



---

**Universidad de Valladolid**

# **Producción y caracterización de nuevos polímeros derivados de la elastina para ingeniería cardiovascular.**

Fernando Pérez Yáguez

DIRECTOR: Francisco Javier Arias Vallejo

Valladolid, Julio 2018

## **-ÍNDICE**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1-INTRODUCCIÓN</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1-Elastina  | 3         |
| 1.2-Los polímeros tipo elastina (ELP, "Elastin Like Polymers")                | 3         |
| 1.3- Aplicaciones de los ELRs   | 5         |
| 1.4-Metaloproteasas   | 6         |
| <b>2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>  | <b>6</b>  |
| <b>3-MATERIALES Y METODOS</b>   | <b>6</b>  |
| 3.1-Materiales  | 6         |
| 3.1.1. Materiales biológicos  | 6         |
| 3.1.2. Reactivos químicos   | 7         |
| 3.1.3. Soluciones tamponadas  | 7         |
| 3.2-Métodos   | 8         |
| 3.2.1 -Elaboración de geles de acrilamida y electroforesis.                   | 8         |
| 3.2.2-Elaboración de geles de agarosa.  | 8         |
| 3.2.3-Screening de colonias.  | 8         |
| 3.2.4-Producción de polímero  | 9         |
| 3.2.5 -Purificación y caracterización de polímero.                            | 11        |
| 3.2.6 -Estudio de degradación   | 12        |
| 3.2.7 -Modificación del ELR con azida y caracterización del polímero          | 12        |
| <b>4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | <b>13</b> |
| 4.1-Construcción, producción y caracterización del polímero VOKHis6tag        | 13        |
| 4.1.1-Construcción del plásmido para VOKHis6tag                               | 14        |
| 4.1.2- Gel analítico p7RARE VOKHis6tag col1-4 <i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I      | 15        |
| 4.1.3-Bioproducción del polímero VOKHis6tag.                                  | 16        |
| 4.1.3-Purificación de polímero VOKHis en columna.                             | 17        |
| 4.1.4-Caracterización del polímero  | 18        |
| 4.2-Construcción, producción y caracterización del polímero VKVMMPsShKHis6tag | 19        |
| 4.2.1-Construcción del plásmido para VKVMMPsShKHis.                           | 21        |
| 4.2.2-Bioproducción del polímero VKVMMPsShKHis6tag.                           | 22        |
| 4.2.3-Purificación de polímero VKVMMPsShKHis6tag en columna.                  | 23        |
| 4.2.4-Caracterización del polímero VKVMMPsShKHis6tag.                         | 24        |
| 4.2.5 - Ensayo de degradación.  | 25        |
| 4.2.6-Modificación del polímero con azida.                                    | 26        |
| <b>5-CONCLUSIONES</b>   | <b>29</b> |
| <b>6-BIBLIOGRAFIA</b>   | <b>30</b> |

## 1-INTRODUCCIÓN

Las proteínas poseen unas propiedades que son fruto de miles de años de evolución en los que solo los mejores diseños han perdurado. A raíz de esto existe un interés en la creación de materiales que repliquen o mejoren dichas propiedades con otras que no se encuentran presentes en el biomaterial natural creando compuestos derivados. Un ejemplo de este planteamiento son la elastina y los polímeros tipo elastina.

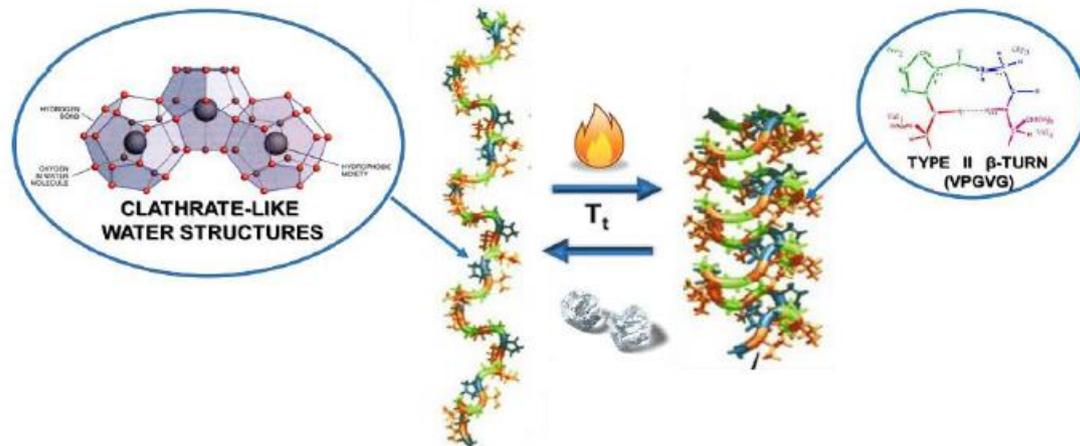
### 1.1 -Elastina

La elastina es una proteína con un peso molecular de 70 kD formada por una cadena de aminoácidos con una región apolar y otra polar. Juega un papel principalmente estructural constituyendo la matriz extracelular (ECM) al mismo tiempo que interviene en la reparación de los tejidos. Su papel principal es aportar elasticidad a los tejidos. La secuencia de aminoácidos que la componen consta de tres regiones compuestas por motivos repetidos como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG. Estos motivos confieren una estructura responsable de una serie de propiedades mecánicas (elasticidad, resistencia a la fatiga, durabilidad, auto ensamblado, insolubilidad, gran cantidad de aminoácidos apolares) y fisiológicas (quimiotaxis, proliferación, remodelado de la ECM, adhesión celular).

### 1.2 -Los polímeros tipo elastina (ELP, "Elastin Like Polymers")

Son polipéptidos artificiales que replican los motivos repetidos presentes en la elastina natural. Los polímeros tipo elastina más comúnmente utilizados consisten en repeticiones del motivo (VPGXG) repetido n veces, donde "X" puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, debido a que es el único aminoácido proteinogénico cuya  $\alpha$ -amina es una amina secundaria en lugar de una amina primaria que se une a su cadena lateral cíclica compuesta por 3 unidades de metileno pudiendo interferir con las funciones del polímero. Ej: [(VPGVG)<sub>2</sub>(VPGEG)(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>

Debido a que la obtención ELP por medios naturales o químicos no es eficiente debido al elevado coste, el largo tiempo que requiere, la composición solo está definida en términos estadísticos, el peso molecular del polímero resultante es heterogéneo y generan contaminación medioambiental; se están produciendo por medio de la elaboración de genes sintéticos específicos y su introducción en microorganismos determinados, mediante técnicas de DNA recombinante y el empleo de la biotecnología en microorganismos, nos permite obtener un polímero recombinante se les está empezando a llamar polímeros recombinantes tipo elastina (ELR, "Elastin Like Recombinamers"). La similitud en su secuencia con la elastina natural les permite mantener sus propiedades mecánicas, la biocompatibilidad, la naturaleza termosensible, su naturaleza hidrófoba y apolar, la transición inversa con cambios de temperatura y el comportamiento autoensamblable; además de otras propiedades añadidas que les confiere el diseño específico de la composición de sus bloques, añadiendo nuevas características y propiedades de interés como nivel de complejidad, la monodispersidad del polímero, la citotoxicidad, la capacidad condensación o la capacidad de tamponamiento.



