

ÍNDICE ANEXOS

Índice Anexos	1
Anexo 1.....	3
Capítulo 1: Información de Consulta	3
2.1. Aminoácidos estándar	3
2.2. Fichas de seguridad	4
2.2.1. Desoxirribonucleasa (DNAsa) I.....	4
2.2.2. Albúmina de suero bovino (BSA)	9
2.2.3. Ácido Clorhídrico (HCl) 37%	13
2.2.4. Hidróxido de sodio (NaOH)	19
Anexo 2 (PFC 1)	25
Capítulo 1: Introducción.....	25
1.1. Interacciones Neuropéptido-GPCR: Determinantes Estructurales	25
1.1.1. La superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR)	25
1.1.2. Las taquiquininas y sus receptores específicos.....	27
1.1.3. Beneficios de la utilización de quimeras receptor-bacteriorrodopsina y receptor-rodopsina.....	27
1.1.4. Sistemas alternativos de estudio: receptores de neurotensina y de melanocortina.	29
1.2. La permeasa de Melibiosa	29
1.2.1. El mecanismo de co-transporte catión-azúcar en la permeasa de melibiosa: estado actual y perspectivas.	31
Capítulo 2: Objetivos	33
2.3. Objetivos de las quimeras NK1/BR y NK1/Rho.	34
2.4. Objetivos referentes a la permeasa de melibiosa	34
Capítulo 3: Objetivos Formativos.....	35
Capítulo 4: Metodología.....	37
4.1. Métodos de preparación de material biológico	37
4.1.1. Preparación de membrana púrpura (bacteriorrodopsina).....	37
4.1.2. Preparación de la rodopsina y la transducina.	37
4.1.3. Incorporación de bacteriorrodopsina en liposomas y medida del bombeo de protones.	38
4.1.4. Mutagénesis dirigida	38

4.1.5. Obtención, purificación y caracterización de la rodopsina salvaje y de las quimeras.	39
4.1.6. Preparación de la permeasa de melibiosa.....	40
4.1.7. Mutagénesis dirigida de la permeasa de melibiosa.	41
4.2. Métodos espectroscópicos.....	41
4.2.1. Espectroscopia de infrarrojo a transformada de Fourier.	41
4.2.2. Espectroscopia de fluorescencia.....	41
4.2.3. Espectrofotometría UV-Vis.	44
Capítulo 5: Beneficios del Proyecto	49
Capítulo 6: Bibliografía	51

ANEXO 1

CAPÍTULO 1: INFORMACIÓN DE CONSULTA

2.1. Aminoácidos estándar

A los veinte aminoácidos de las proteínas se les conoce como estándares, primarios o normales, para diferenciarlos de los que se encuentran modificados en proteínas, tras su síntesis, o de otros aminoácidos procedentes de organismos vivos, pero no de proteínas. En todos los aminoácidos estándar, menos en la glicina, el carbono alfa es asimétrico. A los aminoácidos estándar se les conoce de forma abreviada con tres letras o con símbolos que constan de una sola letra como se muestra en la tabla 1 del capítulo 4 de la memoria.

Tabla 1. Aminoácidos estándar.

$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{HN}-\text{C}-\text{H} \\ / \quad \backslash \\ 2\text{HC} \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$ <p>Proline</p>
$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Methionine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Phenylalanine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N} \end{array}$ <p>Tryptophan</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glycine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Serine</p>
$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Threonine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cysteine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Asparagine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Glutamine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Tyrosine</p>
$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$ <p>Aspartic Acid</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$ <p>Glutamic Acid</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$ <p>Lysine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ 2\text{HN} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Arginine</p>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}=\text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HN} \quad \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Histidine</p>

2.2. Fichas de seguridad

2.2.1. Desoxirribonucleasa (DNAsa) I

1. Descripción

- Sinónimos: DNASA I - Desoxirribonucleasa I - Bovine Páncreas - Páncreas de Bovino.
- Formula química: No reportado.
- Concentración: No reportado.
- Peso molecular: No reportado.

- e) Grupo químico: Compuesto Orgánico - Proteínas/Enzimas.
- f) Número CAS : 9003-98-9.
- g) Número NU: No regulado.
- h) Código Winkler: BM-0643.

2. Propiedades físicas y químicas

- a) Estado físico: Sólido.
- b) Apariencia: Polvos blancos. Son higroscópicos.
- c) Olor: Olor característico a enzimas.
- d) pH: No reportado.
- e) Temperatura de ebullición: Se descompone.
- f) Temperatura de fusión: No reportado.
- g) Densidad (Agua1): No reportado.
- h) Presión de vapor: No reportado.
- i) Densidad de vapor (Aire1): No reportado.
- j) Solubilidad: Soluble en Agua.

3. Identificación de riesgos

- a) Riesgo principal: Irritante y Nocivo leves
- b) Riesgos secundarios: No hay
- c) Código Winkler: establece una clasificación de riesgos, en el que el 0 es el riesgo más bajo hasta el 5 que representa un riesgo extremo.

Salud: 1.

Inflamable: 0.

Reactivo: 0.

Contacto: 1.

- d) Rótulo de transporte: No determinado.
- e) Norma NFPA: 0 - 0 - 0.

4. Riesgos para la salud

- a) Inhalación: Irritaciones de las membranas mucosas.
- b) Sensibilización respiratoria.
- c) Contacto con la piel: Irritaciones. Enrojecimiento. Sensibilización de la piel.
- d) Contacto con los ojos: Irritaciones.
- e) Ingestión: Nocivo leve. Molestias.
- f) Cancerígeno: No.

- g) Mutageno: No.
- h) Teratógeno: No.
- i) Otros efectos: Sensibilización respiratoria y piel.

5. Riesgo de incendio

- a) Condición de inflamabilidad: No combustible.
- b) Temperatura de inflamación: No aplicable.
- c) Temperatura de auto ignición: No aplicable.
- d) Límites de inflamabilidad: No aplicable.
- e) Productos de combustión: Monóxido de Carbono y Dióxido de Carbono.
- f) Medios de extinción: en general, uso de extintores de Espuma Química, Anhídrido Carbónico y/o polvo químico seco, de acuerdo a las características del fuego circundante. Aplicación de agua en forma de neblina.

6. Riesgo de reactividad

- a) Estabilidad química: Estable.
- b) Incompatibilidades: Agentes Oxidantes fuertes. Ácidos fuertes. Álcalis.
- c) Peligro de polimerización: No ocurre.
- d) Productos peligrosos en descomposición: Monóxido de Carbono y Dióxido de Carbono.
- e) Condiciones a evitar: Altas temperaturas. Humedad (es higroscópico).

7. Control de exposición

- a) Medidas de control: Como medida de carácter general, trabajar en un lugar con buena ventilación. Aplicar procedimientos de trabajo seguro. Capacitar respecto a los riesgos químicos y su prevención. Contar con ficha de seguridad química del producto y conocer su contenido. Mantener los envases con sus respectivas etiquetas. Respetar prohibiciones de no fumar, comer y beber bebidas en el lugar de trabajo. Utilizar elementos de protección personal asignados.
- b) Límite permisible ponderado: 8 mg/m³ (para Desoxirribonucleasa I, como Polvos no Clasificados Decreto N°594 - Ministerio de Salud).
- c) Límite permisible absoluto: 40 mg/m³ (para Desoxirribonucleasa I, como Polvos no Clasificados Decreto N°594 - Ministerio de Salud).
- d) Límite permisible temporal: No regulado.
- e) Otros límites: No establecidos.

8. Equipos de protección personal

- a) Ropa de trabajo: En general, uso de indumentaria de trabajo resistente a químicos.
- b) Protección respiratoria: Aplicación de protección respiratoria sólo en caso de sobrepasarse alguno de los límites permisibles correspondientes. Debe ser específica para partículas sólidas.
- c) Guantes de protección: Utilización de guantes de características impermeables y que no sean atacados por el producto químico.
- d) Lentes protectores: Se deben usar lentes de seguridad resistentes contra proyecciones de la sustancia química.
- e) Calzado de seguridad: En general, utilizar calzado cerrado, no absorbente, con resistencia química y de planta baja.

9. Medidas de primeros auxilios en caso de:

- a) Inhalación, medidas generales
 - Trasladar a la persona donde exista aire fresco.
 - En caso de paro respiratorio, emplear método de reanimación cardiopulmonar.
 - Si respira dificultosamente se debe suministrar oxígeno.
 - Conseguir asistencia médica.
- b) Contacto con la piel: Lavar con abundante Agua, a lo menos por 5 minutos. Como medida de carácter general, usar una ducha de emergencia si es necesario al mantenerse la lesión, recurrir a asistencia médica.
- c) Contacto con los ojos: Lavarse con abundante agua en un lavadero de ojos, entre 5 y 10 minutos como mínimo, separando los párpados. De persistir el daño, derivar a un centro de atención médica.
- d) Ingestión: Lavar la boca y dar de beber agua. Enviar a un servicio médico de inmediato, en caso de existir alguna molestia.

Nota:

Si la lesión sufrida por una persona tiene relación laboral y está cubierta por la Ley Nº 16744 de Accidentes del Trabajo y Enfermedades Profesionales, podrá ser atendida según proceda, por el Servicio Médico asociado a la Asociación Chilena de Seguridad, Mutual de Seguridad C.CH.C., Instituto de Seguridad del Trabajo, Instituto de Normalización Previsional o por la Administración Delegada correspondiente.

10. Almacenamiento

- a) Área de almacenamiento: Zona de almacenaje general de reactivos y soluciones químicas. Almacenamiento en bodegas y/o cabinas, diseñadas para contener productos químicos con seguridad. Lugar refrigerado (-15 a -22°C), seco y con buena ventilación. Señalización del riesgo.

- b) Código de almacenaje Winkler: Verde.
- c) Precauciones especiales: Almacenar alejado de condiciones y productos incompatibles. Proteger contra el daño físico. Mantener los envases cerrados y debidamente etiquetados.

11. Medidas para el control de derrames o fugas

a) Medidas Generales:

- Contener el derrame o fuga.
- Ventilar el área.
- Aislar la zona crítica.
- Utilizar elementos de protección personal.
- Recoger el producto a través de una alternativa segura.
- Disponer el producto recogido como residuo químico.
- Lavar la zona contaminada con agua.
- Solicitar ayuda especializada si es necesaria.

12. Disposición de residuos químicos

En general, los residuos químicos se pueden eliminar a través de las aguas residuales, por el desagüe o en un vertedero autorizado, una vez que se acondicionen de forma de ser inocuos para el medio ambiente.

a) Alternativas

- Diluir con agua en una proporción mínima de 1:20 u otra relación necesaria y luego eliminar en las aguas residuales o por el desagüe.
- Otra posibilidad, es disponer los residuos directamente a un vertedero autorizado para contenerlos.

Es importante considerar para la eliminación de residuos, que se realice conforme a lo que disponga la autoridad competente respectiva, solicitándose previamente la autorización correspondiente.

13. Información reglamentaria

Decreto N°594 "Reglamento sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Básicas en los Lugares de Trabajo".

Decreto N°40 "Reglamento sobre Prevención de Riesgos Profesionales".

NCh 382.Of98 "Sustancias Peligrosas - Terminología y Clasificación General".

NCh 1411/IV.Of78 "Prevención de Riesgos - Parte 4: Identificación de Riesgos de Materiales".

