Las soluciones de agua a pH 3.0 y 7.0 fueron medidas en las mismas condiciones y sustraídos al espectro de la gliadina. Un suavizado para reducir el ruido fue realizado utilizando un método binomial. Los gráficos fueron representados usando el programa OriginLab.

6.1.8. Estudio Bioinformático de la gliadina.

El estudio bioinformático de las secuencias de gliadina α gliadina (Código:Q9M4L6 de Uni Prot) y la α/β (Código: P18573 de Uni Prot) fue realizado mediante diferentes programas y servidores. La determinación de parámetros fisicoquímicos fue realizado utilizando Prot Param tool de ExPasy. El perfil Hidropático fue realizado mediante ProtScale de ExPasy, usando la escala de Kyte-Doolittle. Los perfiles de accesibilidad fueron realizando utilizando el servidor ACCpro. La predicción de la estructura secundaria y un modelo tridimensional de las mismas fue realizada utilizando el servidor I-TASSER. Por último, la predicción de cortes con enzimas se realizó utilizando la herramienta Peptide Cutter de ExPasy.

6.1.9. Espectroscopia de fluorescencia de estado estacionario.

Con la finalidad de conocer características estructurales de las proteínas presentes en las soluciones a ambos pHs, se procedió a realizar espectros de fluorescencia intrínseca. Para ello se seleccionó como fluoróforo al residuo triptófano. Las muestras fueron excitadas a una longitud de 295 nm, recolectando la emisión entre 300-450 nm, utilizando pasos o slits de excitación y de emisión de 5 nm respectivamente. Los espectros fueron obtenidos a 25°C, utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF. Para comparar ambas condiciones experimentales, se graficaron los espectros de fluorescencia normalizados.

6.1.10. Evaluación de la interacción del colorante Rojo Nilo.

Se estudió la capacidad de interacción del colorante Rojo Nilo con la proteína gliadina, a ambos pHs. Para ello, se realizó una titulación, mediante agregados sucesivos de colorante Rojo Nilo de concentración 0.5mM a cada solución respectivamente. Se registró el espectro de emisión del

colorante utilizando un Fluorímetro Shimadzu RF. La muestra fue excitada a 552 nm y a 590 nm y los espectros de emisión fueron adquiridos entre 580 a 700nm y a 600a 720 nm respectivamente. Se utilizaron slits de excitación y de emisión de 5 nm respectivamente. Los espectros fueron recolectados a 25°C, luego de 10 minutos del agregado del fluoróforo para permitir que el sistema llegue al equilibrio. De cada espectro fue normalizado y realizando los espectros de la derivada segunda utilizando el software OriginLab. Los espectros fueron suavizados usando el método de Savitzky-Golay usando una función de segundo orden utilizando 30 puntos del espectro.

Experimentos de titulación con Rojo Nilo fue llevado a cabo con el objetivo de obtener una constante de unión aparente global. A 2 ml de una solución de gliadina se le añadió 4 µde solución de Rojo Nilo (0.05 mM), y las muestras fueron incubadas durante 10 minutos. Las muestras fueron excitadas a 552 nm a 25°C y los espectros de emisión fueron adquiridos entre 560 and 700 nm. La intensidad de fluorescencia fue corregida por efecto de filtro interno, que se debe a la capacidad de la sonda de absorber a la longitud de onda de excitación. Esta corrección fue realizada multiplicando la fluorescencia obtenida por el factor $10^{(A_{em}+A_{\lambda_{exc}}/2)}$. Para aplicar este, se midieron los espectros de absorción del Rojo Nilo a varias concentraciones a pH 3.0 y 7.0 a 10 mM NaCl, usando un paso óptico de 10 nm. Las correspondientes curvas controles en agua fueron realizadas tanto para las medidas de fluorescencia como absorción. La fluorescencia no específica fue sustraída del total de intensidad de fluorescencia del sistema de gliadina en cada pH y concentración de Rojo Nilo. Los valores de fluorescencia obtenidos se corresponden a la fluorescencia específica. Teniendo en cuenta la forma de la curva de titulación, la constante de disociación (Kd) fue obtenida usando la regresión de Hill que provee el software OriginLab.

6.1.11. Liberación de la sonda Rojo Nilo.

La solución de gliadina a pH 3.0 fue preparada tal como se describió anteriormente. 4 µl de Rojo Nilo fueron añadidos a 2ml de solución de gliadina, hasta alcanzar la concentración final de 0.6 µM final. Luego de cada agregado, la muestra se incubó durante 10 minutos. Dos alícuotas fueron separadas y una de ellas fue llevada a pH 7.0, donde se produjo una separación de fases, por lo que

se realizó una centrifugación a 14.000 rpm, obteniendo una suspensión clara. Los espectros de Rojo Nilo en ambas condiciones fueron adquiridos usando un Shimadzu RFPC. La excitación se realizó a 552 nm usando slits de excitación y de emisión de 3 y 5 nm, respectivamente. Soluciones de agua con las Rojo Nilo a los correspondientes pHs fueron utilizadas como control y procesadas de igual manera que la muestra. La fluorescencia no específica fue sustraída en cada caso.