**Ilustración 1- cambios estructurales durante la transición inversa de los ELR. La cadena extendida, con la estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de la cadena polimérica, y plegada de los ELR, con la horquilla  $\beta$  que forman los aminoácidos de la cadena polimérica por encima de la  $T_t$  de cada proceso.**

El conjunto de sus propiedades y características hace que los ELR se consideren moléculas controladas por las características del ambiente en que se encuentran y polímeros inteligentes, dada su capacidad de modificarse en función de las características del microambiente en el que se encuentran (concentración polimérica, la longitud del ELR, la composición aminoacídica, el pH o la fuerza iónica).

Se pueden encontrar en dos conformaciones:

- Conformación plegada y ordenada: se caracteriza por presentar una estructura de horquilla  $\beta$  en la que se disponen los motivos responsables de la elasticidad y el comportamiento hidrofóbico hacia el exterior que imposibilita la interacción del ELR con las moléculas de agua, mientras en el interior quedan orientados las cadenas proteicas y los puentes de hidrogeno, que interactúan entre sí dando mayor estabilidad al interior de la estructura, además de un comportamiento hidrofílico
- Conformación estirada: el ELR se encuentra desordenado y estableciendo interacciones con moléculas de agua mediante hidratación hidrofóbica formando estructuras de tipo clatrato.

Estas conformaciones pueden intercambiarse mediante un proceso reversible denominado transición inversa con la temperatura (ITT) [1], en el que tanto los ELR como la elastina natural cambian su conformación, de forma pasiva y sin perder energía, pasando de su forma estirada-desordenada a su forma plegada-ordenada al aumentar la temperatura. Este proceso recibe este nombre porque es opuesto al que acontece en la desnaturalización común de las proteínas, estableciéndose así una temperatura de transición ( $T_t$ ) que corresponde a la temperatura en la que tiene lugar el cambio conformacional en cada sentido de la transición, de manera que si la temperatura es mayor que  $T_t$  los ELRs pasan a su conformación plegada y si la temperatura es menor que  $T_t$  pasaran a su estado estirado. Esto se debe al carácter

hidrofóbico de la molécula, responsable de que trate de interactuar consigo misma plegándose en una sucesión de horquillas  $\beta$  que se superponen en espiral (denominada espiral  $\beta$ ) para separarse de las moléculas de agua, de manera que al aumento del orden del polímero al plegarse sobre sí mismo y estableciendo interacciones que favorecen una estructura estable. Un ejemplo de ello es que, en un medio acuoso, al sobrepasar la temperatura de transición, diferente según la composición de los aminoácidos de la cadena polipeptídica y su proporción respecto al agua, tiene lugar una recolocación de las moléculas de agua permitiendo que la cadena polipeptídica se enrolle de forma entropicamente favorable dado que el orden adquirido por el ELR es compensado por el desorden que adquieren las moléculas de agua, siendo así  $\Delta G < 0$ .

Este ha sido el principal motivo de que ELR hayan despertado un gran interés en la comunidad científica, que ha dado lugar al desarrollo de polímeros y recombinameros tipo elastina.

Entre otro de los intereses de los ELR se encuentran la posibilidad de elaborar construcciones quiméricas [5], que consisten en la fusión del ELR con una proteína de interés que le confiera al polímero resultante unas características y propiedades adicionales que no puede poseer de manera natural y que tienen un interés funcional, como podría ser el caso de añadir elastómeros o colas de histidinas (His), que ayudan al correcto plegamiento del polímero, facilitan su purificación, previenen la agregación no deseada del polímero y evitan la degradación mediada por proteasas.

### 1.3- Aplicaciones de los ELRs

Sus propiedades mecano-elásticas, biocompatibilidad, comportamiento termosensible y múltiples aplicaciones convierte a los ELR en un objeto de investigación interesante, lo que ha dado lugar al aumento progresivo del número de aplicaciones en las ramas de la biotecnología, ingeniería y biomedicina. Como sería el caso de: usarse para el direccionamiento específico de la proteína diana, el transporte de proteínas farmacéuticas activas, elaborar superficies inteligentes, bioseparación, la ingeniería de tejidos y la cosecha de células [2, 3, 4].

→ ELRs para tratar defectos cardiovasculares.

El enfoque actual para tratar defectos vasculares consiste en llevar a cabo la angioplastia de un stent, un tubo pequeño y autoexpandible, mediante un cateterismo en un vaso sanguíneo o arteria que se haya cerrado u obstruido, con el fin de reabrirlo permitiendo el flujo normal de sangre al músculo cardíaco.

Los ELR pueden utilizarse para recubrir un stent [8], dándole elasticidad en condiciones de alto flujo sanguíneo y permitiendo que en caso de sufrir deformación o despliegue no ocasione daños, su biocompatibilidad permite una adherencia mínima de plaquetas y adsorción de fibrina tras la exposición a sangre, y permiten añadir nuevas propiedades al conjunto por medio de la adición de nuevos bloques funcionales en los ELRs. Este enfoque permite generar stents recubiertos con ELRs que excluyen la placa del torrente sanguíneo, evitando un posible desarrollo trombogénico, y tienen alta biocompatibilidad, hemocompatibilidad fisiológica y respuesta reducida del sistema inmune frente a la estructura.

#### 1.4-Metaloproteasas

Las metaloproteasas, son un tipo de enzima proteolítica que juega un papel fundamental en procesos de curación de heridas, la angiogénesis, etc.; y se localiza en la matriz extracelular [9, 10]. El interés de que estas enzimas tengan unos niveles de expresión superiores a los normales plantea la posibilidad de usarse junto a nuevos bloques que se introduzcan dentro de los ELR para regular o controlar los momentos en que otros bloques puedan llevar a cabo sus funciones, por medio de secuencias de reconocimiento específicas de metaloproteasas concretas.

#### 2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A raíz de las propiedades de los ELRs cabe plantear la hipótesis de que es posible bioproducir polímeros, que después de modificarse químicamente se utilicen para elaborar hidrogeles por entrecruzamiento covalente, capaces de recubrir stents. Mediante la incorporación de un bloque funcional que inhibe canales de potasio dependientes del voltaje, como el péptido ShK, unido al ELR a través de secuencias de reconocimiento específicas para metaloproteasas, que modulen su liberación. De esta forma se podría reducir la respuesta autoinmune frente al stent en los casos en que tienen lugar complicaciones como la restenosis.