2.2.2. *Albúmina de suero bovino (BSA)*

1. Descripción

- a) Sinónimos: BSA - Albúmina, Suero de Sangre.
- b) Formula química: No disponible.
- c) Concentración: 99.0%.
- d) Peso molecular: No disponible.
- e) Grupo químico: Producto orgánico.
- f) Número CAS: 9048-46-6
- g) Número NU: No regulado.
- h) Código Winkler: BM-0150.

2. Propiedades físicas y químicas

- a) Estado físico: Sólido.
- b) Apariencia: Escamas blancas pálidas.
- c) Olor: Olor característico.
- d) pH: 5.0 - 6.0 en solución acuosa al 1% a 20°C.
- e) Temperatura de ebullición: No reportado.
- f) Temperatura de fusión: No reportado.
- g) Densidad (Agua1): No reportado.
- h) Presión de Vapor: No reportado.
- i) Densidad de Vapor (Aire1): No reportado.
- j) Solubilidad: Soluble en agua.

3. Identificación de riesgos

- a) Riesgo principal: Combustible e Irritante leves.
- b) Riesgos secundarios: No hay.
- c) Código Winkler: establece una clasificación de riesgos, en el que el 0 es el riesgo más bajo hasta el 5 que representa un riesgo extremo.

Salud: 0.

Inflamable: 1.

Reactivo: 0.

Contacto: 1.

- d) Rótulo de Transporte: No determinado.
- e) Norma NFPA: 0 - 1 - 0.

4. Riesgos para la salud

- a) Inhalación: No.
- b) Contacto con La Piel: No.
- c) Contacto con los ojos: Irritaciones leves.
- d) Ingestión: Muy baja toxicidad. Trastornos gastrointestinales si se ingiere en grandes cantidades.
- e) Dosis letal en rata: >12500 mg/kg.
- f) Cancerígeno: No.
- g) Mutágeno: No.
- h) Teratógeno: En estudio.
- i) Otros efectos: No.

5. Riesgo de incendio

- a) Condición de inflamabilidad: Ligeramente combustible.
- b) Productos de combustión: Monóxido de Carbono y Dióxido de Carbono.
- c) Medios de extinción: Uso de extintores apropiados al fuego circundante. En general, con agentes de extinción de polvo químico seco, espuma química y/o Anhídrido Carbónico. Aplicación Agua en forma de neblina.

6. Riesgo de actividad

- a) Estabilidad química: Estable.
- b) Incompatibilidades: Agentes oxidantes fuertes. Ácidos fuertes.
- c) Peligro de polimerización: No.
- d) Productos peligrosos en descomposición: Monóxido de Carbono y Dióxido de Carbono.
- e) Condiciones a evitar: Altas temperaturas. Llamas y otras fuentes de ignición.

7. Control de exposición

- a) Medidas de control: En general, trabajar en un lugar con buena ventilación. Aplicar procedimientos de trabajo seguro. Capacitar respecto a los riesgos químicos y su prevención. Contar con ficha de seguridad química del producto y conocer su contenido. Mantener los envases con sus respectivas etiquetas. Respetar prohibiciones de no fumar, comer y beber bebidas en el lugar de trabajo. Utilizar elementos de protección personal asignados.
- b) Límite permisible ponderado: 8 mg/m³ (para Albúmina de Suero Bovino sólida, como polvos no clasificados Decreto N°594, Ministerio de Salud).
- c) Límite permisible absoluto: 40 mg/m³ (para Albúmina de Suero Bovino sólida, como polvos no clasificados Decreto N°594, Ministerio de Salud).

- d) Límite Permisible temporal: No regulado.
- e) Otros límites: No reportados.

8. Equipos de protección personal

- a) Ropa de trabajo: En general, uso de indumentaria de trabajo resistente al producto.
- b) Protección respiratoria: Aplicación de protección respiratoria sólo en caso de sobrepasarse alguno de los límites permisibles correspondientes. Debe ser específica para partículas sólidas.
- c) Guantes de protección: Como medida de carácter general, utilizar guantes de características impermeables y que no sean atacados por el producto químico.
- d) Lentes protectores: Uso de lentes de seguridad resistentes contra proyecciones de la sustancia química.
- e) Calzado de seguridad: Uso de lentes de seguridad resistentes contra proyecciones de la sustancia química.

9. Medidas de primeros auxilios en caso de:

- a) Inhalación, medidas generales:
 - Trasladar a la persona donde exista aire fresco.
 - En caso de paro respiratorio, emplear método de reanimación cardiopulmonar.
 - Si respira dificultosamente se debe suministrar oxígeno.
 - Conseguir asistencia médica.
- b) Contacto con la piel: En general, lavar con agua, hasta retirar completamente el producto de la piel. Sacarse la ropa contaminada y luego lavarla. De haber alguna molestia, solicitar ayuda médica.
- c) Contacto con los ojos: Lavarse con abundante y rápida agua en un lavadero de ojos, entre 5 y 10 minutos como mínimo, separando los párpados. De mantenerse irritación o alguna molestia, derivar a un centro de atención médica.
- d) Ingestión: Lavar la boca y dar de beber agua. Enviar a un servicio médico, de generarse alguna molestia.

Nota:

Si la lesión sufrida por una persona tiene relación laboral y está cubierta por la Ley Nº 16744 de Accidentes del Trabajo y Enfermedades

Profesionales, podrá ser atendida según proceda, por el Servicio Médico asociado a la Asociación Chilena de Seguridad, Mutual de Seguridad C.CH.C., Instituto de Seguridad del Trabajo, Instituto de Normalización Previsional o por la Administración Delegada correspondiente.

10. Almacenamiento

- a) Área de almacenamiento: Zona de almacenaje general de reactivos y soluciones químicas. Almacenamiento en bodegas y/o cabinas, diseñadas para contener productos químicos con seguridad. Lugar refrigerado, seco y con buena ventilación. Señalización del riesgo.
- b) Código de almacenaje Winkler: Verde.
- c) Precauciones especiales: Mantener alejado de productos y condiciones incompatibles. Proteger contra el daño físico. Tener los envases cerrados y debidamente etiquetados.

11. Medidas para el control de derrames o fugas

a) Medidas Generales:

- Contener el derrame o fuga.
- Ventilar y aislar el área crítica.
- Utilizar elementos de protección personal.
- Contar con algún medio de contención de derrames.
- Recoger el producto a través de una alternativa segura.
- Disponer el producto recogido como residuo químico.
- Lavar la zona contaminada con agua.
- Solicitar ayuda especializada si es necesaria.

12. Disposición de residuos químicos

En general, los residuos químicos se pueden eliminar a través de las aguas residuales, por el desagüe o en un vertedero autorizado, una vez que se acondicionen de forma segura para no dañar el medio ambiente.

a) Posibilidades:

- Diluir con agua en una proporción mínima de 1:20 u otra relación que sea necesaria y eliminar en las aguas residuales o por el desagüe.
- Otra alternativa, es disponer los residuos directamente a un vertedero autorizado para contenerlos.

Es importante considerar para la eliminación de residuos, que se realice conforme a lo que disponga la autoridad competente respectiva, solicitándose previamente la autorización correspondiente.

2.2.3. Ácido Clorhídrico (HCl) 37%

1. Descripción

- a) Sinónimos: Acido Muriático - Acido Hidroclórico - Cloruro de Hidrógeno - Acido Clorhídrico en solución.
- b) Formula química: HCl.
- c) Concentración: 37.0%.
- d) Peso molecular: 36.46.
- e) Grupo químico: Acido inorgánico.
- f) Número CAS: 7647-01-0.
- g) Número NU: 1789 (Acido Clorhídrico en solución).
- h) Código Winkler: AC-0065.

2. Propiedades físicas y químicas

- a) Estado físico: Líquido.
- b) Apariencia: Transparente de apariencia incolora a ligeramente amarillo.
- c) Olor: Olor picante e irritante. Umbral del olor: 1.0 - 5.0 ppm.
- d) pH: 0.1 en solución acuosa 1N a 20°C. 1.1 en solución acuosa 0.1N a 20°C.
- e) Temperatura de ebullición: 108.6°C.
- f) Temperatura de fusión: -30°C en solución acuosa al 37%. 35°C en solución acuosa al 35%.
- g) Densidad (Agua1): 1.184 kg/L a 20°C.
- h) Presión de vapor: 100 mmHg a 20°C en solución acuosa al 35%.
- i) Densidad de vapor (Aire1): 1.27.
- j) Solubilidad: Completamente soluble en agua. Muy soluble en alcoholes. Soluble en éter y benceno. Insoluble en hidrocarburos.

3. Identificación de riesgos

- a) Riesgo principal: Corrosivo.
- b) Riesgos secundarios: Nocivo y reactivo.
- c) Código Winkler: establece una clasificación de riesgos, en el que el 0 es el riesgo más bajo hasta el 5 que representa un riesgo extremo.

Salud: 3.

Inflamable: 0.

Reactivo: 2.

Contacto: 3.



d) Rótulo de Transporte:

e) Norma NFPA: 3 - 0 - 1.

- Clase: 8
- Grupo: II

4. Riesgos para la salud

- a) Inhalación: Irritaciones severas, quemaduras y ulceraciones en nariz, garganta y laringe. Dolor de cabeza, vértigo, mareos, náuseas y vómitos. Tos y dificultad respiratoria de 50 a 100 ppm. Bronquitis y neumonía. Edema pulmonar entre 1000 y 2000 ppm. CL50 (rata): 5666 ppm en 30 min. De exposición (100% Acido Clorhídrico).
- b) Contacto con la piel: Irritaciones, enrojecimiento y quemaduras severas.
- c) Contacto con los ojos: Irritaciones (10 a 35 ppm), enrojecimiento y quemaduras severas. Destrucción de la cornea y posible ceguera.
- d) Ingestión: Irritaciones y quemaduras severas de boca, esófago y estómago. Náuseas, vómitos y diarrea. Shock y colapso. DL50 (oral - conejo): 900 mg/kg.
- e) Cancerígeno: No.
- f) Mutágeno: No.
- g) Teratógeno: En estudio a nivel de experiencias con animales.
- h) Otros efectos: Dermatitis en piel expuesta. Decoloración y erosión dental. Bronquitis crónica. Gastritis.

5. Riesgo de incendio

- a) Condición de inflamabilidad: No combustible.
- b) Temperatura de inflamación: No aplicable.
- c) Temperatura de auto ignición: No aplicable.
- d) Límites de inflamabilidad: No aplicable.
- e) Productos de combustión: Acido Clorhídrico gaseoso, Cloro e Hidrógeno.
- f) Medios de extinción: Uso de extintores apropiados al fuego circundante. En general, con agentes de extinción de Polvo Químico Seco y/o Anhídrido Carbónico. No usar Agua directamente. Solamente aplicarla en forma de neblina para enfriar el ambiente.

6. Riesgo de reactividad

- a) Estabilidad química: Moderada estabilidad.
- b) Incompatibilidades:

- Bases fuertes como el Sodio Hidróxido (reacción violenta y generación de calor).
 - Metales comunes (se genera gas Hidrógeno).
 - Explosivos (contacto puede generar calor y detonación).
 - Aldehídos (polimerización violenta).
 - Agentes Reductores (se produce calor, gas Hidrógeno y fuego).
 - Agentes Oxidantes (produce calor y gases Cloro, tóxicos y corrosivos).
 - Cianuros y Sulfuros (reacción con generación de HCN y 2HS).
 - Fosfuros (generación de Fosfina).
- c) Peligro de polimerización: Si se mezcla con Aldehídos (generación de calor y presión).
- d) Productos Peligrosos en descomposición: Cloro e Hidrógeno.
- e) Condiciones a evitar: Altas temperaturas (se descompone sobre los 1500°C).