6.2. Materiales y Métodos del Capítulo IV: Estudio del péptido 33-mer de la proteína α -2 gliadina.

6.2.1. Sección I: Elucidación de la Estructura Secundaria del péptido 33-mer y su capacidad de auto-organizarse

Como se ha comentado en el desarrollo de este capítulo, el péptido utilizado en estos experimentos fue adquirido comercialmente a BioChem Shangai, en forma liofilizada con una pureza > 95%. Se utilizó una metodología Fmoc. La pureza y la integridad del mismo fueron determinadas antes y después de los experimentos con el objetivo asegurar la no modificación de la muestra durante el estudio. Un análisis de HPLC- Fase reversa fue realizado con un equipo Venusil XBP C18 250 x 4.6. Un gradiente de solventes binario A (CH_3CN 0.1 % TFA) y B (H_2O 0.1 %) fue empleados, con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. La inyección fue de 10 μL . Los picos de HPLC fueron monitoreados por absorbancia UV a $\lambda=220$ nm y su identidad confirmada por Espectrometría de Masas. El tiempos de retención fue de 12.715 min obtenido en las siguientes condiciones experimentales: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ con 0.1% TFA, 28- 100%A 25 min. HPLC-MS: m/z 1958.61 ($\text{M}^+ + 2\text{H}$)²⁺, 1305.16 ($\text{M}^+ + 3\text{H}$)³⁺. La determinación precisa de la masa fue realizada mediante ESI (ESI nano-MS) masa del ion: 978.26472 (desviación 0.10), masa calculada para el ión: 978.26463 (desviación 0.11); Formula Molecular($\text{C}_{190}\text{H}_{273}\text{N}_{43}\text{O}_{47}$) H_4^{+4} . Los cromatogramas obtenidos y los correspondientes espectros de masas se presentan en el Apéndice.

6.2.1.1. Espectroscopia UV-Visible.

Se adquirieron los espectros UV-Visibles de las soluciones del péptido 33-mer en agua a las distintas concentraciones (32-583 μM). Ese realizó un barrido espectral entre 240 a 400 nm. Para

esto se utilizó un espectrofotómetro V-630 BIO JASCO acoplado a un sistema de Peltier, que permite controlar la temperatura. Las medidas se realizaron a 25°C. Se realizaron las derivadas segundas, aplicando un suavizado usando una ecuación de Savitzky-Golay. Las mismas fueron fiteadas mediante una función cúbica usando un filtro de 9 puntos y se superponiendo de 99 puntos.

6.2.1.2. Dicroísmo Circular.

Los espectros de Dicroísmo Circular fueron llevados a cabo en un espectrómetro Jasco J-810 CD con un sistema Peltier para controlar la temperatura. Los espectros fueron llevados a cabo realizando tres repeticiones en un rango desde 190–250 nm, a las temperaturas seleccionadas (desde -10 °C a 37°C con una incubación de 5 minutos). La velocidad de adquisición fue de 50 nm/min y fueron usadas cubetas de 1 y 0.1 mm de paso óptico. Los correspondientes controles de agua y buffer fueron realizados. Para reducir la relación señal ruido se aplicó un suavizado utilizando la ecuación de Savitzky-Golay. Los datos fueron presentados como el promedio de la elipticidad molar por residuo en, expresado en $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-2}$. Las muestras fueron monitoreadas a distintos tiempos, observándose los mismos resultados.

6.2.1.3. Estudio Bioinformático del péptido 33-mer. Evaluación del péptido mediante dinámica molecular y determinación de la distribución de cargas parciales.

El estudio bioinformático se realizó utilizando Prot Param tool de ExPasy.

Para simulaciones de dinámica molecular, el modelo inicial del péptido fue realizado utilizando el software Abalone, adicionando cada aminoácido de a uno en una estructura PPII. ($\varphi = -75^\circ$, $\psi = 160^\circ$). El modelo electrostático fue realizado usando un campo de fuerza PARSE, implementado por el software PDB2PQR. Todas las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas con GROMACS usando el campo de fuerza OPL/AA/L. Estos fueron corridos usando agua explícita con el modelo SPC. El monómero y dímero del péptido fueron solvatados en una caja cúbica de 15 nm x 15 nm x 15 nm. Las condiciones de periódicas límites fueron aplicadas y un cutt off de 0.9 nm fue usado para las interacciones de Leonard Jones. Una restricción en todos los enlaces fue utilizada. Las

interacciones electrostáticas de largo alcance fueron tratadas usando el método de resumen de Particle Mesh Ewald con un espaciamiento de Fourier de 0.12 y un cuarto orden de interpolación. Todas las simulaciones fueron realizadas en el conjunto NVT a 310 K. El péptido y el solvente fueron acoplados a un mismo batch de referencia de temperatura con un tiempo constante de 2 ps usando el método de Berendsen . Un paso de integración de 2 fs fue usado y las coordenadas fueron guardadas cada 10 ps.

Con un solo péptido una simulación de 5 ns fue corrida en agua explícita con el objetivo de obtener la estructura de menor energía. Luego un dímero fue realizado con dos péptidos relajados, considerando complementariedad de cargas, minimizando la energía. Luego se llevó a cabo una simulación de 5 ns que mostró una estructura estable. El modelo final fue estructuralmente validado y mantuvo un elevado contenido de estructura PPII.

6.2.1.4. Microscopía Electrónica.

Las muestras para estas microscopías fueron realizadas por duplicado. Los controles correspondientes usando la solución sin péptido fueron llevados a cabo. En estos no se observaron fibras ni nano-esferas. Las muestras presentaron una buena reproducibilidad en un período de tiempo desde 1 hora a 5 meses. Las imágenes fueron analizadas utilizando Image J.

Microscopía Electrónica de Escaneo (SEM). Alícuotas de péptido 33-mer (en agua y en buffer 1mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato y 15 mM NaCl a pH 7.0) se depositaron en grids de cobre (200 mesh) cubiertos por Formvar. La muestra fue teñida negativamente acetato de uranilo al 2% en agua. Luego de dos minutos de permitir la interacción de la muestra, el exceso de líquido fue removido y dejado secar. Las observaciones se llevaron a cabo en un Microscopio JEOL 100CX II, operando a 100 kV.