Por tanto los objetivos de este trabajo son:

- Bioproducir, purificar los biopolímeros utilizado durante el trabajo.
- Modificar y caracterizar biopolímeros resultantes del proceso

#### 3-MATERIALES Y METODOS

##### 3.1-Materiales

###### 3.1.1. Materiales biológicos

→Cepas bacterianas

He utilizado 2 cepas bacterianas de *Escherichia coli*, de la casa comercial Angilent, como sistemas heterólogos de expresión: XL-1 Blue Competent Cells para las ligaciones, y XL-1 Blue Subcloning Grade Competent Cells para los subclonajes.

→Medios de cultivo bacteriano

Los medios de cultivo utilizados para la producción de cepas bacterianas son:

- **Medio LB:** es un medio utilizado para el crecimiento de las bacterias cuyas propiedades no fomentan la sobreexpresión de la proteína o polímero codificado en la bacteria. Se prepara disolviendo 25g de medio por litro de agua destilada, suplementado con glucosa al 1% y con un antibiótico adecuado, en este caso, Ampicilina en concentraciones de 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Se autoclava a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos para conseguir su esterilidad.
- **Medio TB:** Este medio tiene la propiedad de fomentar la sobreexpresión de la proteína de interés, gracias a la presencia de lactosa. Se preparan 55.55 gramos de medio por litro de agua destilada en la que se disuelven: 8mL/L de glicerol y 100  $\mu\text{L}/\text{L}$  de antiespumante Antifoam 204 y 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (screening) o 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (producción) ampicilina. Se autoclava a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos para conseguir su esterilidad.

- **Medio de Agar+LB:** Se prepara medio LB, como he explicado anteriormente, y se añaden 15g/L de agar. Este medio se usa para preparar placas de cultivo.
- **Medio SOC I:** es el medio utilizado durante la transformación bacteriana. Se conserva dentro de la estufa a 37°C

→ Enzimas de restricción para modificar el DNA

Las enzimas de restricción utilizadas han sido: *Eco RI*, *Ear I*, *XhoI*, *XbaI* y *Sap I*, así como la ligasa *T4 DNA ligasa* (Thermo Scientific) y las enzimas de desfosforilación *FastAP* y *SAP I*.

→ Vectores plasmídicos

- **pDrive All**  
Para la clonación del material genético fue el vector de clonación pDrive All, mutado por el grupo BIOFORGE, de 3851 pares de bases, con un sitio de reconocimiento para la acción de las enzimas de restricción, *Sap I* y *Ear I*, de manera que los cortes quedan flanqueando la región del material genético a modificar, insertando del material genético codificante el polímero ELR.
- **p7RARE**  
Para la expresión y producción del polímero se utiliza un vector de expresión P7RARE de 5546 pb. Posee sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción mencionadas en el apartado anterior, pero invertidas, que permiten la introducción de insertos dentro de las regiones que flanquean haciendo desaparecer las secuencias no codificantes.

### 3.1.2. Reactivos químicos

| Reactivo   | Casa comercial                    | Reactivo   | Casa comercial                    |
|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)               | <a href="#">Apollo Scientific</a> | Glicerol   | Merck                             |
| Buffer fosfato salino (PBS)                          | <a href="#">Gibco</a>             | Agarosa  | <a href="#">Cambrex</a>           |
| Ácido Clorhídrico                                    | Merck                             | Hidróxido sódico   | <a href="#">Panreac</a>           |
| Fluorido fenil-metan-sulfonil (PMSF)                 | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     | Agarosa <a href="#">MetaPhor</a>                         | <a href="#">Cambrex</a>           |
| Ácido acético  | Merck                             | <a href="#">Isopropanol</a>                              | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     |
| <a href="#">Acrilamida/Bisacrilamida</a>             | <a href="#">Amresco</a>           | Ampicilina   | <a href="#">Formedium</a>         |
| <a href="#">Azul comassie</a>                        | <a href="#">Fluka</a>             | <a href="#">Kanamicina</a>                               | <a href="#">Formedium</a>         |
| <a href="#">Leupeptin</a>                            | <a href="#">Apollo Scientific</a> | Azul de bromofenol                                       | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     |
| Cloruro de cobre                                     | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     | E-64   | <a href="#">Apollo Scientific</a> |
| <a href="#">Persulfato amónico (PSA)</a>             | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     | <a href="#">2--mercaptoetanol (2-ME)</a>                 | Merck                             |
| Cloruro de sodio                                     | Merck                             | Etanol   | <a href="#">Merk</a>              |
| <a href="#">Pepstatin A</a>                          | <a href="#">Apollo Scientific</a> | <a href="#">β-Mercaptoetanol</a>                         | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     |
| D(+)-Glucosa   | <a href="#">Panreac</a>           | NaCl   | <a href="#">Scharlau</a>          |
| <a href="#">Tetrametilen diamin (TEMED)</a>          | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     | KCl  | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     |
| <a href="#">Dodecilsulfato sódico (SDS)</a>          | <a href="#">Merk</a>              | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                         | <a href="#">Scharlau</a>          |
| <a href="#">Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)</a> | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                          | <a href="#">Fluka</a>             |
| <a href="#">Imidazol</a>                             | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     | NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Sulfato de níquel) | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     |
| DMF  | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     | DMSO   | <a href="#">Sigma Aldrich</a>     |
| <a href="#">Antifoam 204</a> , antiespumante         | <a href="#">Sigma</a>             | <a href="#">HisPur Ni-NTA</a>                            | <a href="#">Thermo scientific</a> |
| <a href="#">Guanidine hydrochloride</a>              | <a href="#">Sigma</a>             |  |                                   |

### 3.1.3. Soluciones tamponadas

- PBS: 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4, NaCl 140mM.
- TAE: 1mM EDTA pH 8, 40mM Tris-acetato.
- Tampón de electroforesis 5x (1 L y pH 8.3): Tris-base 15 gr, glicina 72 gr y SDS 5 gr.