7. Control de exposición

a) Medidas de control:

- Trabajar en un lugar con buena ventilación.
- Uso preferente de cabinas o campanas de laboratorio con extracción forzada.
- Aplicar procedimientos de trabajo seguro.
- Capacitar respecto a los riesgos químicos y su prevención.
- Contar con ficha de seguridad química del producto y conocer su contenido.
- Mantener los envases con sus respectivas etiquetas.
- Respetar prohibiciones de no fumar, comer y beber bebidas en el lugar de trabajo.
- No pipetear con la boca. Usar propipeta.
- Al diluir, agregar siempre el Ácido al agua y nunca hacer lo contrario.
- Utilizar elementos de protección personal asignados.

b) Límite permisible ponderado: No regulado.

c) Límite Permisible absoluto: 6 mg/m^3 - 5 ppm (Decreto N°594 - Ministerio de Salud).

d) Límite permisible temporal: No regulado.

- e) Otros límites: 75 mg/m³ - 50 ppm (Nivel IDLH - "Inmediatamente Peligroso para la Vida y la Salud" - USA)

8. Equipos de protección personal

- a) Ropa de trabajo: Uso de indumentaria de trabajo resistente a sustancias químicas corrosivas.
- b) Protección respiratoria: Aplicación de protección respiratoria sólo en caso de sobrepasarse el límite permisible correspondiente. Debe ser específica para ácidos inorgánicos. En caso de niveles de 75 mg/m³ o más, situaciones de emergencias o ambientes con concentración desconocida, debe usarse un sistema de respiración con suministro de aire o aparato autónomo.
- c) Guantes de protección: Utilización de guantes de Butilo, Neopreno, Viton y/o PVC.
- d) No recomendado: PVA.
- e) Lentes protectores: Se deben utilizar lentes de seguridad y/o careta facial, resistentes contra salpicaduras y proyecciones del ácido corrosivo.
- f) Calzado de seguridad: Uso de calzado cerrado, no absorbente, con resistencia química y de planta baja.

9. Medidas de primeros auxilios en caso de:

- a) Inhalación: Trasladar a la persona donde exista aire fresco. En caso de paro respiratorio, emplear método de reanimación cardiopulmonar. Si respira dificultosamente se debe suministrar oxígeno. Conseguir asistencia médica de inmediato.
- b) Contacto con la piel: Lavar con abundante y rápida agua, a lo menos por 20 minutos. Usar una ducha de emergencia. Sacarse la ropa contaminada y luego lavarla o desecharla. Si persiste el daño, continuar lavando sin interrupción y derivar a un servicio médico.
- c) Contacto con los ojos: Lavarse con abundante y rápida agua en un lavadero de ojos, durante 20 minutos como mínimo, separando los párpados. De mantenerse el daño, acudir a una asistencia médica rápidamente.
- d) Ingestión: Lavar la boca con bastante agua. Dar a beber 240 a 300 ml de agua y también leche. Control del shock, manteniendo a la persona abrigada. No inducir al vómito. Proporcionar atención médica inmediatamente.

Nota:

Si la lesión sufrida por una persona tiene relación laboral y está cubierta por la Ley N°16744 de Accidentes del Trabajo y Enfermedades Profesionales, podrá ser atendida según proceda, por el Servicio Médico asociado a la Asociación Chilena de Seguridad, Mutual de Seguridad C.CH.C., Instituto de Seguridad del Trabajo, Instituto de Normalización Previsional o por la Administración Delegada correspondiente.

10. Almacenamiento

- a) Área de almacenamiento: Zona de almacenaje de reactivos y soluciones químicas con riesgo por contacto. Almacenamiento en bodegas, cabinas o estanques, diseñados con resistencia para contener sustancias corrosivas. Lugar fresco, seco y con buena ventilación. Proteger de la luz solar. Contar con medios de contención de derrames. Acceso controlado y señalización del riesgo.
- b) Código de almacenaje Winkler: Blanco.
- c) Precauciones especiales: Almacenar separadamente de condiciones y productos incompatibles. Proteger contra el daño físico. Mantener los envases cerrados y debidamente etiquetados.

11. Medidas para el control de derrames o fugas

- a) Procedimiento
 - Contener el derrame o fuga.
 - Ventilar el área y aislar la zona crítica.
 - Neutralizar con Hidróxido Cálcico o Bicarbonato Sódico, ambos como polvos.
 - Utilizar elementos de protección personal. Nivel de protección B o C.
 - Absorber por medio de un material o producto inerte, como arena.
 - Recoger el producto a través de una alternativa segura.
 - Disponer el producto recogido como residuo químico. No eliminar por desagües o cursos de agua.
 - Lavar la zona contaminada con bastante agua.
 - Solicitar ayuda especializada si es necesaria.

12. Disposición de residuos químicos

En general, los residuos químicos se pueden eliminar a través de las aguas residuales o por el desagüe, una vez que se acondicionen de forma tal de ser inocuos para el medio ambiente.

- a) Para pequeñas cantidades: Diluir con Agua aproximadamente en una proporción 1:5 y después neutralizar hasta pH 6 - 8, adicionando una solución de Hidróxido Sódico al 30% o escamas del mismo producto. La solución salina resultante, en caso que proceda, se diluye luego con más agua en una proporción aproximada de 1:10 u otra que sea necesaria y posteriormente se elimina en las aguas residuales o por el desagüe.

Es importante considerar para la eliminación de residuos, que se realice conforme a lo que disponga la autoridad competente respectiva, solicitándose previamente la autorización correspondiente.

13. Información reglamentaria

Decreto Nº594 "Reglamento sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Básicas en los Lugares de Trabajo".

Decreto Nº40 "Reglamento sobre Prevención de Riesgos Profesionales".

NCh 382.Of1998 "Sustancias Peligrosas - Terminología y Clasificación General".

NCh 2120/8.Of1998 "Sustancias Peligrosas - Parte 8: Clase 8 - Sustancias Corrosivas".

NCh 2190.Of1993 "Sustancias Peligrosas - Marcas para Información de Riesgos".

NCh 1411/IV.Of1978 "Prevención de Riesgos - Parte 4: Identificación de Riesgos de Materiales".

NCh 2245.Of2003 "Sustancias Químicas - Hojas de Datos de Seguridad - Requisitos".

NCh 2137.Of1992 "Sustancias Peligrosas - Embalajes y Envases - Terminología".

NCh 2424.Of1998 "Sustancias Corrosivas - Acido Clorhídrico en Solución - Disposiciones de Seguridad para el Transporte".

Decreto Nº298 "Transporte de Cargas Peligrosas por Calles y Caminos".

Ley Nº19300 "Bases Generales del Medio Ambiente".

Vigente desde 22/01/2007 versión Nº1

2.2.4. Hidróxido de sodio (NaOH)

1. Descripción

- a) Sinónimos: Sodio Hidróxido en solución - Hidróxido de Sodio en solución - Hidróxido Sódico en solución - Soda Cáustica en solución - Cáustico Blanco en solución - Lejía de Sodio en solución.
- b) Formula química: NaOH.
- c) Peso molecular: 40.00.
- d) Grupo químico: Compuesto de Sodio Inorgánico - Hidróxido - Álcali.
- e) Número CAS: 1310-73-2
- f) Número NU: 1824 (Hidróxido de sodio en solución).
- g) Código Winkler: 30350

2. Propiedades físicas y químicas

- a) Estado físico: Líquido.
- b) Apariencia: Incoloro y transparente.
- c) Olor: Sin olor.
- d) pH: 13 en solución acuosa al 0.5%. 14 en solución acuosa al 5%.
- e) Temperatura de ebullición: 100°C aproximadamente.
- f) Temperatura de fusión: 0°C aproximadamente.
- g) Densidad (Agua1): 1.04 kg/L a 20°C.
- h) Presión de vapor: 1.5 mmHg a 20°C en solución acuosa al 50%.
- i) Solubilidad: Completamente soluble en agua. Soluble en alcoholes etílicos y metílicos y en glicerol.

3. Identificación de riesgos

- a) Riesgo principal: Corrosivo
- b) Riesgos secundarios: Nocivo. Reactivo leve
- c) Código Winkler: establece una clasificación de riesgos, en el que el 0 es el riesgo más bajo hasta el 5 que representa un riesgo extremo.

Salud: 2.

Inflamable: 0.

Reactivo: 1.

Contacto: 3.



d) Rótulo de Transporte:

e) Norma NFPA: 3 - 0 - 1.

- Clase: 8.
- Grupo: II.

4. Riesgos para la salud

- a) Inhalación: Severas irritaciones y posibles quemaduras de las membranas mucosas y en general del tracto respiratorio superior. Dificultad respiratoria.
- b) Contacto con la piel: Severas quemaduras y/o irritaciones.
- c) Contacto con los ojos: Severas quemaduras y/o irritaciones. Visión borrosa. Posible daño permanente.
- d) Ingestión: Irritaciones severas. Posibles quemaduras en la boca, tracto digestivo y estómago. Nocivo. Náuseas, vómitos y diarrea.
- e) Cancerígeno: Estudios reportan que causa cáncer en esófago en individuos por vía de ingestión.
- f) Mutágeno: No hay evidencias.
- g) Teratógeno: No hay evidencias.
- h) Otros Efectos: Dermatitis en piel expuesta. Irritación crónica. Bronconeumonía. Reducción de la función pulmonar.

5. Riesgo de incendio

- a) Condición de inflamabilidad: No combustible.
- b) Productos de combustión: No aplicable.
- c) Medios de extinción: Utilización de extintores apropiados al fuego circundante. En general, uso de agentes de extinción de Anhídrido Carbónico y/o polvo químico seco. Aplicar Agua sólo en forma de neblina para enfriar medios contenedores.

6. Riesgo de reactividad

- a) Estabilidad química: Normalmente estable.
- b) Incompatibilidades:
 - Ácidos fuertes (reacción violenta).
 - Aluminio, Titanio y Zinc (puede generar gas Hidrógeno inflamable).
 - Acetaldehído, Acreolina y Acrilonitrilo (polimerización violenta).
 - Tricloroetileno, Tetracloroetano y 1,2-Dicloroetileno (inflamación espontánea).
 - Azúcar, Lactosa y Maltosa (generación de Monóxido de Carbono).
 - Peróxidos orgánicos, nitroaromáticos, nitroparafinas, compuestos organohalogenados y agua (reacción violenta).

- c) Peligro de polimerización: Polimeriza violentamente al Acetaldehído, Acreolina y Acrilonitrilo.
- d) Productos peligrosos en descomposición: Óxido de sodio.
- e) Condiciones a evitar: Altas temperaturas.

7. Control de exposición

a) Medidas de control:

- Trabajar en un lugar con buena ventilación.
- Uso de cabinas o campanas de laboratorio con extracción forzada.
- Aplicar procedimientos de trabajo seguro.
- Capacitar respecto a los riesgos químicos y su prevención.
- Contar con ficha de seguridad química del producto y conocer su contenido.
- Mantener los envases con sus respectivas etiquetas.
- Respetar prohibiciones de no fumar, comer y beber bebidas en el lugar de trabajo.
- No pipetear con la boca. Usar propipeta.
- Agregar la solución Alcalina al Agua, nunca lo contrario.
- Utilizar elementos de protección personal asignados.

b) Límite permisible ponderado: No regulado.

c) Límite permisible absoluto: 2 mg/m³ (Decreto N°594 - Ministerio de Salud)

d) Límite permisible temporal: No regulado.

e) Otros límites: 10 mg/m³ (Nivel IDLH - Inmediatamente Peligro para la Vida y la Salud -USA)

8. Equipos de protección personal

- a) Ropa de trabajo: Uso de indumentaria de trabajo resistente a sustancias químicas corrosivas.
- b) Protección respiratoria: Aplicación de protección respiratoria sólo en caso sobrepasarse el límite permisible absoluto. Debe ser específica para el compuesto. En caso de niveles sobre los 10 mg/m³, situaciones de emergencias o ambientes con cantidades desconocidas, debe usarse un sistema de respiración con suministro de aire o aparato autónomo, ambos de presión positiva.
- c) Guantes de protección: Utilización de guantes de Butilo, Goma Natural, Neopreno, Nitrilo y/o PVC.