Microscopía Electrónica de Escaneo (SEM). Alícuotas del péptido 33-mer (en agua y en buffer 1mM citrato de sodio, 1 mM borato de sodio, 1 mM fosfato y 15 mM NaCl a pH 7.0) fueron depositadas sobre una superficie de vidrio y mica respetivamente. Luego de permitir que la muestra interactúe por 5 minutos, se removió el exceso de líquido y las muestras se dejaron secar. Luego las

muestras fueron metalizadas usando Au (0) usando un equipo de deposición del metal sputter Pelco 91000 y fueron observadas usando un microscopio JSM-35 CF, equipado con un detector de electrones secundarios (EVO 40).

6.2.2. Sección II: Caracterización de los oligómeros del péptido 33-mer.

6.2.2.1. DLS-Correlación 3D.

Los experimentos de DLS fueron llevados a cabo usando un Espectrómetro DLS -Correlador 3D (LS Instruments, Fribourg, Switzerland). La fuente de luz usada fue un laser de He-Ne laser que opera en las longitudes de onda de 632.8 nm con un poder de salida de 30 mW. Los experimentos de dispersión fueron llevados a cabo en un rango angular de $40^\circ > \theta > 110^\circ$. Las muestras fueron termostalizadas previamente por un periodo de 20 minutos con el objetivo de lograr la temperatura deseada. Para obtener una línea de base bien definida, de las funciones de correlación, las cubetas fueron acumuladas por un período de 4 a 5 hs para cada función de correlación. Para evitar la presencia de agregados preformados, las muestras fueron filtradas antes de las medidas. Debido a ello, todas las contribuciones corresponden a partículas de diámetro mayor a 220 nm.

Debido a las fluctuaciones causadas por el movimiento browniano de las partículas, la dispersión de la luz es una cantidad fluctuante. Estas fluctuaciones en intensidad (I), pueden ser analizadas como una función de correlación. La función de auto-correlación del campo eléctrico normalizado g_1 contiene información acerca de la dinámica del sistema que produce dispersión, en el caso de soluciones micelares esta se describe por la siguiente ecuación.

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E_s^*(t) E_s(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde E_s = Dispersión del campo eléctrico E_s^* = conjugado complejo de E_s y t = tiempo. En el caso de muestras ideales mono-dispersas $g_1(\tau)$, se representa como una función mono-exponencial.

$$g_1(\tau) = \exp(-\Gamma\tau) \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde $\Gamma = D q^2$, con D siendo el coeficiente de difusión y q el vector de dispersión. Normalmente las muestras son polidispersas y el decaimiento de la función de correlación es descripta mediante una suma de funciones exponenciales.

$$g_1(\tau) = \int_0^{+\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad (\text{Ecuación 5})$$

$G(\Gamma)$ es la función de distribución de la tasa de los coeficientes de relajación. El análisis de la ecuación 5, puede realizarse diferentes métodos. Uno de los más comúnmente empleados es el método que emplea el programa CONTIN.

A partir del valor medio de la tasa de relajación Γ , se puede obtener el coeficiente de difusión \bar{D} :

$$\bar{D} = \bar{\Gamma} q^2 \quad (\text{Ecuación 6})$$

El vector de dispersión está dado por la ecuación de Stokes-Einstein: T

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde λ es la longitud de onda del laser incidente, n el índice de refracción del medio y θ es el ángulo de dispersión. Conociendo el valor de D , es posible obtener el radio hidrodinámico de las muestras en solución. El coeficiente de difusión translacional de partículas interactuando en soluciones diluidas, debería ser directamente proporcional a la fracción de volumen ϕ

$$D_0 = D [1 + \alpha\phi] \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde, α es coeficiente de virial y D_0 el coeficiente de auto difusión de la ecuación (Ecuación 8). Este último puede ser obtenido mediante la extrapolación a cero de la fracción de volumen.

En este caso, las medidas de intensidad de las funciones de auto-correlación fueron convertidas a sus correspondientes campo de funciones de correlación y analizadas usando el software CONTIN de S. Provencher.¹⁸⁷ Este provee la distribución de la tasa de intensidad ponderada de las estructuras presentes en la muestra. Estas pueden ser convertidas en la distribución de los coeficientes de difusión aparente. Usando la ecuación de Stokes-Einstein, los radios hidrodinámicos equivalentes a esferas pudieron ser calculados.

Debido al comportamiento complejo de agregación que presenta el péptido 33-mer, para

simplificar los resultados, los radios hidrodinámicos de cada corrida fueron agrupados en tres categorías: ≤ 100 , 100-1000 y \geq of 1000 nm.

6.2.2.2. Espectroscopia de infrarrojo (ATR-FTIR).

Los espectros de IR fueron tomados a una temperatura constante de 21°C en un espectrofotómetro Equinox 55 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) equipado con un accesorio de reflectancia Golden Jate (Seca, Slough, United Kingdom) y un detector de cadmio-mercurio telurito en nitrógeno líquido. El elemento de reflexión interna es un cristal de diamante de (2 × 2 mm) con una apertura de 45° que permite obtener un solo campo de reflexión. Cada espectro fue adquirido con el software *OPUS* y representa un promedio de 128 repeticiones (con el objetivo de reducir la relación señal ruido). Cada espectro fue obtenido con una resolución de 2 cm⁻¹ y entre las medidas se realizó el purgado de la muestra con aire seco. Las muestras fueron preparadas colocando 2 µl (~10 ng) del péptido 33-mer en el cristal de diamante sobre la superficie y se secó la muestra bajo flujo de nitrógeno, formándose un film delgado sobre la superficie. La deuteración de la muestra fue realizada dejando en contacto la muestra por 45 minutos con nitrógeno saturado con ²H₂O.