- Protein loading buffer 5x: Tris-base 1.56 mL 312.5 mM, SDS 0.5 gr 10 %, glicerol 2.5 mL 50 %, 2-ME 1.25 mL 25 % y Bromophenol blue 2% 16  $\mu$ L 0.00625%
- TBS (tampón de lavado): 20mM Tris-base pH 8, 140mM NaCl.
- TE (tampón de sonicación sin EDTA) 10x: Tris-base 200 mM pH 7.5.
- Tampón para ensayo de degradación con metaloproteasas:
  - MMP 2, 9 y 13: Tris ácido 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, pH 7,5
  - MMP 1, 3 y 8: Tris ácido 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 150 mM, Brij35 0.5%, pH 7,5
- Tampones para la IMAC
  - Tampón de equilibrado: sales de guanidina 3 M, imidazol 10mM, pH 7.4, PBS
  - Tampón de lavado: sales de guanidina 3 M, imidazol 25mM, pH 7.4
  - Tampón de elución: sales de guanidina 3 M, imidazol 250mM, pH 7.4
  - Tampón de regeneración 10x: NaCl 1 M, MES 200mM
  - MES buffer: 20mM 2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid, 0,1M sodium chloride, pH 5.0

### 3.2-Métodos

#### 3.2.1 -Elaboración de geles de acrilamida y electroforesis.

Para llevar a cabo una electroforesis de proteínas se elaboran geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), para lo cual hay que montar casete de geles.

Una vez preparado , se elaboran las dos fases del gel: resolving gel al 12% y stacking gel al 4% .

Se coloca el casete en la cubeta de electroforesis y se añade el tampón de electroforesis 1x. Las muestras con protein loading buffer 5x se hierven y cargan en el gel, conectamos la corriente eléctrica con amperaje contante de 25 mA por gel y se tiñe el resolving con con comassie blue (comassie blue 0.1 %, ácido acético 10 %, metanol 40 %, agua destilada 50%).

#### 3.2.2-Elaboración de geles de agarosa.

Este tipo de geles se emplea para llevar a cabo electroforesis de DNA a una concentración de agarosa del 1 % o el 2 % en tampón TAE. Se realiza a un voltaje constante de 60 voltios durante 90 minutos para geles preparativos y a 90 voltios durante 60 minutos si son geles analíticos. Una vez termina el proceso se extrae el gel y se tiñe con SYBR Green.

#### 3.2.3-Screening de colonias.

El screening o cribado de colonias es un proceso utilizado para evidenciar la presencia de un gen en una cepa bacteriana, así coma la expresión del mismo para seleccionar una colonia con la que producir polímero y comprobar los resultados de dicha producción.

Las colonias seleccionadas al azar se inoculan en TB con ampicilina y se dejan incubando en agitación durante toda la noche. Posteriormente se analiza la expresión

del polímero en una SDS-PAGE se centrifugan y se carga el sobrenadante en un gel para interpretar sus resultados

### 3.2.4-Producción de polímero

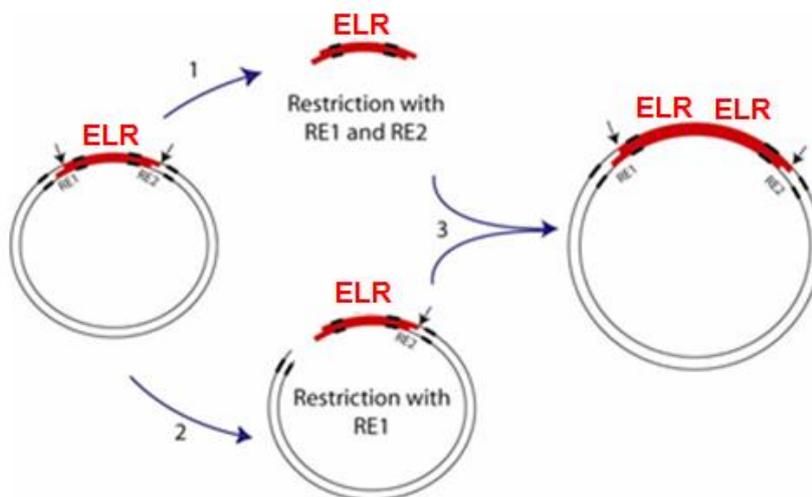
→La construcción del gen y el plásmido

Es el proceso por el cual se introduce el material genético dentro de un vector de clonación (pDrive All) o expresión (p7 RARE) en un orden adecuado que da resistencia a un antibiótico y codifica el polímero de elastina recombinante de interés; de manera que cuando se introduce en las células se pueda clonar, si es una cepa de clonación, o producir el ELR de interés una vez en la cepa de células de expresión.

En este proceso se utilizan dos métodos:

- La ligación direccional recursiva (Recursive directional ligation) (Figura): para duplicar la longitud de un oligómero en un vector parental y añadir los bloques que compondrán el polímero final. El proceso implica (1º) digerir el vector padre con enzimas de restricción para aislar el inserto que codifica el ELR; (2º) digiriendo el vector padre con solo RE1 para linealizar el vector, que retiene el inserto; y (3º) dimerizar los dos restos para duplicar la longitud del gen deseado.

Fusión de genes sin costuras (Seamless gene cloning): La clonación sin fisuras y la fusión génica permite unir dos o más fragmentos de DNA con precisión para que no se agreguen nucleótidos no deseados en las uniones entre los fragmentos de DNA.



**Ilustración 2- representación esquemática de la ligación direccional recursiva y fusión de genes. Las áreas en negrita en el vector representan las secuencias de reconocimiento de las endonucleasa (RE1 es *Sap I* y RE2 es *Ear I*), que están contenidas dentro de la secuencia que codifica el polipéptido repetitivo. Las flechas negras indican la ubicación del sitio de escisión.**

Para ello preparamos el plásmido pDriveAll de una cepa celular high copy y el inserto, sometiéndoles a la acción de enzimas de restricción que permiten la formación de puntos de unión para que el plásmido y el inserto se combinen, una vez han actuado las enzimas de restricción se prepara una mezcla del inserto digerido y el plásmido pDrive All linealizado en agua MQ con una ligasa y el buffer de la misma para que tenga lugar la ligación. Este proceso se lleva a cabo una vez por cada bloque que compone el polímero que queremos originar. Tras la ligación se lleva a cabo una separación del DNA, por medio de un kit de purificación de DNA y una extracción de la banda de DNA correspondiente de un gel de agarosa preparativo en el que se ha

cargado el resultado de una digestión preparativa con la enzima de restricción *Ear I*, y una posterior transformación; en la que se mezclan 4.5 µl de p7RARE con la secuencia del polímero con 250 µL de células BLR, que se someten a ciclos de frío y calor, se les añade medio SOC, se incuba 1 hora en el agitador y se siembran en placas.

Estos ciclos de ligación y transformación se repiten hasta completar el plásmido con las secuencias que codifican los bloques que componen el polímero que se quiere producir.