- d) Lentes protectores: Uso de lentes de seguridad y/o careta facial, adecuados contra salpicaduras y proyecciones de la solución corrosiva.
- e) Calzado de seguridad: Utilizar calzado cerrado, no absorbente, con resistencia química y de planta baja. Botas de Goma.

9. Medidas de primeros auxilios

- a) Inhalación: Trasladar a la persona donde exista aire fresco.
 - En caso de paro respiratorio, emplear método de reanimación cardiopulmonar.
 - Si respira dificultosamente se debe suministrar Oxígeno.
 - Conseguir asistencia médica de inmediato.
 - Contacto con la piel: Lavar con abundante y rápida Agua, por lo menos de 15 a 20 minutos.
 - Utilizar una ducha de emergencia.
 - Sacarse la ropa contaminada y luego lavarla o desecharla.
 - Si persiste el daño, continuar lavando y solicitar ayuda médica.
- b) Contacto con los ojos: Lavarse con abundante y rápida agua en un lavadero de ojos, entre 15 y 30 minutos como mínimo, separando los párpados. De mantenerse el daño, derivar a un servicio médico inmediatamente.
- c) Ingestión: Lavar la boca con bastante Agua.
 - Dar a beber 250 a 300 ml de Agua para diluir.
 - Control del shock, manteniendo a la persona abrigada.
 - No inducir al vómito.
 - Enviar a un centro de atención médica rápidamente.

Nota:

Si la lesión sufrida por una persona tiene relación laboral y está cubierta por la Ley N°16744 de Accidentes del Trabajo y Enfermedades Profesionales, podrá ser atendida según proceda, por el Servicio Médico asociado a la Asociación Chilena de Seguridad, Mutual de Seguridad C.CH.C., Instituto de Seguridad del Trabajo, Instituto de Normalización Previsional o por la Administración Delegada correspondiente.

10. Almacenamiento

- a) Área de almacenamiento: Zona de almacenaje de reactivos y soluciones químicas con riesgo por contacto. Almacenamiento en bodegas, estanques y/o cabinas, diseñadas para contener corrosivos. Lugar frío, mínima humedad a seco y con buena ventilación. Contar con medios de contención de derrames. Acceso controlado y señalización del riesgo.

- b) Código de almacenaje Winkler: Blanco separado.
- c) Precauciones especiales: Almacenar separado del resto de las sustancias corrosivas. Mantener alejado de productos y condiciones incompatibles. Proteger contra el daño físico. Tener los envases cerrados y debidamente etiquetados.

11. Medidas para el control de derrames o fugas

a) Procedimiento

- Contener el derrame o fuga.
- Ventilar el área y aislar la zona crítica.
- Utilizar elementos de protección personal. Nivel de protección B o C.
- Neutralizar con soluciones de Acido Acético o Acido Clorhídrico.
- Absorber el producto por medio de un material o producto inerte, como la arena.
- Recoger el producto a través de una alternativa segura. Disponer el producto recogido como residuo químico.
- Lavar completamente la zona contaminada con bastante agua.
- Solicitar ayuda especializada si es necesaria.

12. Disposición de residuos químicos

En general, los residuos químicos se pueden eliminar a través de las aguas residuales, por el desagüe u otra alternativa segura, una vez que sea condicionen de forma tal de ser inocuos para el medio ambiente.

- a) Para pequeñas cantidades: Diluir con agua en una proporción aproximada de 1:5 u otra que sea necesaria y luego neutralizar hasta pH 6-8, añadiendo lentamente Acido Sulfúrico diluido u otro compuesto Acido equivalente. La solución salina resultante, en caso de ser necesario, se diluye con más agua y se elimina en las aguas residuales o por el desagüe. Los derrames una vez neutralizados, se disuelven en agua y se eliminan por el desagüe. Es importante considerar para la eliminación de residuos, que se realice conforme a lo que disponga la autoridad competente respectiva, solicitándose previamente la autorización correspondiente.

13. Información reglamentaria

Decreto N°594 "Reglamento sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Básicas en los Lugares de Trabajo".

Decreto N°40 "Reglamento sobre Prevención de Riesgos Profesionales".

NCh 382.Of1998 "Sustancias Peligrosas - Terminología y Clasificación General".

ANEXO 2 (PFC 1)

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En este proyecto se plantea el estudio de las relaciones estructura-función en dos sistemas de membrana: la neuroquinina; perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) que tienen neuropéptidos como ligandos, y la permeasa de melibiosa de *E. coli* (MelB). Aunque existen diferencias importantes entre estos sistemas tanto en los aspectos estructurales y en su complejidad, como en la función que realizan, los principios que rigen la estructuración de las proteínas transmembrana son similares. Así, las ideas fundamentales sobre el papel de los bucles o las interacciones hélice-hélice, o los cambios en el pKa de residuos ionizables, deben poder ser compartidas entre los dos sistemas. Pero, además, es indudable que las metodologías utilizadas para el estudio de uno de estos sistemas pueden ser también utilizadas con el otro sistema. Por ejemplo, el análisis de espectros de diferencia de FTIR, combinado con mutagénesis dirigida (ambos explicados en el apartado de metodología), se propone como una de las aproximaciones clave para obtener información valiosa en ambos sistemas.

1.1. Interacciones Neuropéptido-GPCR: Determinantes Estructurales

1.1.1. La superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR)

El conjunto de receptores acoplados a proteína G constituyen una extensa familia de receptores de membrana, involucrados en un gran número de procesos de transducción celulares. Se ha descrito hasta el momento una amplia variedad de

ligandos como fotones, aminos biógenas, nucleótidos, aminoácidos, péptidos, proteínas, iones y proteasas.

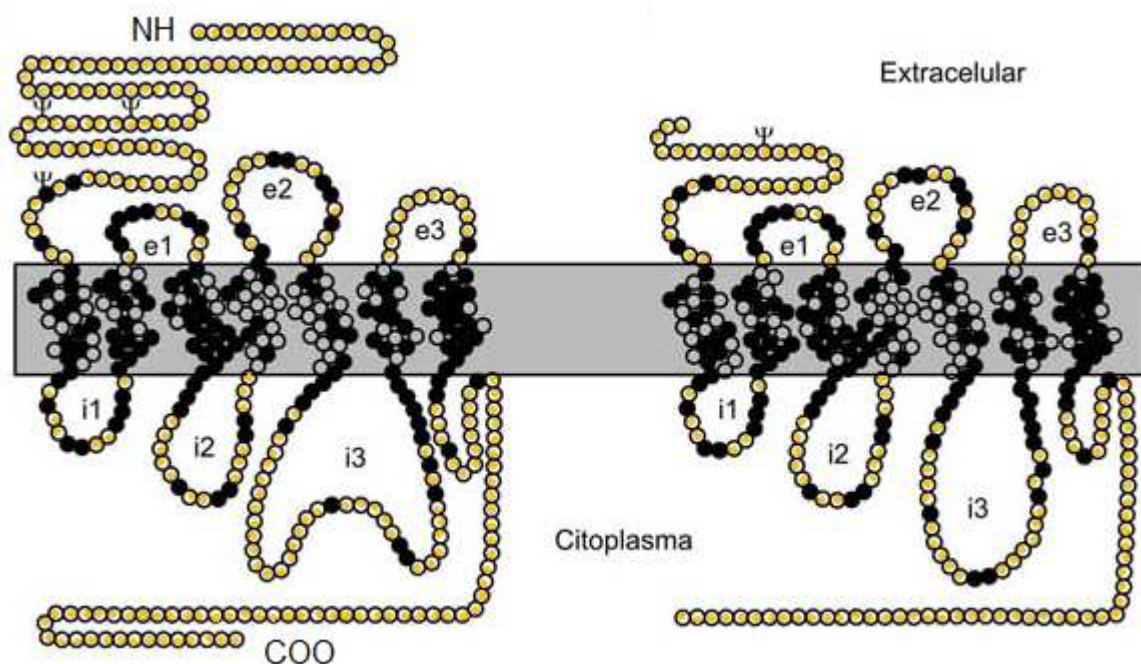


Figura 1. Representación esquemática de los receptores acoplados a la proteína G.

Es notable constatar que en todos los casos se ha conservado la arquitectura de 7 hélices transmembrana. Tanto los segmentos N y C terminal como los bucles extracelulares y citoplasmáticos presentan una gran variedad de tamaños. Asimismo, las secuencias aminoacídicas muestran una gran variabilidad, aunque existen algunos elementos conservados en la gran mayoría de GPCR, como el puente disulfuro establecido entre el extremo extracelular de la hélice 3 y el bucle E2.

Por otra parte, es evidente la gran importancia de los GPCR, no solamente en el ámbito farmacológico, sino en general en el conjunto de las ciencias médicas, para comprender los complejos mecanismos de transmisión de señales y su regulación.

Todo ello explica la gran cantidad de trabajos publicados en el área de los GPCR, desde todos los puntos de vista posibles. Sin embargo, la comprensión del modo de funcionamiento de los GPCR es aún escasa. El mecanismo de interacción ligando-receptor, la transmisión de esta interacción hasta el lado intracelular, el modo de activación de la proteína G específica, son algunos de los procesos en los que hoy en día aún existen importantes lagunas de comprensión.

Entre los motivos que explican el déficit de conocimientos de los mecanismos de actuación de los GPCR se encuentran su carácter de proteínas integrales de membrana y su presencia en concentraciones extremadamente reducidas. Por ello, uno de los caminos que se ha seguido es la clonación, expresión y purificación en células COS-1 (línea de fibroblastos de mono que están

inmortalizadas y expresan el antígeno T del virus 40 vacuolado del simio ó SV40), CHO o en otros organismos como E. coli.

Sin embargo, en muchos casos este procedimiento no lleva a ningún resultado debido a que la proteína se encuentra enteramente en cuerpos de inclusión, siendo prácticamente imposible su purificación.

1.1.2. Las taquiquininas y sus receptores específicos.

Las taquiquininas de mamíferos son una familia de péptidos neurotransmisores que comprenden la sustancia P, neuroquinina A y neuroquinina B. Recientemente, se han descubierto otros péptidos de la misma familia que, además, se encuentran en tejidos diferentes del nervioso. La sustancia P, la neuroquinina A y la neuroquinina B son péptidos de 10-11 aminoácidos que comparten la secuencia conservada -F-X-G-L-M-amida en la región C-terminal.