Se utilizó *KINETICS* de Matlab para los análisis espectrales. Los datos de ATR-FTIR fueron procesados sustrayendo las señales de vapor de agua que contribuyen en la región 1562-1555 cm⁻¹, siendo este un pico referencial. Los espectros fueron corregidos mediante la línea de base, (1792, 1729, 1575 and 1484 cm⁻¹) y suavizados con una resolución de 4 cm⁻¹ y se aplicó la Transformada de Fourier mediante una línea de a Gaussian, en la región Amida I (1729-1575 cm⁻¹). Las intensidades espectrales fueron re-escaladas en la región amida I para normalizar el contenido de péptido entre las muestras. Finalmente todos los espectros fueron de-convolucionados utilizando el factor de deconvolución de Lorentz, con un ancho total igual en la octava parte del pico de 30 cm⁻¹ y un factor de Gaussian con un ancho total en la mitad de la altura de 15 cm⁻¹ para obtener un incremento de la resolución con un factor de 2. La deconvolución aumenta la resolución de los espectros en la Amida I que es más sensible a la estructura secundaria de las proteínas.

6.2.2.3. Fluorescencia Intrínseca.

6.2.2.3.a. Anisotropía de estado estacionario.

Los espectros de fluorescencia y la anisotropía de estado estacionario fueron adquiridos utilizando un espectrofluorímetro Fluoromax-P (Glasgow, UK) de Horiba Jobin-Yvon equipado con polarizadores. Para cada espectro, las muestras fueron excitadas a 280 nm, y los espectros fueron colectados desde 290 a 400 nm, utilizando slits de 5nm tanto para la excitación como la emisión. Todas determinaciones fueron llevadas a 25°C.

La anisotropía de estado estacionario $\langle r \rangle$ fue obtenida excitando las muestras a 280nm y la señal de fluorescencia fue colectada a 308nm. La anisotropía fue determinada de acuerdo a la ecuación (Ecuación 9)

$$\langle r \rangle = \frac{I_{vv} - G I_{vh}}{I_{vv} + 2 G I_{hh}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde G es una constante (I_{hv}/I_{hh}) que corrige la sensibilidad diferencial del sistema.

6.2.2.3.b. Fluorescencia resulta en el tiempo.

Las mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo fueron obtenidas mediante la técnica de conteo de correlación usando un solo fotón. Para ello se usó un fluorómetro SLM-AMINCO equipado con un laser de diodos de pulso PDL800-B usando una longitud de excitación de 282 nm. El ancho del pulso era de 600 ps con una repetición de 5 MHz y un módulo Pico Quant de detección. Un filtro de vidrio fue usado en el canal de emisión del haz, con una longitud de corte en 283 nm, permitiendo elegir la adecuada radiación para la excitación. Para estas medidas se empleó el software Pico Harp 300. La función de respuesta de impulso (FRI) fue obtenida a la longitud de excitación utilizando una solución de glucógeno. Los decaimientos de fluorescencia para determinar, los tiempos de vida fueron obtenidos en condiciones de ángulo mágico (polarizadores: excitación 0, emisión 54.7), para eliminar los efectos de polarización. Para ajustar las curvas, se aplicó un modelo de ajuste exponencial, aplicando la siguiente ecuación (Ecuación 10)

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-(t-t')/t_i} dt \quad (\text{Ecuación 10})$$

Para determinar los decaimientos de anisotropía fueron obtenidos en todas las configuraciones de los polarizadores. (paralelos y verticales). Los datos fueron analizados usando el software Fluofit de PicoQuant. El análisis de re-convolución de los decaimientos de anisotropía fue realizado asumiendo un modelo exponencial. (Ecuación 11).

$$r(t) = R_{INF} + \sum_{i=1}^n R_i e^{-t/\phi} \quad (\text{Ecuación 11})$$

La deconvolución de los decaimientos y el ajuste se realiza utilizando el método de mínimos cuadrados no lineal, provisto por el software FluoFit. En este caso se determina cuan cerca se encuentran los valores de decaimientos propuestos por el modelo de ajuste a los obtenidos experimentalmente. Esta diferencia es determinada mediante el valor de χ^2 . Es así que a este parámetro se lo define como el que determina la bondad del ajuste. Si este es cercano a 1, el ajuste fue adecuado. Normalmente los valores obtenidos se encuentran entre 0.8-1.2.

6.2.3. Sección III: Elucidación del mecanismo de auto-organización del péptido 33-mer en la interfase aire/mica mediante Microscopía de Fuerza Atómica

6.2.3.1. Microscopía de fuerza Atómica.

AFM en modo contacto (Nanoscope V; Bruker, Santa Barbara, CA) fue utilizado para caracterizar el proceso de oligomerización del péptido 33-mer. para la misma se utilizaron tips de nitruro de Silicio (constante de resorte 0.12 N/m). Soluciones acuosas del péptido 33-mer de la proteína gliadina en concentraciones 6, 60, 250 and 600 μM fueron depositadas en una superficie de mica. Las mismas se dejaron interactuar por unos minutos y fueron secadas bajo un flujo de nitrógeno. Se adquirieron las imágenes topográficas y de error de deflexión. La altura y el ancho a la mitad de la altura máxima (FMWH) de las arquitecturas observadas fueron determinadas usando la herramienta de corte por secciones del software Nanoscope Analysis 1.1 software (Bruker). El FMWH fue seleccionado para compensar las distorsiones introducidas por la geometría del tip. El área cubierta fue determinada mediante el software Image J.

Utilizando este tipo de microscopía, el radio, volumen y la masa molecular de las proteínas

ordenadas de manera globular puede ser determinada. Teniendo en cuenta las características de las imágenes obtenidas, se decidió calcular el radio de los oligómeros del péptido 33-mer con el objetivo de comparar estos resultados con los obtenidos mediante DLS: El radio de nanoesferas de proteína no puede ser determinado directamente debido a que para la observación se necesita utilizar un tip, que actúa como sonda, que introduce una distorsión. Debido a ello, es necesario obtener primero el volumen de las esferas utilizando la ecuación de *Pietrasanta et al* (Ecuación 12).

$$V_s = \pi(h/6)[3r^2 + h^2] \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde (h) es la altura media de las esferas, (r) es el radio estimado como el FMWH. Este último minimiza los errores de medida debido al uso de un tip cónico, evitándose así una sobreestimación del ancho de las esferas.