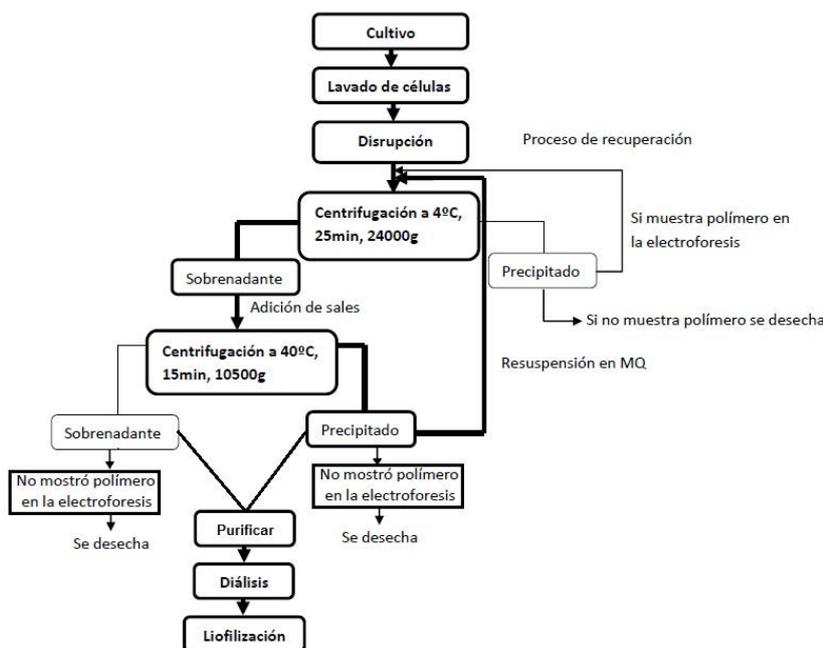
Los resultados de este proceso se evalúan mediante un gel analítico pDAll-polímero con *Ear I* y *Eco RI* o un gel analítico p7RARE- polímero con *XhoI-XbaI* según las proporciones indicadas por los fabricantes.

→Bioproducción de polímero.

Una vez la construcción del gen está completa se repiten los pasos de ligación y transformación hasta llevar el inserto y el plásmido al que está ligado a células BLR de expresión [4, 6, 13].

Tras el screening de colonias, con la colonia seleccionada se prepara un preinóculo en 10 mL de LB con 1 µL/mL de ampicilina y 2 µL/mL de glucosa al 20 %, y a partir de este se elabora un subcultivo en un Erlenmeyer con 50 mL de LB 0,5 µL/mL de ampicilina y 100 µL/mL del preinoculo, que se deja incubar durante dos horas y media. Posteriormente se inoculan 400 mL de TB con 100 mL de inóculo en cada Erlenmeyer y se incuban durante toda la noche a 37 °C y 250 rpm.

Se mide la absorbancia, a 600 nm de los, Erlenmeyer de producción para controlar el proceso, que se interrumpe cuando se observe un intervalo en que los valores de absorbancia medidos no cambien.



→Lavado de células.

Consiste en 2 centrifugaciones de 15 minutos a 4200rpm, en una centrífuga Sorvall RC12BP con un rotor H-12000 y la consiguiente resuspensión celular en tampón de lavado (TBS) con el objeto de eliminar los restos de medio de cultivo del pellet celular.

**Ilustración 3-** esquema de proceso de producción y diálisis, con cada una de las rutas y acciones a llevar a cabo según los resultados.

→Lisis de células.

La lisis de células para extraer el polímero se lleva a cabo en un disruptor modelo TS 0.75KW de la marca 'Constant Systems Limited', para lo cual antes es necesario resuspender el pellet celular en tampón de sonicación sin EDTA (el volumen requerido es= última absorbancia medida x Litros de TB x 5) y los inhibidores de proteasas E64, Leupeptin, Pepstatin A, y AEBSF.

→ Eliminación de impurezas y desechos celulares.

El producto obtenido en la lisis celular se centrifuga a 2000rpm y 4°C durante 10 minutos para eliminar la espuma que pueda haberse formado durante la lisis de células. Se separan el pellet y el sobrenadante, y se elabora un gel de proteínas para saber en cuál de los dos se encuentra el polímero que hemos producido. Después se lleva a cabo una segunda centrifugación en tubos falcon que resisten mayor fuerza centrífuga para separar el sobrenadante que se va a purificar.

### 3.2.5 -Purificación y caracterización de polímero.

→Cromatografía de afinidad.

Una vez tenemos disuelto el polímero preparamos una columna de purificación con una resina HisPur Ni-NTA (Thermo scientific), que permite una purificación efectiva de la proteína producida soluble gracias a su cola de polihistidinas por medio de la inmovilización de iones metálicos por cromatografía de afinidad (IMAC) [14], además este método garantiza que todo el polímero purificado se encuentra correctamente formado ya que la cola de polihistidinas está unida en la región más sensible del polímero, por tanto si este sufre alguna alteración o desperfecto la primera región que se altera es la que une la cola de histidinas y no podría unirse a la resina.

Este proceso se lleva a cabo siguiendo el protocolo marcado por el fabricante de la resina que se utiliza:

Purificación de proteínas marcadas con His mediante el método de lotes.

1. Agregar una cantidad apropiada de resina Ni-NTA a la columna.
2. Preparar la muestra que se quiere purificar, resuspendiéndola con sales de guanidina en una concentración final 3M.
3. Equilibrar la columna pasando un volumen de buffer de equilibrado equivalente a 2 volúmenes del lecho de resina.
4. Prepare la muestra mezclando el extracto de proteína con un volumen igual de tampón de equilibrado. El volumen total debe ser igual a al menos dos volúmenes del lecho de resina. Y pasarlos por la columna recogiendo el "follow through"
5. Lave la resina con tampón de lavado. Recogiendo los primeros 50 mL que pasan, y dejando que continúe hasta que controlando con la absorbancia cuando deja de arrastrar proteínas que no se hayan unido a la resina.
6. Se eluyen las proteínas marcadas con His unidas usando el Buffer de Elution en diferentes fracciones.

7. Se controla la elución de proteínas midiendo la absorbancia de las fracciones. La proteína eludida puede ser directamente analizado por SDS-PAGE.

Después de extraer las fracciones de elución se lleva a cabo la regeneración de la resina para eliminar el imidazol residual y cualquier proteína adsorbida inespecíficamente antes purificar otro lote o guardarla:

1. Se pasan 10 volúmenes de lecho de resina de tampón MES.
2. Se lava la resina con 10 volúmenes de lecho de resina de agua MQ.
3. Se pasan 5 volúmenes de etanol al 20% y se almacena la columna con la resina.

La purificación se evalúa por medio de un gel SDS-PAGE. Todas las muestras se preparan con 10 µl de muestra, 15 µl de protein loading buffer y 35 µl de MQ.

→Diálisis y liofilización.

El contenido de las fracciones con polímero, de cada lote, se carga en una tripa de diálisis (10000 KDa de Cut-off) que se dializan en 5 bidones de 25 L, 4 de agua destilada y 1 de agua MQ, con un agitador y en la cámara fría. Se recoge el contenido de la tripa de diálisis y se congela a -20 °C para su liofilización, obteniendo así el polímero puro.