La sustancia P (SP; NH₃⁺-Arg+-Pro-Lys+-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂(SP) es un péptido de cadena corta identificado hace casi 80 años como neurotransmisor pero que, a pesar de su larga vida como molécula bien identificada, se ha resistido encarnizadamente a desvelar sus secretos, especialmente por lo que se refiere a su participación en la percepción del dolor. La SP ejerce sus acciones sobre las células a las que activa mediante su unión molecular a una proteína presente en la membrana de las células diana. Este complejo proteico-receptor de la SP se denomina receptor NK1 (de Neuro-Kinina 1) y su presencia determina si una célula nerviosa puede o no responder a las acciones de la SP. Se ha demostrado que esta molécula a altas concentraciones aumenta la liberación de metaloproteinasas (principalmente MMP-1, 3 y 11) y a bajas concentraciones disminuye los niveles de metaloproteinasas, tiene efecto vasodilatador potente y aumenta la vaso permeabilidad en los procesos inflamatorios.

En los mamíferos, se conocen tres receptores, NK1, NK2 y NK3 pertenecientes a la familia de GPCR. La activación de estos receptores por sus ligandos se ha implicado en numerosos procesos biológicos, desde la activación del sistema inmunológico o la transmisión del dolor, hasta la vasodilatación o la contracción del musculo liso. Antagonistas del receptor NK1 se han propuesto como droga para el tratamiento de ciertos cánceres. Los escasos estudios publicados sobre la(s) zona(s) de interacción ligando-receptor implican la región extracelular: principalmente, el segmento N-terminal y el bucle E2 (ver la Fig. anterior) como responsables de dicha interacción entre la sustancia P y NK1. Las predicciones de estructura secundaria del NK1 indican que el bucle E1 tendría una longitud de unos 10 aminoácidos, el bucle E2 unos 23, y el bucle E3 unos 12 aminoácidos.

1.1.3. Beneficios de la utilización de quimeras receptor-bacteriorrodopsina y receptor-rodopsina.

Esta primera parte del proyecto plantea utilizar la bacteriorrodopsina (BR) y la rodopsina (Rho) como modelos para estudiar la interacción neuropeptido-NK1 utilizando quimeras en las que se substituirá el segmento N-terminal y los bucles

extracelulares de la BR y de la Rho por los de NK1. Esta idea nace de la dilatada experiencia en la BR y la Rho, y de una serie de argumentos favorables:

1. La BR purificada puede obtenerse en cantidades importantes (del orden de 10 mg/l de cultivo en el caso de mutantes), y el proceso de crecimiento celular y purificación es sencillo y accesible.
2. La metodología de mutagénesis dirigida en el organismo homólogo ha sido ampliamente utilizada por diversos equipos.
3. Tanto la BR como la Rho poseen una molécula de retinal unida covalentemente. Esta molécula constituye una sonda que absorbe en el visible, y es muy sensible a los cambios estructurales de su entorno.
4. La función de transporte de protones y el fotociclo asociado, son asimismo altamente dependientes de las alteraciones estructurales introducidas en la BR (mutaciones, cambios en el entorno lipídico, pH, etc).
5. En particular, las propiedades de la BR son altamente sensibles a cambios en la zona extracelular de la BR en la que se propone insertar los bucles de los GPCR. Esto ha sido demostrado mediante mutaciones puntuales en Glu, Pro, Lys o Ser.
6. Mutaciones puntuales en diversos dominios de la Rho, que modifican la estructura global del receptor o la del entorno del retinal, son detectables fácilmente a través de los cambios en el espectro visible de la proteína. Asimismo, la interacción del intermediaTM activo Meta II, relativamente estable a temperatura ambiente, puede estudiarse fácilmente y constituye una prueba de la funcionalidad del receptor.
7. Existe experiencia en sustitución de bucles citoplasmáticos de la BR, en este caso por las secuencias correspondientes a los bucles de la rodopsina. Así, la quimera formada por la BR y el bucle 13 de la Rho ha sido expresada y purificada, lo que permite su estudio funcional y estructural.
8. La cristalización de la BR y mutantes en fase cúbica y otras metodologías ha permitido obtener diversas estructuras tridimensionales a resolución elevada.
9. La metodología de dilapidación de la BR y reconstitución en liposomas de composición variada ha sido ampliamente utilizada, por lo que será fácilmente aplicable a las quimeras indicadas.
10. Todas las metodologías que se pretende aplicar en este proyecto (construcción de las quimeras, comportamiento espectrofotométrico UV-Vis, espectrometría de infrarrojo -FTIR- para el estudio de la estructura secundaria, de diferencia, para el estudio de los intermediarios del fotociclo, transporte de protones, etc) han sido ampliamente utilizadas anteriormente en la BR y en la Rho tanto en sus formas nativas, WT recombinante y mutantes. Por ello, se conoce con precisión como analizar los efectos de los cambios inducidos por los bucles quiméricos o por la interacción de los ligandos.

1.1.4. Sistemas alternativos de estudio: receptores de neurotensina y de melanocortina.

Se admite en esta parte del Proyecto un cierto nivel de riesgo, centrado en la posible falta de expresión/incorporación a membrana de las quimeras del receptor de neuroquininas.

Por ello, se plantea una alternativa, centrada en otros receptores pertenecientes también a la familia de receptores GPCR, pero con características diferentes en sus bucles: el receptor de la neurotensina, y el receptor de melanocortina. La neurotensina es un neurotransmisor peptídico de 13 aminoácidos que se aisló por primera vez en el hipotálamo, por sus efectos sobre la vasodilatación e hipotensión local, es decir, sobre la presión sanguínea. Se encuentra en altas concentraciones en áreas involucradas en el comportamiento, como la amígdala, el núcleo accumbens, el locus coeruleus, la sustancia gris periacueductal, la habénula y en algunos núcleos hipotalámicos.

Estructura

Glu - Leu - Tyr - Glu - Asn - Lys - Pro - Arg - Arg - Pro - Tyr - Ile - Leu - COOH

Actúa sobre varias actividades biológicas (glucoreguladoras, hemodinámicas, músculo liso, neuroendocrinas, termoreguladoras y sistemas secretorios gástricos).

Posee un efecto sobre la presión sanguínea, la vasodilatación y la hipotensión local, además tiene otros efectos periféricos como la disminución de la actividad motora, estimulación de la contracción uterina, relajación del duodeno, incremento de la permeabilidad vascular y disminución de la secreción gástrica.

El receptor de la neurotensina, ejerce funciones, entre otras, de modulación de la transmisión dopaminérgica, tiene efectos hipotérmico y analgésico, y actúa como factor de crecimiento. Se ha propuesto el bucle E3 como sitio de interacción de la neurotensina con el receptor. Los receptores de la melanocortina son sensibles a los péptidos de melanocortina (hormona estimuladora de melanocitos y la hormona adrenocorticotrópica), estando involucrados en una gran variedad de funciones fisiológicas. Desde el punto de vista estructural, estos receptores poseen unos bucles extracelulares relativamente cortos, especialmente el E2 de solo 364 aminoácidos según los modelos. En este sentido, su parecido con la BR sería adecuado para la construcción de las quimeras.

1.2. La permeasa de Melibiosa

El transportador de melibiosa (MelB) es una proteína de membrana de *Escherichia Coli* que acumula alfa- o beta-galactósidos en el interior de la célula, gracias a la energía suministrada por los cationes Na⁺, H⁺ o Li⁺, contrasportados de forma simporte. Se estudió la proteína solubilizada en detergente doceilmaltósido y reconstituida en lípidos de *E.coli* en cuatro condiciones diferentes de sustratos: H⁺, Na⁺, H⁺ y melibiosa, y Na⁺ y melibiosa. El estudio de la MelB en H₂O realizado mediante espectroscopia de infrarrojo de transmisión reveló que la proteína de la forma reconstituida contiene un 50% de hélices, un 20% de lámina beta, un 17% de giros reversos y un 12% asignado a otros tipos de estructuras. Estos datos fueron reforzados por

los resultados de estructura secundaria obtenidos en D₂O. La cuantificación de estructura secundaria es coherente con el modelo de estructura secundaria que consta de 12 hélices transmembrana. Los resultados también revelaron cambios en las estructuras secundarias inducidos por los sustratos.

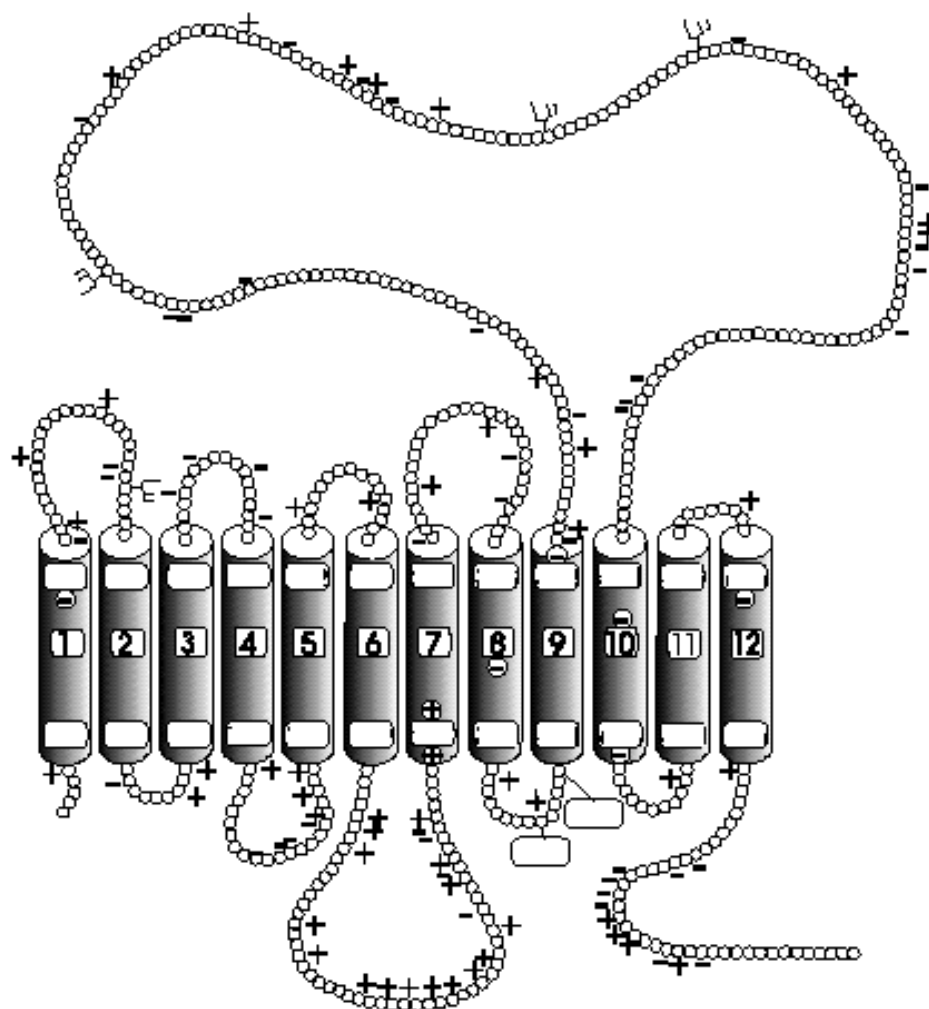


Figura 2. Representación esquemática de la permeasa de Melibiosa.

La accesibilidad global de las estructuras secundarias de la MelB al solvente acuoso se determinó mediante cinéticas de intercambio de D₂O. Los resultados revelaron una accesibilidad del 54% cuando la MelB se incubaba con Na⁺ o H⁺. Por el contrario, la adición del azúcar melibiosa resultó en una disminución de la accesibilidad al solvente acuoso en un 5-10%.