A partir de esta ecuación el radio de las esferas fue estimado utilizando la ecuación de volumen de las mismas. (Ecuación 13).

$$V_s = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad (\text{Ecuación 13})$$

Por otro lado, el volumen medio fue utilizado para calcular el número de moléculas que componen a los oligómeros. Para ello la masa de estos fue obtenida empleando la ecuación de Tanford (Ecuación 14).

$$V = \frac{M}{N}(V_2 + \delta V_1) \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde M es la masa molecular del oligómero, N el número de avogadro, V_2 el volumen específico parcial, calculado a partir de estimaciones de difusión molecular (para esto un valor promedio de $0.73\text{cm}^3/\text{g}$ fue calculado para proteínas globulares), V_1 es el volumen de solvente puro que se le asigna un valor de $1\text{cm}^3/\text{g}$ y δ es la solvatación específica calculada media de los experimentos de intercambio isotópico de ovoalbúmina, usando H_2O^{18} . Este valor se estima que es igual a todas las proteínas.

Dividiendo la masa obtenida de los oligómeros por el peso molecular, (Ecuación 14) por el de una sola molécula del péptido (3917g/mol), el número promedio de moléculas presentes en las esferas puede ser estimado.

En el caso de la muestra realizada en buffer, el péptido 33-mer fue diluido a la concentración final de 60 μ M, HEPES 20 mM, pH 7.4. Las medidas de AFM fueron realizadas en modo tapping. El equipo (Nanoscope V; Bruker, Santa Barbara, CA) fue utilizado para caracterizar el proceso de oligomerización del péptido 33-mer. Para esta medición se utilizaron tips de Silicio (constante de resorte 42 N/m y una constante de resonancia de 320 K Hz) y se adquirieron las imágenes de altura y amplificación.

6.2.3.2. Análisis fractal.

Ver apartado 9.1.6

6.2.4. Sección IV:

6.2.4.1. Preparación de las muestras.

La superficie de HOPG fue limpiada mediante exfoliación antes de su utilización. Los wafers de Silicio empleados en la observación fueron sometidos a un proceso de limpieza colocándolos en alcohol absoluto y sometido a sonicación por un tiempo de 15 minutos. Luego la superficie se lavó con agua Milli Q y se dejó secar en una caja de Petri, evitando el ingreso de partículas.

Las muestras preparadas mediante distintas metodologías.

a) *Secado a temperatura ambiente.* 5-10 μ l de muestra fueron depositadas sobre la superficie (wafers de Silicio, grids de cobre (200Mesh) cubierto con SiO₂ (SPI Supplies) y HOPG). Las muestras se dejaron secar en una caja de petri para evitar la contaminación. En el caso de las analizadas por AFM estas fueron colocadas bajo un flujo de nitrógeno.

b) *Secado por capilaridad*: 5-10 μl de muestra fueron depositadas sobre la superficie (wafers de Silicio, grids de cobre (200 Mesh) cubierto con SiO_2 (SPI Supplies)). El exceso de solvente fue retirado por capilaridad, utilizando un papel absorbente.

c) *Deposición y lavados*: 5-10 μl de muestra fueron depositadas sobre la superficie (wafers de Silicio, y HOPG). La muestra fue dejada interactuar por 5-10 minutos sobre la superficie. A continuación se realizaron 5 lavados con agua Milli Q y el exceso de agua mediante capilaridad y secados sobre flujo de nitrógeno en una caja de Petri.

d) *Secado por sublimación*: Una alícuota de (5 μL) fue depositada en un grid de cobre (200Mesh) cubierto con SiO_2 (SPI Supplies). A continuación se realizó un proceso de fijado por congelamiento utilizando nitrógeno líquido (-78°C) y luego secado mediante vacío (liofilizador).

e) *Preparación de las muestras mediante spin-coating*: se depositó la muestra sobre la superficie de silicio y se colocó en el equipo de spin coating y se aplicó una velocidad de 1000 rpm por 4 minutos, obteniéndose una muestra seca. Luego se realizó una tinción con ácido fosfotungsténico.

6.2.4.2. Microscopía de Fuerza atómica.

En este caso, las diferentes mediciones realizadas para las distintas muestras fueron realizadas en modo tapping y el equipo (Nanoscope V; Bruker, Santa Barbara, CA) fue utilizado. Para esta medición se utilizaron tips de Silicio (constante de resorte 42 N/m y una constante de resonancia de 320 K Hz) y se adquirieron las imágenes de altura y amplificación.

6.2.4.3. Microscopías electrónica.

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM): Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio Philips CM 100, con un haz de 80 kV.

Microscopías de Escaneo-Transmisión (STEM): Estas muestras fueron analizadas usando un Microscopio LEO Gemini 1530, detector BF- and ADF.

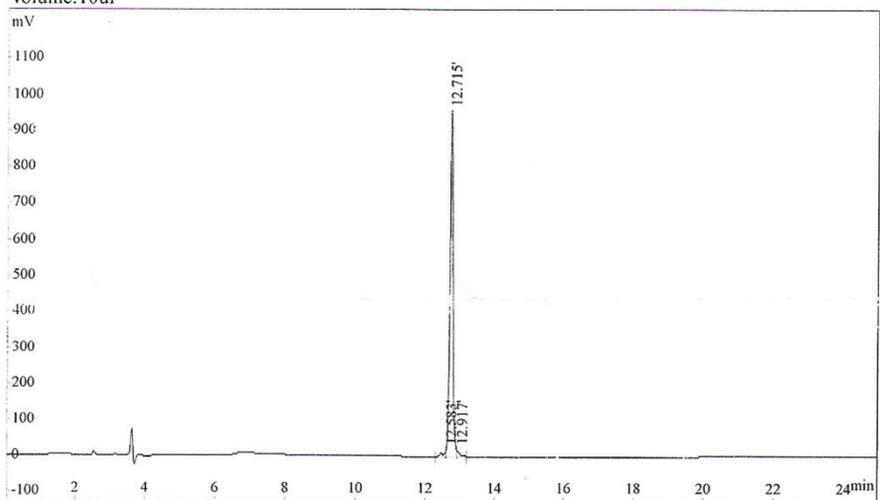
6.2.4.4. Microscopio de iones Helio.