### 3.2.6 -Estudio de degradación

Se elaboran los buffers específicos para cada una de las metaloproteasas que vamos a utilizar; por lo que necesitamos uno para las MMPs 2, 9 y 13 de la marca Enzo; y otro para las MMPs 1, 3 y 8 de la marca RyD systems. Las cantidades de cada metaloproteasa requeridas para llevar a la reacción se han calculado siguiendo los protocolos específicos de cada una de ellas. Se preparan 6 ependorff, cada uno con 0.6 mgr de polímero liofilizado a resuspender en 0.6 mL de buffer de metaloproteasas (3 con buffer para MMP 2 (0,2u/µg), 9 (20u/µL) y 13 (10u/µg); y otros 3 con buffer para MMP (5u/µg), 3 (2µL) y 8 (2,5u/µg)). Después se calculan, según el protocolo, los volúmenes que hay que añadir de cada una de la MMPs.

Después se dejan incubando en la estufa a 37 °C, todas menos la MMP 3 que lleva a cabo la reacción a temperatura ambiente, y se extraen muestras al cabo de 30 minutos y 1 hora que se cargan en un gel SDS-PAGE del cual se interpretan los resultados.

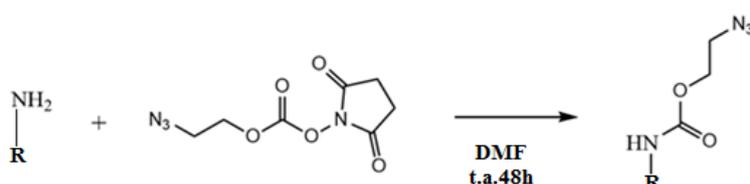
### 3.2.7 -Modificación del ELR con azida y caracterización del polímero

#### CÁLCULOS:

|  |            |
|--|------------|
| Mg Polímero (VKVMMPsShK)               | 306,4 mg   |
| Pm polímero                            | 71034      |
| Nº de grupos amino de las lisinas      | 24         |
| Moles de grupo amino                   | 0,0430mmol |
| Equivalentes del compuesto de la azida | 0,25       |
| Pm azida                               | 228.17     |
| Moles del compuesto de azida           | 0,0258mmol |
| Mg del compuesto                       | 5,9 mg     |

1. Se disuelven 306.4 mg en 9 ml de DMF (DiMetil Formamida) y 5 ml de DMSO (306mg, 0.043 mmol<sub>NH<sub>2</sub></sub>, 24N<sup>o</sup>Lys, 0.25 eq, PM 71034Da).
2. Se prepara una solución de 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (0.0258 mmol, 5.9 mg, PM 228.17) en DiMetil Sulfoxido (DMSO, 1ml) y se añade a la solución del polímero en DMF a temperatura ambiente.
3. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas.
4. Después de este tiempo se añaden 30 ml de Et<sub>2</sub>O, apareciendo un precipitado blanco. Se centrifuga a 15000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se elimina y el sólido se lava con acetona (3x30 mL).
5. Se seca a presión reducida y se redisuelve en agua Mili-Q (4 ° C, 20 mL).
6. Se dializa frente a agua destilada (2 x 25 L) y Mili-Q (25 L) y se liofiliza.

$$\frac{mg \text{ polímero}}{Pm \text{ polímero}} \times n^{\circ}Lys \times eq \text{ a modif} \times Pm \text{ AZIDA} = mg \text{ AZIDA}$$



**Ilustración 4- Reacción de funcionalización del ELR con grupos azido**

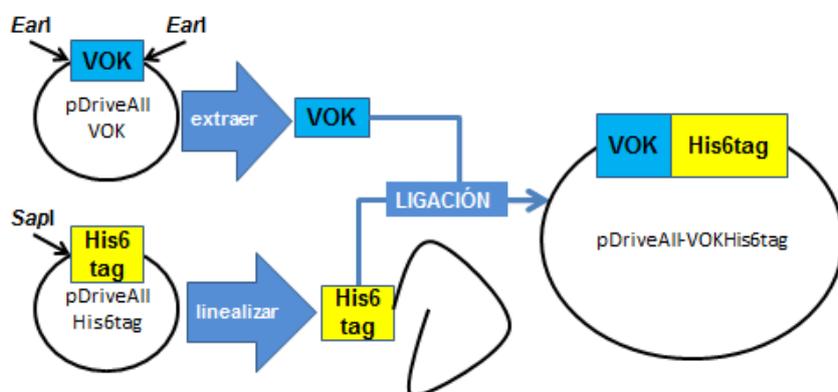
Una vez obtenido el polímero transformado se procede a su caracterización por espectroscopía infrarroja (FTIR), espectrometría de masas (MALDI-TOF), resonancia magnética nuclear (RMN) y Turbidimetría.

#### **4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con el objetivo de sintetizar el tipo de hidrogel planteado en la hipótesis y objetivos es necesario sintetizar una pareja de polímeros recombinantes que se modifiquen respectivamente con grupos ciclooxilo, que será VOOKHis6tag, y azido, que será el VKVMMPsShKH6tag.

##### **4.1-Construcción, producción y caracterización del polímero VOKHis6tag**

Se quiere construir un plásmido con una secuencia de genes que permita la expresión del polímero VOK con una cola de polihistidinas en su extremo carboxilo terminal, como uno de los 2 ELRs para formar un hidrogel. Partiendo de las secuencias genéticas que codifican el polímero VOK y la cola de histidinas His6tag por separado



**Ilustración 5- Proceso de construcción del plásmido pDriveAll-VOKHis6tag. Se extrae VOK, porque cuanto más grande es el inserto menor es la posibilidad de que entre dos veces durante la ligación.**

se construye la secuencia en un pDriveAll (ilustración 5) del cual se extrae para su inserción en un plásmido p7RARE, por medio de un ciclo ligación direccional recursiva, fusión de genes sin costura, extracción de secuencias de DNA y transformaciones.