Un análisis más detallado de la accesibilidad reveló que la adición de azúcar protege principalmente las estructuras lámina beta. El análisis de espectros de infrarrojo de la MelB en H₂O y D₂O, obtenidos con radiación polarizada, reveló cambios en la orientación de las hélices según el sustrato unido. Se determinó que para la MelB unida al H⁺, con o sin melibiosa las hélices forman un ángulo normal de la membrana de 26°. Por el contrario, la adición de Na⁺ disminuye la orientación de las hélices hasta 36°.

1.2.1. El mecanismo de co-transporte catión-azúcar en la permeasa de melibiosa: estado actual y perspectivas.

En primer lugar, es importante subrayar que en el marco del proyecto aún vigente del Plan Nacional, se ha puesto a punto la metodología necesaria para obtener espectros de diferencia de infrarrojo de la MelB inducidos por sustratos, habiéndose obtenido resultados significativos. Esta metodología amplía enormemente las posibilidades de la espectroscopia de diferencia de infrarrojo, ya que permite analizar los cambios estructurales y de prolongación/desprotonación de diferentes sistemas proteicos producidos por la unión de moléculas pequeñas (sustratos, iones, etc.). La espectroscopia de diferencia en el infrarrojo, combinada con la mutagénesis dirigida, ha sido una de las aproximaciones más poderosas para obtener datos sobre el mecanismo de transporte de protones en la bacteriorrodopsina y en otros sistemas excitables por la luz (rodopsina, halorrodopsina, rodopsina sensorial, fotosistema I y II).

Por ello, la aplicación de la misma metodología a la permeasa de melibiosa debe permitir conocer que aminoácidos participan en la unión y en el transporte de los sustratos, y que cambios conformacionales tienen lugar durante el proceso. Dicho conocimiento será importante para avanzar en la comprensión del mecanismo molecular del transporte de azúcares, teniendo en cuenta la homología estructural con los transportadores de lactosa y de glucosa. A partir de la comparación de espectros de diferencia FTIR en H₂O y en D₂O, y del estudio de mutantes (D59C, R141C).

Por tal de profundizar en el estudio de los cambios conformacionales involucrados en las diferentes etapas del transporte se realizaron los espectros de diferencia del mutante R141C y de la MelB reaccionada con el reactivo NEM (N-etilmaleimida). Estas dos permeasas unen pero no transportan los sustratos, pero hasta día de hoy todavía no está claro en qué paso bloquean el transporte de los sustratos. El mutante R141C además de la mutación de la Arg consta de 4 mutaciones más que corresponden a la sustitución de las 4 Cys nativas de la MelB por 3 Ser y una Val. Por lo tanto, los espectros de diferencia del mutante R141C se comparan con los del mutante 3SV (permeasa sin Cys), que conserva aproximadamente las mismas propiedades que la MelB salvaje a la hora de unir y transportar los sustratos. Los espectros de diferencia del mutante R141C son diferentes que los espectros de diferencia del mutante 3SV. En cambio, los espectros de diferencia de la MelB reaccionada con NEM son muy parecido a los espectros de la MelB salvaje. Por lo tanto, se deduce que el mutante R141C tiene su transporte bloqueado en un estado anterior del transporte en comparación con la MelB reaccionada con NEM. En concreto, es probable que el mutante R141C sólo, una los sustratos, mientras que la MelB-NEM probablemente queda bloqueada en el estado que se denomina "cerrado" propuesto por el transporte simporte.

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

En este proyecto se plantea el estudio de la relación estructura-función de dos sistemas de membrana: el receptor de neuroquinina NK1, perteneciente al conjunto de receptores de péptidos acoplados a proteína-G, y la permeasa de melibiosa de E.coli. El receptor NK1 es activado principalmente por la sustancia P neuropéptido de 11 aminoácidos, aunque también tiene afinidad para las neuroquinas A y B, de 10 aminoácidos. En todos los casos la interacción se realiza por el segmento N-terminal de NK1, y los bucles extracelulares. El objetivo es obtener información estructural sobre la interacción de la sustancia P y las neuroquinas A y B con el receptor NK1 mediante la mutación del segmento N-terminal y los bucles extracelulares. El objetivo es obtener información estructural sobre la interacción de la sustancia P y las neuroquinas A y B con el receptor NK1 mediante la mutación del segmento N-terminal y los bucles extracelulares de la bacteriorrodopsina (BR) y de la rodopsina (Rho), por los del receptor NK1. La hipótesis es que la región extracelular de estas quimeras tendrá una estructura similar o igual a NK1, y por lo tanto se producirá la interacción de los neuropéptidos con una afinidad parecida al NK1. Las propiedades de la BR y de la Rho permitirán estudiar con detalle las características de dichas interacciones. La permeasa de melibiosa se obtiene purificada en cantidades suficientes para realizar estudios estructurales, tanto solubilizado en detergente como reconstituido en liposomas. Recientemente, nuestro grupo ha aplicado a este sistema la espectroscopia de diferencia en el infrarrojo, combinado con la obtención de mutantes puntual, para estudiar la unión de sustratos. La hipótesis es que esta metodología permite obtener información sobre el mecanismo del transporte, por lo que se plantea extender este estudio a nuevos mutantes.

2.3. Objetivos de las quimeras NK1/BR y NK1/Rho.

1. Expresar y purificar las quimeras NK1/BR y NK1/Rho en las que se habrán substituido el extremo N-terminal y los bucles extracelulares de la BR y/o de la Rho, por los del receptor NK1. Caracterizar dichas quimeras mediante métodos espectroscópicos que permiten obtener información sobre la estructura y la función de las mismas.
2. Determinar los lugares de interacción de los neuropéptidos, sustancia P, neuroquinina A y B con las quimeras, mediante la utilización de quimeras de composición diversa en cuanto a los bucles substituidos y el segmento N-terminal.
3. Obtener información precisa de que aminoácidos participan en las interacciones, tanto de las quimeras como de los neuropéptidos; conocer el papel de los mismos, desde el punto de vista de la naturaleza de las interacciones; determinar el papel de ciertas características estructurales, como el puente disulfuro entre el bucle E2 y el final de la hélice 3, o la secuencia W-X-Y/F-G presente en el bucle E2; determinar el posible papel de sitios de unión de cationes en la interacción neuropéptido-NK1.

2.4. Objetivos referentes a la permeasa de melibiosa

1. Obtener información sobre cambios producidos por la unión y traslocación de sustratos de la MelB, mediante FTR de diferencia:
 - a) Cambios en el estado de protonación y en las interacciones de aminoácidos.
 - b) Cambios conformacionales y cambios en la orientación de estructuras.
2. Asignar los cambios mediante:
 - a) Comparación de espectros obtenidos de la proteína silvestre y de mutantes.
 - b) Comparación de espectros en H₂O y en D₂O
 - c) Reconstitución en liposomas de composición lipídica diferente.

CAPÍTULO 3:

OBJETIVOS FORMATIVOS

El proyecto plantea el uso de técnicas de biología molecular (mutagénesis dirigida para obtener los mutantes), técnicas de purificación de proteínas de membrana y su reconstitución en liposomas, y la utilización de un amplio abanico de técnicas para estudiar los sistemas proteicos así preparados: técnicas espectroscópicas (espectroscopia UV-Vis, espectrofluorescencia, diversas variantes de la espectroscopia de infrarrojo, fotolisis de destello laser), y calorimetría diferencial de barrido.

La estrategia que se sigue en el equipo es que los alumnos deben aprender todas estas técnicas, ya que cada uno de ellos tiene asignado el estudio y observación de una serie de mutantes de BR, de Rho o de la permeasa de melibiosa. Por lo tanto, al terminar su periodo de prácticas, se posee una formación general, y se tendrá conocimientos para ser capaz de abordar y comprender el tratamiento de biología molecular de cualquier proteína, y realizar el estudio estructural y funcional posterior.

Se cree que esta manera de trabajar es mucho más enriquecedora para ellos que el sistema que se sigue en otros grupos, en los que cada becario se especializa solamente en una o dos técnicas, y luego se ponen en común el conjunto de resultados.

Finalmente, la composición del equipo (un total de cuatro doctores, de los cuales el investigador principal y dos profesores más dirigirán los trabajos de los becarios y profesores) garantiza la capacidad formativa necesaria para acoger los alumnos que mostraron y solicitaron interés en este estudio.

CAPÍTULO 4:

METODOLOGÍA

4.1. Métodos de preparación de material biológico

4.1.1. Preparación de membrana púrpura (bacteriorrodopsina).

La extracción y purificación de la membrana purpura se realiza según, de acuerdo con lo descrito en publicaciones anteriores del grupo. De forma abreviada, el proceso consiste en realizar una serie de centrifugaciones a 70.000xg (tres en NaCl 0,1 M, pH 7,0 y cuatro más en agua, pH 7,0), una vez el sedimento de células procedente del cultivo (en 4M NaCl) ha sido sometido a choque osmótico mediante diálisis contra NaCl 0,1 M en presencia de DNAsa para evitar la elevada viscosidad del DNA intacto. En estas condiciones de sedimentación, los componentes citoplasmáticos así como el resto de membrana celular quedan en el sobrenadante. Las cepas de halobacterium salinarum utilizadas tienen una elevada producción de membrana purpura y una muy baja producción de carotenoides. Por ello, las preparaciones finales de membrana purpura que se obtienen (con un rendimiento promedio de 16 mg por litro de cultivo) tienen un alto grado de pureza, la cual se comprueba sistemáticamente mediante electroforesis y espectroscopia UV-Vis.

4.1.2. Preparación de la rodopsina y la transducina.

La rodopsina que se utilizara como control en los estudios con mutantes, se extraerá a partir de retinas bovinas según una modificación del método de gradientes de sacarosa. Las proteínas solubles del sistema se eliminaran mediante lavados en tampón de baja fuerza iónica. La rodopsina se solubilizará en el detergente dodecil maltósido y se purificará por immunoafinidad con el anticuerpo monoclonal Rho1 D4.

La transducina (Gt) se obtendrá del sistema transductor de la rodopsina por ligamiento de esta a la rodopsina fotoactivada en condiciones de baja fuerza iónica, liberación por adición de GTP y purificación en columna de hexilagarosa. Se comprobará sistemáticamente la pureza de las preparaciones mediante electroforesis.

4.1.3. Incorporación de bacteriorrodopsina en liposomas y medida del bombeo de protones.

Se lleva a cabo la incorporación de bacteriorrodopsina en vesículas de fosfolípidos. Para la preparación de los liposomas, se purifica fosfatidilcolina procedente de yema de huevo y se almacena la solución en cloroformo a -20°C. La suspensión inicial de proteoliposomas se obtiene por la adición de la cantidad necesaria de membrana purpura en 150 mM KCl a pH 7,0 a un film seco de EPC obtenido por evaporación. Tras una agitación con vórtex (es un movimiento circular, a menudo turbulento, de flujo líquido; a velocidad y la tasa de rotación del líquido son mayores en el centro, y disminuye progresivamente con la distancia del centro). Tras una agitación de 10 minutos, se homogeniza a alta presión la suspensión resultante con un Microfluidizer 110S. La concentración usada de EPC es de 6 mg/ml y la relación lípido/bacteriorrodopsina es de 50:1 (peso/peso).

Las mediciones de los cambios de pH se realizan con un pH-metro bajo tenue luz roja a 25°C. Para evitar un gradiente de pH, las muestras permanecen a oscuras durante los 30 minutos previos a la toma de muestras, que se realiza mediante iluminación con luz amarilla de una intensidad de 80.000 lux. La tasa inicial de bombeo de protones se determina mediante un ajuste lineal de los primeros 10 segundos de iluminación.