La microscopia de Helio fue realizada utilizando un microscopio Carl Zeiss Orion Plus. El haz de He^+ fue operado a 30.0 kV, con un voltaje de aceleración de una corriente de 8.2-8.4 pA y un tiempo de residencia 30.0 μs . La distancia de trabajo fue de 10.8 mm. Los electrones secundarios fueron colectados mediante un detector Everhart Thornley

Apéndice

REPORT

Product Name:LF-33
 Instrument No: 0200023
 Lot No :P120614-MJ057624
 Analyst :ZJM
 Column :4.6*250mm, Kromasil C18-5
 Solvent A :0.1%Trifluoroacetic in 100% Acetonirile
 Solvent B :0.1%Trifluoroacetic in 100% Water
 Gradient : A B
 0.01min 10% 90%
 25min 100% 0%
 25.1min 100% 0%
 30min Stop
 Flow rate :1.0ml/min
 Wavelength :220nm
 Volume:10ul



Rank	Time	Conc.	Area	Height
1	12.583	2.184	140418	18665
2	12.715	96.25	6187315	965480
3	12.917	1.564	100526	17175
Total		100	6428259	1001320

Figura 80. Reporte de HPLC del péptido 33-mer de la proteína gliadina El tiempos de retención fue de 12.715 min obtenido en las siguientes condiciones experimentales: CH₃CN /H₂O con 0.1% TFA, 28- 100%A 25 min.

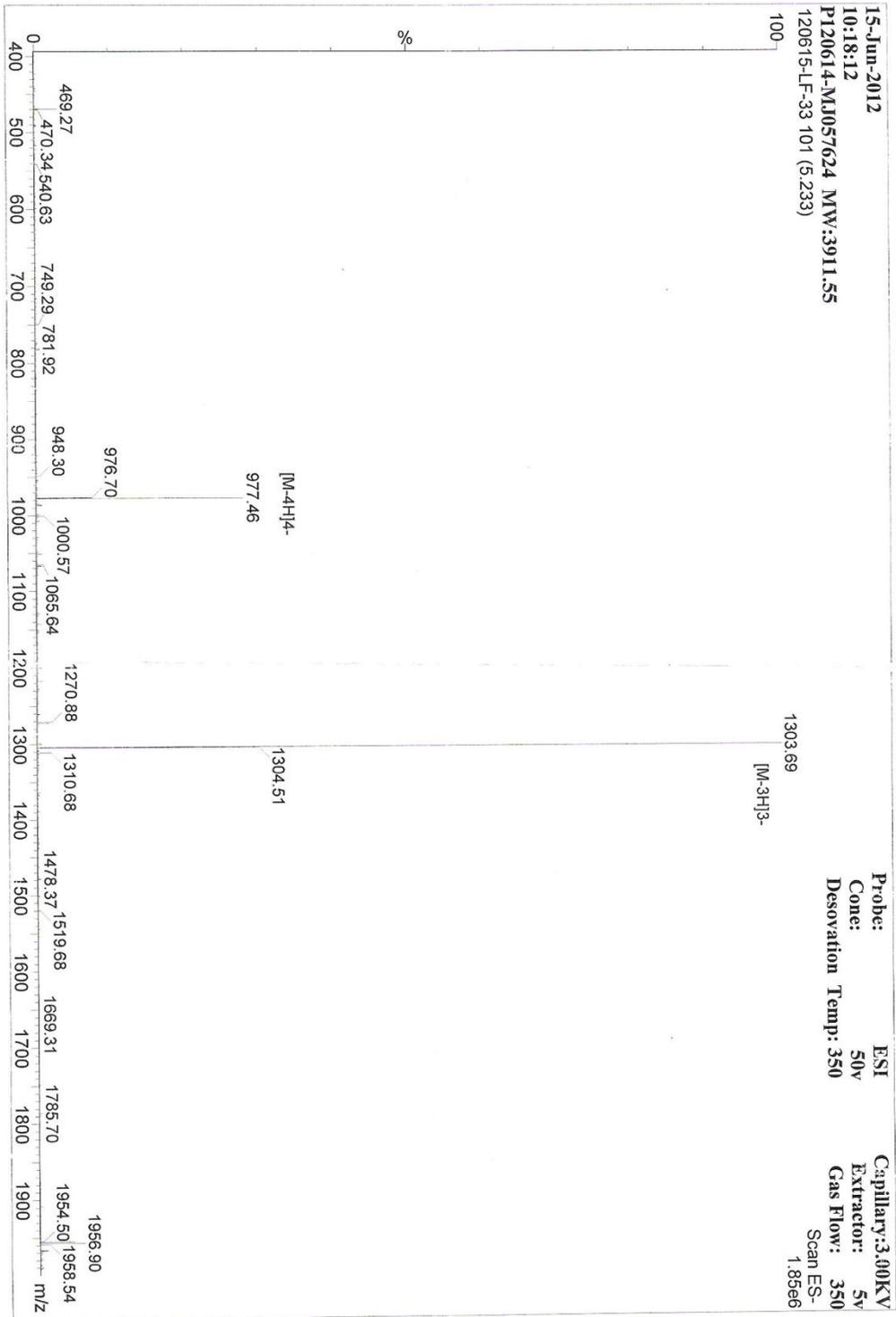


Figura 81. Espectro de HPLC-Masas ESI del péptido 33-mer de la proteína gliadina. Iones: m/z 1958.61 $(M+ + 2H)^{2+}$, 1305.16 $(M+ + 3H)^{3+}$