El plásmido resultante se introduce en células competentes que son capaces de expresar la secuencia del inserto para producir el polímero **VOKHis6tag**, del que se espera un peso de 33903 Da y la siguiente secuencia de aminoácidos:

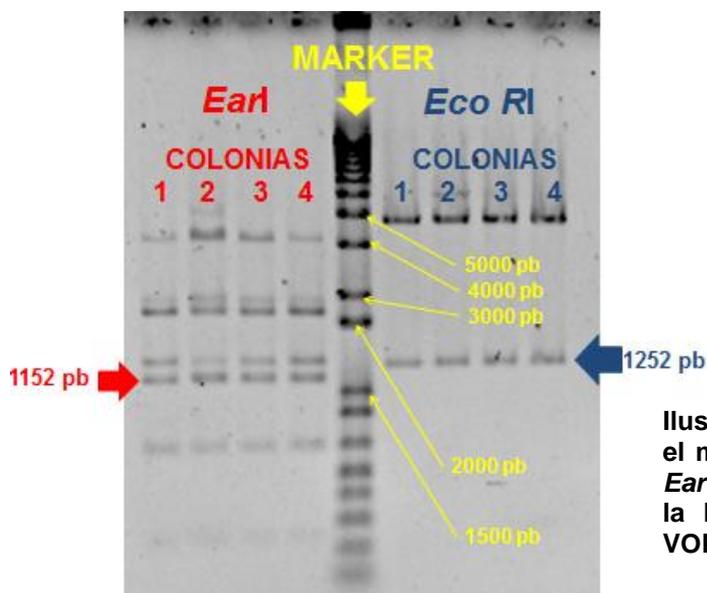
Este ELR está compuesto por dos bloques:

- VOK: que corresponde a la secuencia de aminoácidos VPGKG repetida 72 veces, dando lugar a un total de 360 aminoácidos, que equivalen a 1080 pb. Es el bloque responsable de que el ELR tenga la biocompatibilidad y el comportamiento termosensible además de un alto número de lisinas para poder modificar químicamente a través del grupo amino de la cadena lateral.
- Cola de histidinas: este bloque está compuesto por la secuencia  $\text{HHHHHH}$ , el motivo por el que se añade este bloque en la construcción se debe a que la histidina es el aminoácido con mayor capacidad de interacción con matrices de iones metálicos inmovilizados, lo cual es útil para el IMAC, el método de purificación de proteínas que se utiliza en el proceso; y además permite localizar el polímero utilizando anticuerpos comerciales que se dirigen específicamente a este bloque. Por tanto es útil que tenga una cantidad mínima de 6 histidinas, pero sin alcanzar niveles que interfieran con la función o propiedades del polímero.

El VOKHis6tag resultante del proceso de producción se purifica en columna de cromatografía de afinidad, se dializa y se liofiliza.

#### 4.1.1-Construcción del plásmido para VOKHis6tag

→Gel analítico pDAll VOKHis6tag con con *EarI* y *EcoRI* (Ilustración 5)



Una vez se tiene la construcción del inserto en el plásmido pDriveAll se comprueba si es correcta con un gel analítico, en el que se cargan muestras de cinco colonias en las que se ha digerido el plásmido con las enzimas de restricción *EarI* y *EcoRI* respectivamente.

**Ilustración 1-** se observa el mismo gel, con el marcador y la digestión del pDriveAll con *EarI*, antes y después de la extracción de la banda correspondiente al inserto de VOKHis6tag.

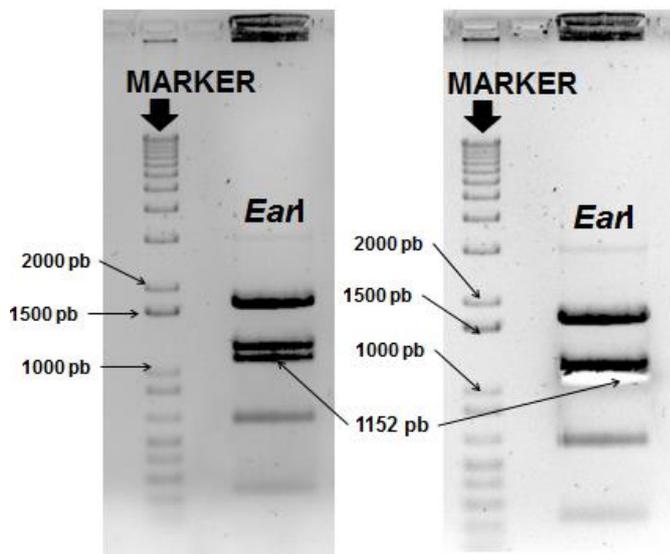
Los resultados esperados en la banda que corresponde a la secuencia de bases que codifica el polímero, al cortar el plásmido pDriveAll-VOKHis con cada una de las enzimas, son:

pDAIIVOK 1099 pb+ His tag 54 pb= 1152 pb (EarI)

pDAIIVOK 1099 pb+ His tag 54 pb +100pb=1259 pb (Eco RI)

Dado que en el gel se observan bandas de pesos moleculares que coinciden con los pesos moleculares de la secuencia de VOKHis6tag, concordando con los resultados esperado, y otras bandas de distintos pesos moleculares cuyas sumas coincidirían con las masas esperadas del resto del plásmido se considera que la construcción del inserto que codifica VOKHis6tag es correcta y se puede proceder a extraer el inserto y ligarlo al plásmido de expresión p7RARE.

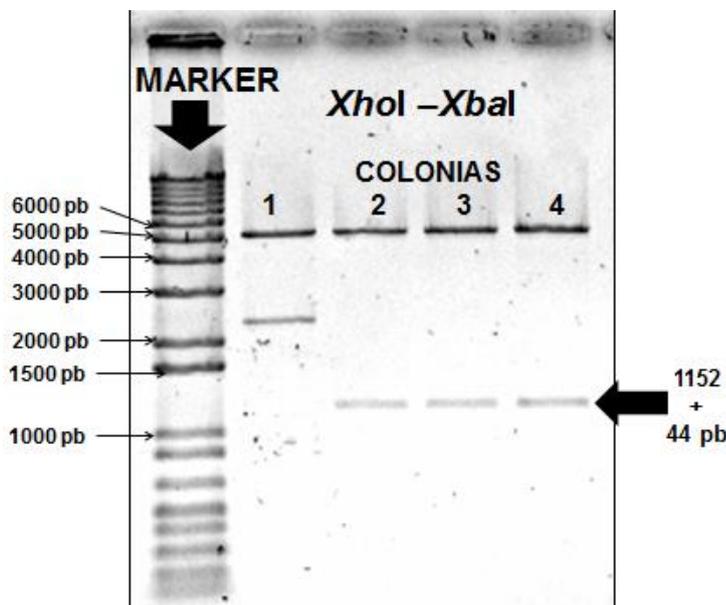
→Gel preparativo pDAI VOKHis6tag EarI



Con el gel preparativo (ilustración 6) llevamos a cabo la extracción de la banda de DNA de 1152 pb que corresponde al inserto VOKHis6tag, mediante un kit de purificación de DNA, para hacer la ligación p7RARE-VOKHis6tag, la transformación y sembrar en placa.

**Ilustración 6-** gel SDS-PAGE analítico para pDriveAll-VOKHis6tag de las colonias 1 a 4 tratadas con EarI, Marker de DNA y las colonias 1 a 4 tratadas con Eco RI.