4.1.4. Mutagénesis dirigida

El objetivo de la mutagénesis dirigida es modificar una proteína al cambiar un residuo aminoacídico por otro, al eliminar una parte, o añadir otra.

El punto inicial es tener el gen que codifica para la proteína de interés en un vector. Podemos cortar el trozo de DNA que codifica para la proteína con enzima(s) de restricción que deje extremos cohesivos, con lo que tras degradar el fragmento de DNA intermedio, se vuelve a juntar el DNA dando lugar a la obtención de un gen con la de lección deseada. De manera similar se puede insertar un fragmento de DNA que da lugar a la inserción de un trozo de cadena polipeptídica en la secuencia de la proteína.

Una variante de modificación de proteínas es la mutación puntual; se trata de modificar específicamente un o unos residuos concretos de la cadena polipeptídica. Existen varias variantes:

1. Mutagénesis dirigida sobre DNA cadena sencilla

Se tiene el DNA que codifica para la proteína insertada en un plásmido de cadena sencilla y procedemos como sigue:

- Determinamos el punto del DNA donde deberemos hacer la mutación para que dé lugar a la modificación aminoacídica.

- Se prepara químicamente un fragmento de DNA que sea complementario en al menos 15 pares de bases, pero que en el punto de la mutación este incorrecto.
- Se junta el plásmido mono-cadena con ese fragmento sintético con el mismatching. El error (mismatching) es tolerado si el fragmento es suficientemente largo, y se producirá el reconocimiento. El dúplex que se formará actuará como cebador y al añadir DNA polimerasa y DNA ligasa se acabará por formar el DNA circular de doble cadena. Este DNA se puede introducir en bacterias.
- Las bacterias se replicarán dando 2 plásmidos de los cuales uno será igual a la proteína nativa y el otro será el de la proteína mutada.
- Por procesos de selección se escogerá la línea de células que codifique para la proteína mutada, eliminando o despreciando las que den lugar a la proteína nativa.

2. Mutagénesis en cassette

Esta técnica trabaja con DNA de plásmidos de cadena doble, donde esta insertado el trozo de DNA que queremos mutar.

- Se corta el plásmido en el lugar que nos interesa con el enzima de restricción apropiado. El enzima debe dejar extremos cohesivos
- Se añade un "cassette", es decir un trozo de DNA de extremos cohesivos que contiene la mutación en cuestión ya incorporada.
- Se ponen ligasas para unir todo y al final tendremos una parte de plásmidos correspondientes a la proteína nativa, otros con una escisión, y otros que han incorporado la mutación. Se puede aumentar la concentración de cassette para incrementar el rendimiento. Esta técnica también se puede emplear para realizar mutaciones masivas (todos los posibles mutantes en una posición dada).

La mutagénesis dirigida tiene un gran campo de aplicaciones en el diseño de proteínas, aplicaciones que tienen interés tanto desde el punto de vista académico como industrial. Se puede por ejemplo modificar una proteína para hacer que sea inhibida por un determinado compuesto, o que sea resistente a la inhibición por un compuesto dado. También es posible diseñar proteínas hiperestables térmicamente, o con especificidad por sustrato cambiada.

4.1.5. Obtención, purificación y caracterización de la rodopsina salvaje y de las quimeras.

1. Clonación de las quimeras Rho/NK1 mediante técnicas de ingeniería genética. Se utilizarán protocolos para obtener los plásmidos mutantes a partir del gen sintético de la opsina. La clonación se realizará mediante cassette mutagénesis introduciendo las mutaciones requeridas mediante substitución del fragmento de restricción correspondiente en el gen sintético de la opsina clonado en el vector. La obtención de las secuencias mutadas correctas se verificará mediante secuenciación de ADN. Se realizará la transformación de

cepas bacterianas de E. Coli DH5 α , obteniéndose las correspondientes minipreps de ADN donde se comprobará la secuencia y posteriormente las preparaciones a gran escala (maxipreps) de ADN recombinante, las cuales también se secuenciarán para comprobar la introducción de la mutación deseada.

2. Expresión de los genes de las quimeras de opsina. Se expresarán los genes mutados a partir de un sistema de transfección transiente a partir de vectores. Las células se recolectarán 52-60 h después de la transfección, se lavarán y se regenerarán durante 3 h con 10 μ M 11-c/s-retinal antes de ser solubilizadas en 1 % (w/v) dodecil maltósido.
3. Purificación de las quimeras Rho/NK1. Las quimeras obtenidas se purificarán mediante inmunocromatografía en columna de Rho-1D4-Sepharose. Se eluirán con el péptido 340-348 correspondiente a los últimos 9 aminoácidos del extremo C-terminal (epítipo de reconocimiento del anticuerpo monoclonal utilizado), en un tampón que contenga 0.05% dodecil maltósido. Se comprobará el grado de regeneración con el retinal calculando la ratio A280/A500 en los espectros de absorción en el UV-Vis. Se realizarán también controles en electroforesis tanto por tinción con azul de coomassie como por tinción con Ag.

4.1.6. Preparación de la permeasa de melibiosa.

Dentro del campo de la mutagénesis dirigida, la obtención de dobles mutantes es una técnica de uso creciente durante estos últimos años, para muchas proteínas y también para la MelB. En el caso de la MelB, la técnica consiste en la incubación en placas de fermentación con melibiosa (de agar Mc Conkey) de mutantes de células de E. Coli con la función de transporte deficiente o casi deficiente. Al cabo de unos días empiezan a crecer colonias fermentadoras, las cuales una vez se ha analizado su DNA, contienen dos mutaciones que revierten el efecto de la mutación inicial individual. La interpretación de los resultados se basa en el hecho, que las dobles mutaciones obtenidas han de estar próximas a nivel 3D, porque se originan y así poder revertir el efecto de la primera mutación. Wilson and Wilson (1998), nos mostraron un trabajo que constaba en la obtención de dobles mutantes que revertían las primeras mutaciones de la Aspe124 por Ser, Ile o Phe. Los resultados indicaban que sólo los mutantes D124F y D124S daban alteraciones de la función y sólo el D124S daba dobles mutantes D124S/V375A y D124S/V375G, sugiriendo que la hélice IV donde se sitúa la Aspe124 y la hélice XI donde se sitúa la Vale375 están próximas. El papel de la Arg-52 también se estudió con más profundidad mutándola y obteniendo sus dobles mutantes, sugiriendo que la inserción de cargas positivas a las hélices transmembrana neutralizan el efecto de la pérdida de esta arginina. Más concretamente, la hélice II está próxima a las hélices Y, IV, y VII por medio de un puente salino entre la Arg-52 y la Arg-55 (hélice II) y la Aspe-19 (hélice Y). La combinación de la técnica de mutagénesis dirigida sustituyendo aminoácidos por cisteínas y la adición de reactivos sulfhídricos que reaccionan con ellas, también supone una buena herramienta de estudio para la ubicación de aminoácidos dentro la estructura topográfica predicha.

4.1.7. Mutagénesis dirigida de la permeasa de melibiosa.

Utilizando la técnica de PCR, se construye el plásmido pK95AAHB, con una cassette conteniendo el gen de la MelB que codifica para la permeasa con la secuencia 6 His en el segmento C-terminal, y además con sus 4 Cys mutadas a Val y Ser (MelB sin Cys). Las células de E.coli DW2-R (Ame/B, A/acZV) se transforman utilizando el plásmido conteniendo la MelB mutada. Después de mezclar el DNA plasmídico con las células DW2-R, se incuban durante 45 min en hielo, después 3 min en un baño a 40°C y finalmente se enfrían a temperatura ambiente. La suspensión celular se incuba durante 1 h en 2 ml del medio de cultivo Luria a 30°C. Posteriormente, 100 µl de la suspensión se dispersan en un disco Petri conteniendo agar LB y ampicilina (100 µg/ml) y se incuba a 30°C. Células recientemente transformadas se crecen a 30°C en medio M9 suplementado con glicerol (5 µg/l), ácido casamino (0.2%), tiamina (0.5 mg/l), y ampicilina (100 µg/ml) hasta que se alcanza una absorbancia de 1,0 -1,2 a 600 nm. Las células se lavan y se vuelven a suspender en 0,1 M KPi a pH 7,0.

4.2. Métodos espectroscópicos.

4.2.1. Espectroscopia de infrarrojo a transformada de Fourier.

Esta técnica espectroscópica se utiliza en los estudios estructurales de las quimeras, constituye una de las técnicas espectroscópicas que más posibilidades ofrece para el estudio de la estructura secundaria de las proteínas de membrana. Utilizando métodos avanzados en el tratamiento matemático de los espectros se pueden obtener, en disolución o suspensión, de las proteínas estudiadas, espectros de gran calidad y por tanto, conocer aspectos importantes de la estructura secundaria de las proteínas estudiadas y a la vez de su entorno lipídico. A partir de los espectros obtenidos secuencialmente a distintos tiempos podremos obtener información de la accesibilidad de las distintas poblaciones de hidrógenos al medio externo.

En general los espectros se realizan con las muestras reconstituidas en liposomas. En el análisis de estructura secundaria, los espectros de absorción, una vez restada la contribución del agua líquida, se deconvolucionan empelando unos valores de anchura de banda y factor de deconvolución conocidos dependiendo de la relación señal/ruido. Se entiende por deconvolución el proceso que mejora las imágenes tomadas, el proceso depura las imágenes, utilizando una serie de cortes de la muestra el programa reconoce la luz fuera de foco, proporcionándonos una imagen más limpia y con más detalle. De forma sistemática se obtienen también los espectros deconvolucionados por el método de máxima entropía con el fin de obtener unas estimaciones lo más fiables posibles. Se obtienen asimismo los espectros de derivadas en el espacio de Fourier, lo cual permite determinar con exactitud la posición de las bandas constituyentes. Después realizamos el ajuste de bandas sobre el espectro deconvolucionado, lo cual permite obtener una estimación del porcentaje de estructura secundaria de la proteína.

4.2.2. Espectroscopia de fluorescencia.

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan

al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres órdenes de magnitud mejor que las de la espectroscopia de absorción. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que se pueden hacer fluorescer.