Universität Bielefeld

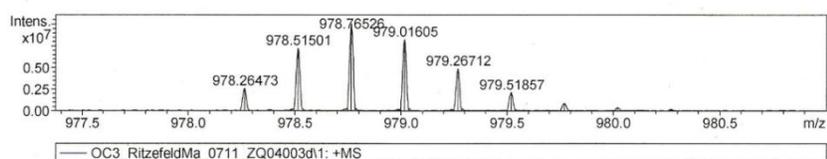
Fakultät für Chemie - Organische Chemie I
Abteilung Massenspektrometrie F02-217

Universitätsstraße 25
33501 Bielefeld

☎ 0521 - 106-2108

Accurate Mass Measurement

Sample Name : ZQO4003d
Sample Supplier : Ritzefeld, Markus **Group :** OC3
Sample Filename : S:\APEX\aktuell\OC3\OC3_RitzefeldMa_0711_ZQ04003d\1
Instrument : Bruker FT-ICR : APEX III (7.0 T)
Ionisation Method : ESI
Matching Method : HR with external calibration
Resolution : > 20000
Substance Inlet : ESI nano - Spray Emitter



Measured Ion Mass(es) : 978,26473 **Deviation [mmu] :** 0,10

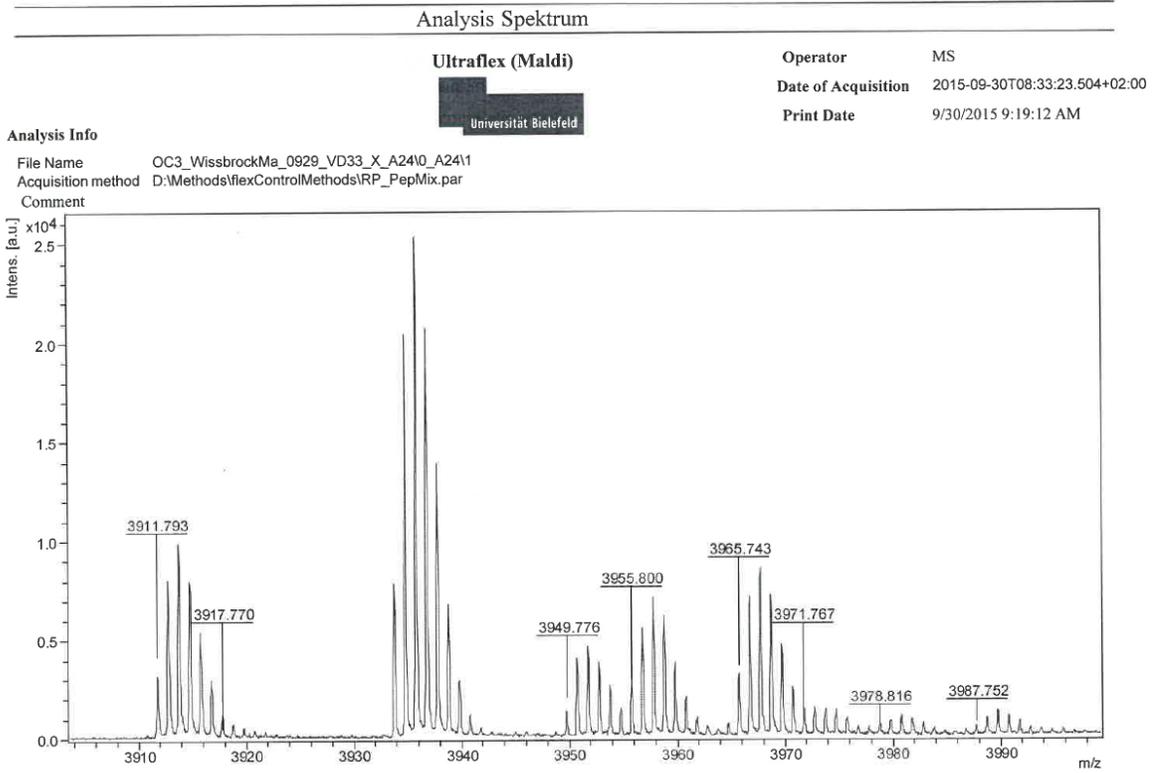
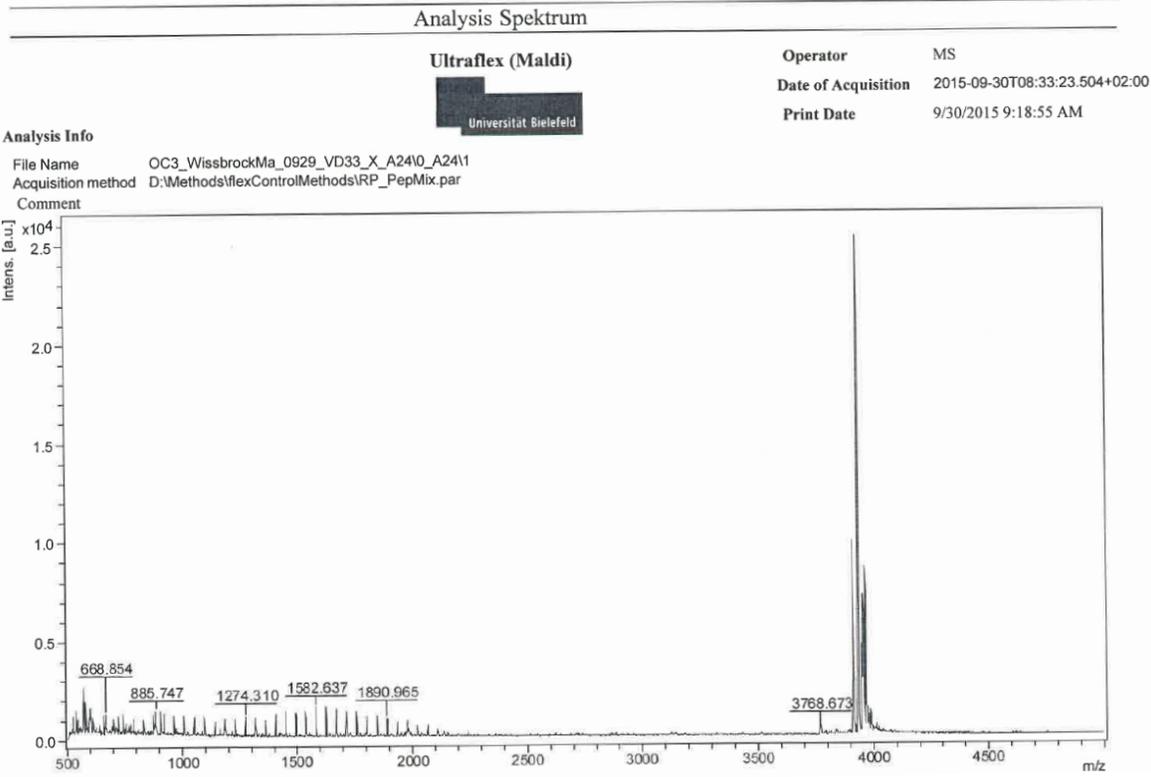
Calculated Ion Mass(es) : 978,26463 **Deviation [ppm] :** 0,11