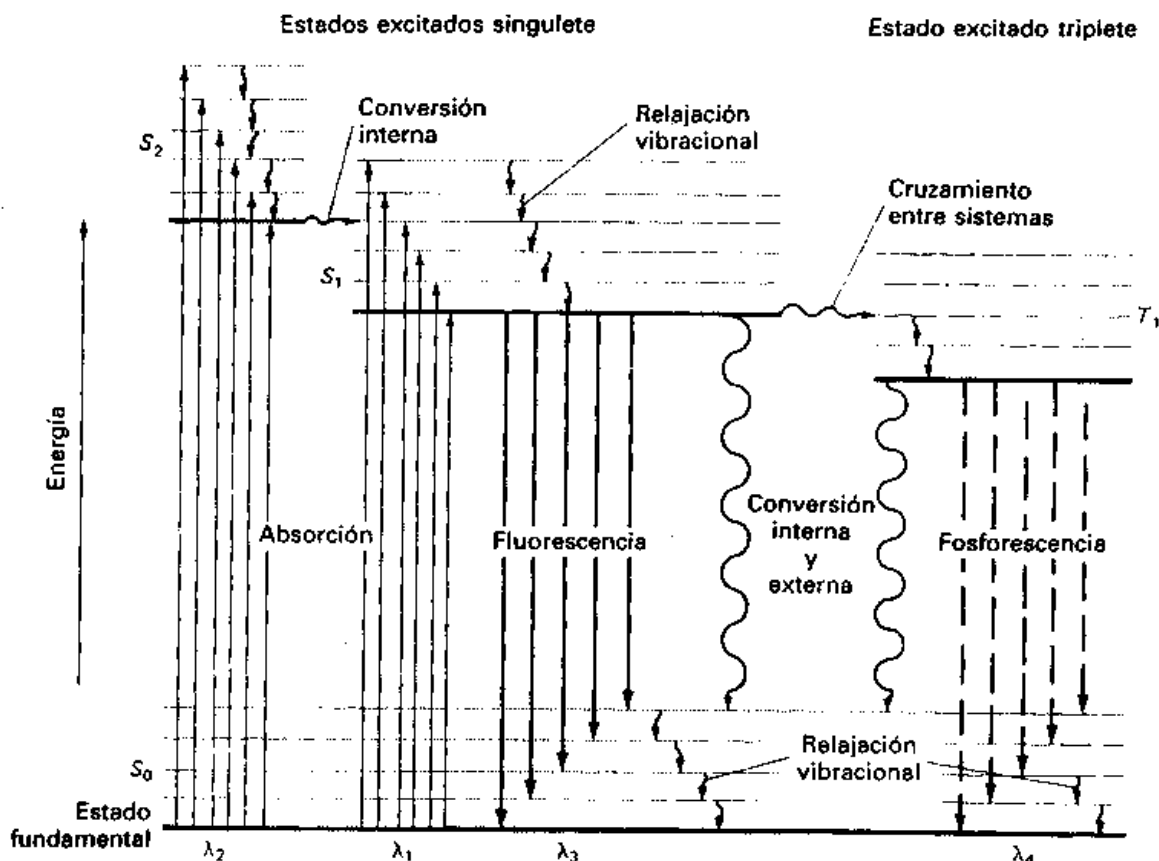


Figura 3. Teoría de la fluorescencia molecular.

Normalmente, el tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. Dos de las más importantes de estos mecanismos son la relajación (desactivación) no radiante y la relajación fluorescente.

1. La relajación vibracional, señalada por las flechas onduladas cortas entre los niveles de energía vibracionales, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas del disolvente en una serie de etapas como se indica en la figura. La ganancia de energía vibracional del disolvente se refleja en un ligero incremento de la temperatura del medio. La relajación vibracional es un proceso tan eficiente que el tiempo de vida promedio de un estado vibracional excitado es de 10^{-15} s.

2. También puede ocurrir el relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Este tipo de relajación llamado algunas veces conversión interna, se ilustra por las flechas onduladas largas.

Las variables que afectan a la fluorescencia son:

1. Rendimiento cuántico: El rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Las moléculas altamente fluorescentes, por ejemplo, la fluorescencia, tienen eficiencias cuánticas que, en ciertas condiciones, se aproximan a la unidad. Las especies no fluorescentes tienen eficiencias que son prácticamente cero.
2. Estructura: La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación. La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia. Además, la sustitución afecta frecuentemente la eficiencia de la fluorescencia.
3. Rigidez estructural: Empíricamente se encuentra que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelatantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico
4. Temperatura y disolvente: La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante (conversión externa). Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado.
5. Efecto del pH: La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Por lo tanto será muy frecuente en los métodos fluorimétricos el control estricto del pH.
6. Efecto de la concentración: La potencia de la radiación fluorescente F es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema.

$$F = K'(P_0 - P) \quad (1)$$

Donde P_0 es la potencia del haz incidente sobre la disolución y P es su potencia después de atravesar la longitud b del medio. La constante K' depende de la

eficacia cuántica del proceso de fluorescencia. Con objeto de relacionar F con la concentración c escribimos la ley de Beer así:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc} \quad (2)$$

Sustituyendo nos queda:

$$F = K' P_0 (1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (3)$$

Si desarrollamos el término exponencial como una serie de Maclaurin será:

$$F = K' P_0 \left[2,303\epsilon bc - \frac{(2,303\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303\epsilon bc)^3}{3!} \right] \quad (4)$$

Siempre que $2,303\epsilon bc < 0,05$ podemos escribir que:

$$F = K' P_0 2,303\epsilon bc \quad (5)$$

Y si P_0 se mantiene constante:

$$F = K_C \quad (6)$$

Cuando c es suficientemente elevada como para que la absorbancia multiplicada por 2,303 sea mayor que 0,05, los términos de mayor orden de la expresión anterior no son despreciables y la linealidad se pierde. Este efecto es un resultado de auto apagamiento, en el cual las moléculas del analito absorben la fluorescencia producida por otras moléculas de analito.

4.2.3. Espectrofotometría UV-Vis.

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano).

En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas.

Esta técnica es complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que trata con transiciones desde el estado excitado al estado basal, mientras que la espectrometría de absorción mide transiciones desde el estado basal al estado excitado.

La espectrometría UV/Vis se aplica y se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

1. Soluciones de iones metálicos de transición: las soluciones de iones metálicos de transición pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido

a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos. Por ejemplo, el color de una solución diluida de sulfato de cobre es muy azul; agregando amoníaco se intensifica el color y cambia la longitud de onda de absorción máxima.

2. Compuestos orgánicos: los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico. La tirosina, por ejemplo, aumenta su máximo de absorción y su coeficiente de extinción molar cuando aumenta el pH de 6 a 13, o cuando disminuye la polaridad de los disolventes.

Aunque los complejos de transferencia de carga también dan lugar a colores, éstos son a menudo demasiado intensos para ser usados en mediciones cuantitativas.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. Es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias (las tablas de coeficientes de extinción molar) o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración.

El espectrofotómetro UV/Vis puede utilizarse como detector para la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). La presencia de un analito da una respuesta que puede ser proporcional a la concentración. Para resultados precisos, la respuesta del instrumento al analito debe compararse con la respuesta a un estándar, lo que es muy similar al uso de curvas de calibración. La respuesta (por ejemplo, el pico de altura) para una concentración particular se conoce como factor de respuesta.

La ley de Beer-Lambert enuncia que la espectrometría UV-Vis se utiliza con mayor frecuencia en forma cuantitativa para determinar las concentraciones de especies absorbentes en solución, usando la Ley de Beer-Lambert:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot C \cdot L \quad (7)$$

Donde A es la absorbancia medida, I_0 es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda, I es la intensidad de transmisión, L la longitud de ruta a través de la muestra, y c la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda, ϵ es una constante conocida como absortividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad

fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular, y tiene como unidades $l/M * cm$ o, a menudo, $U/M * cm$.

La absorbancia y extinción ϵ a veces son definidas en términos de logaritmo natural en lugar de logaritmo de base 10.

La ley de Beer-Lambert es útil para la caracterización de muchos compuestos, pero no sirve como relación universal para la concentración y absorción de todas las sustancias. En moléculas complejas de gran tamaño, como los tintes orgánicos (Xylenol Naranja o Rojo Neutro, por ejemplo), a veces se encuentra una relación polinómica de segundo orden entre la absorción y la concentración.

Para realizar una espectrofotometría UV-Vis, el instrumento utilizado se llama espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I_0). La relación I / I_0 se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T). La absorbancia (A) se basa en la transmisión:

$$A = -\log(\%T) \quad (8)$$

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de luz (a menudo una bombilla incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz, y un detector. El detector suele ser un fotodiodo o un CCD. Los fotodiodos se usan con monochomadores, que filtran la luz de modo que una sola longitud de onda alcanza el detector. Las rejillas de difracción se utilizan con CCDs, que recogen la luz de diferentes longitudes de onda en píxeles.

Un espectrofotómetro puede ser único o de doble haz. En un instrumento de un solo haz, toda la luz pasa a través de la célula muestra. La I_0 debe medirse retirando la muestra. Este fue el primer diseño, y todavía está en uso en la enseñanza y laboratorios industriales.

En un instrumento de doble haz, la luz se divide en dos haces antes de llegar a la muestra. Un haz se utiliza como referencia, y el otro haz de luz pasa a través de la muestra. Algunos instrumentos de doble haz tienen dos detectores (fotodiodos), y el haz de referencia y el de la muestra se miden al mismo tiempo. En otros instrumentos, los dos haces pasan a través de un bloqueador que impide el paso de un haz. El detector alterna entre la medida del haz de muestra y la del haz de referencia.

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras suelen ser colocadas en una célula transparente, conocida como cubeta. Las cubetas suelen ser rectangulares, con una anchura interior de 1 cm. Esta anchura se convierte en la longitud de ruta, L , en la Ley de Beer-Lambert. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque son comunes las de vidrio o plástico. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles.

Los espectros ultravioleta-visibles son esencialmente un gráfico de absorbancia de luz frente a una longitud de onda en el rango del ultravioleta o la luz visible. Este espectro puede ser producido directamente con los espectrofotómetros más sofisticados, o bien pueden registrarse los datos de una sola longitud de onda con los instrumentos más simples. La longitud de onda se representa con el símbolo λ . Del mismo modo, para una determinada sustancia, puede hacerse un gráfico estándar del coeficiente de extinción (ϵ) frente a la longitud de onda (λ). Este gráfico estándar sería efectivamente "la concentración corregida" y, por tanto, independiente de la concentración. Para una sustancia determinada, la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se llama λ_{max} , y se pronuncia "lambda-max".

Las reglas de Woodward-Fieser son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir λ_{max} , la longitud de onda de la absorción UV-Vis, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas.

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Vis no es, sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado. La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos, así como las variaciones en la anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.

CAPÍTULO 5:

BENEFICIOS DEL

PROYECTO

El proyecto plantea, por una parte, el estudio a nivel molecular del mecanismo de interacción del receptor de neuroquininas NK1 con los neuropéptidos SP, NKA y NKB. Por otra parte, se pretende estudiar el mecanismo de co-transporte catión-azúcar de la permeasa de melibiosa. En el primer caso, se quiere obtener información concreta de los detalles de dichas interacciones, para poder determinar que aminoácidos intervienen en las interacciones, y que otros aminoácidos o estructuras que no interaccionan directamente, son importantes para asegurar la correcta disposición en el espacio de los primeros. El enfoque planteado trata de simplificar al máximo el sistema de estudio, empleando la bacteriorrodopsina y la rodopsina como moldes a los que se les cambia las zonas extracelulares por los bucles del receptor. A pesar de esta simplificación, creemos que los resultados que se obtengan del proyecto contribuirán de forma importante a desvelar los mecanismos de activación del receptor NK1. Por lo tanto, aparte del importante avance científico que ello representaría, existe un beneficio primordial, consistente en la posibilidad, a largo plazo, de diseñar fármacos con actividad inhibidora o antagonista de los neuropéptidos naturales, o con actividad potenciadora o agonista. Creemos que nuestro enfoque posibilitaría el diseño de unos fármacos con mayor capacidad moduladora de la actividad del receptor NK1, ya que los actuales que se ensayan presentan un bloqueo total de dicha actividad.

CAPÍTULO 6:

BIBLIOGRAFÍA

<http://mmb.pcb.ub.es/em/PDF/TEMA11.pdf> (Consultada en 21/12/2008)

http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible (Consultada en 10/12/2008)

http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1010105-221258//ndc1de1.pdf (Consultada en 03/01/2009)

<http://www.ugr.es/~decacien/Planes/Quimica/Plan%201997/temarios/671111d-archivos/fundamentos/SEMINARIO%203.PDF> (Consultada en 03/01/2009)

http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/Biofvirtual/Emi.pdf (Consultada en 19/12/2008)