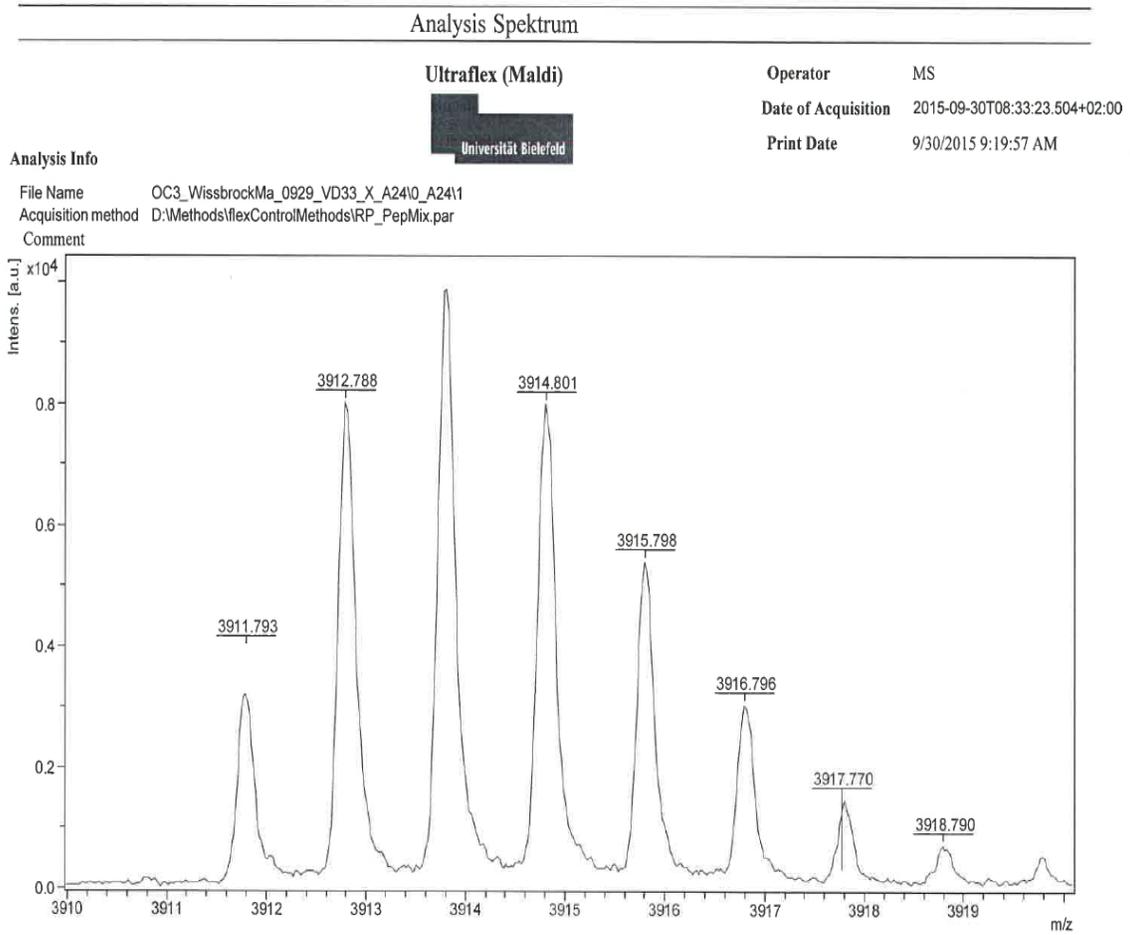
Potential Molecular Formula : (C190H273N43O47)H4+4

Comment : Measured and calculated masses are true ion masses, taking into account the mass of lost (or added) electrons.

Bielefeld, 07.09.2012

Figura 82. Determinación Precisa de Masas. Masa del ion: 978.26472 (desviación 0.10), masa calculada para el ión: 978.26463 (desviación 0.11); Formula Molecular (C190H273N43O47) H4⁺⁴.





Figuras 83. Maldi-Tof del péptido 33-mer, masa del ión molecular 3918.79Da.