#### 4.1.2- Gel analítico p7RARE VOKHis6tag col1-4 XhoI-XbaI



Para comprobar si la ligación ha sido correcta, seleccionan 4 de las colonias sembradas a fin de elaborar un gel analítico de p7RARE-VOKHis6tag digerido con XhoI-XbaI (ilustración 7) para liberar el bloque génico del inserto del y comprobar que la

**Ilustración 7-** en el gel se observan 2 tipos de bandas de cada una de las 4 colonias: la que se encuentra entre los 6000 y 5000 pb que corresponde al plásmido p7RARE, y una de 1196 pb que corresponde al inserto (1152 pb) y un fragmento del plásmido de expresión con el que se queda debido a los puntos de corte de XhoI-XbaI. En el caso de la colonia 1 la segunda banda está entre las 3000 y 2000 pb lo que indica que el inserto ha entrado dos veces (2392 pb).

ligación del inserto y el plásmido expresión p7RARE ha sido correcta.

En el gel se observan las bandas del plásmido p7RARE y el inserto resultantes de la digestión con *XhoI-XbaI*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se descarta la colonia 1 dado que el inserto ha entrado en el plásmido 2 veces, como se puede ver en el gel, y se comprueba la relación de absorbancias 260/280 nm para comprobar la pureza del DNA que en las cuatro colonias da valores mayores de 1,8 indicando que no hay contaminación, por tanto se selecciona la colonia 4 para llevar a cabo la transformación sobre la cepa productora BLR. Esta decisión se debe a que de las tres colonias en las que el inserto ha entrado correctamente, la colonia 4 es la que tiene una mayor concentración de DNA.

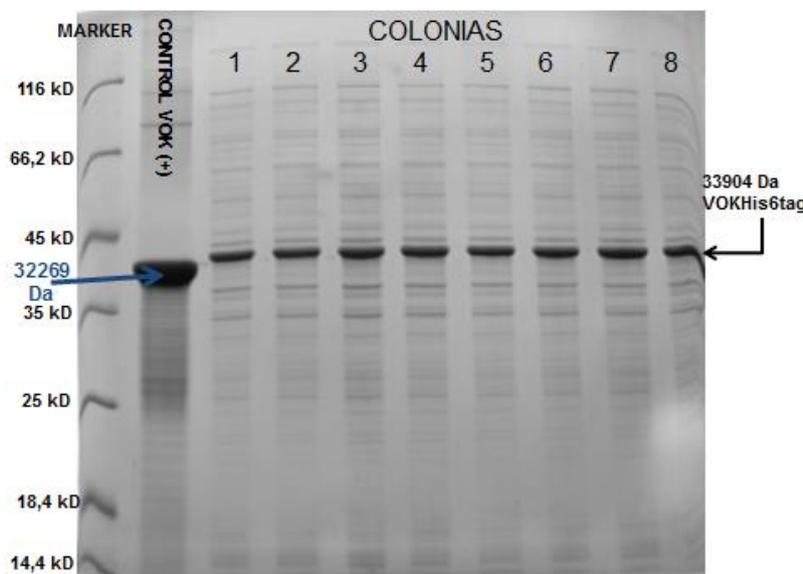
| colonias | [DNA] ng/μL |
|----------|-------------|
| 1        | 97,4        |
| 2        | 102,3       |
| 3        | 90,3        |
| 4        | 82,8        |
| 5        | 110,6       |

#### 4.1.3-Bioproducción del polímero VOKHis6tag.

Se quiere producir la mayor cantidad posible de polímero. Para ello se selecciona la colonia con mayor expresión de VOKHis6tag, de todas las formadas al sembrar el resultado de la transformación con p7RARE- VOKHis6tag y células competentes (BLR) para llevar a cabo la bioproducción como se indica en el apartado de materiales y métodos

-Screening de colonias 1-8.

Se lleva a cabo un screening de 8 colonias de las células BLR con el plásmido p7RARE-VOKHis6tag (ilustración 8), seleccionadas al azar, para analizar el grado de expresión de VOKHis6tag



y utilizar en la bioproducción la colonia que más exprese el polímero.

Los 2 μL de control utilizado, disuelto 1 mg/mL, son de polímero VOK sin cola de poli histidinas histidinas (32269 Da), resultando en un peso molecular menor que el esperado para VOKHis6tag (33904 Da), y

**Ilustración 8-** En el gel se observa: el marker de proteínas, un control positivo de polímero VOK sin cola de polihistidinas (32269 Da), y la banda correspondiente al VOKHis6tag (33904 Da) de las 8 colonias analizadas

las ocho colonias seleccionadas en el screening.

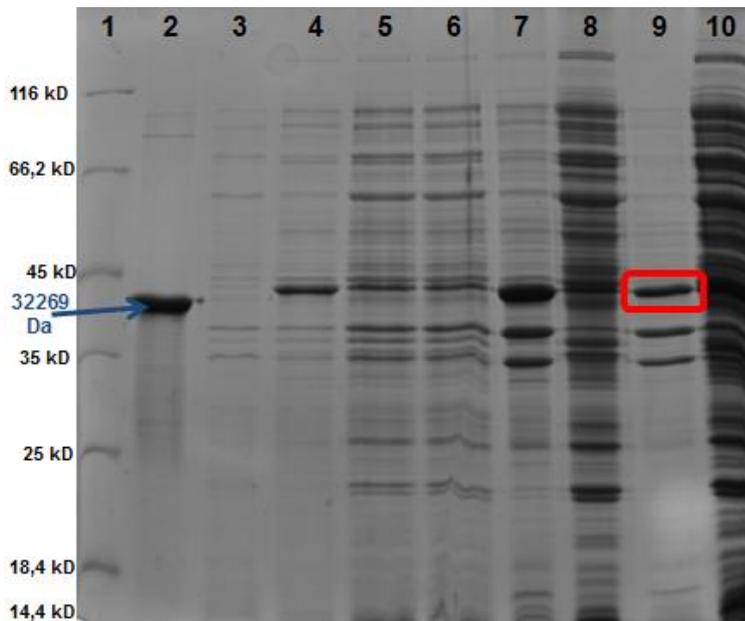
En el gel se aprecia la expresión de VOKHis6tag en todas las colonias, dado que aparece la banda correspondiente sobre de la banda del control, lo cual indica además que en el polímero se expresan correctamente y sin que hayan sufrido degradación

tanto el bloque de VOK como la cola de polihistidinas y por consiguiente tiene un mayor peso molecular.

A partir de este screening se selecciona la colonia 3 , que tiene una banda más oscura y densa que se asocia a una mayor expresión del polímero sin degradar, para llevar a cabo la bioproducción.

→Bioproducción del polímero VOKHis6tag.

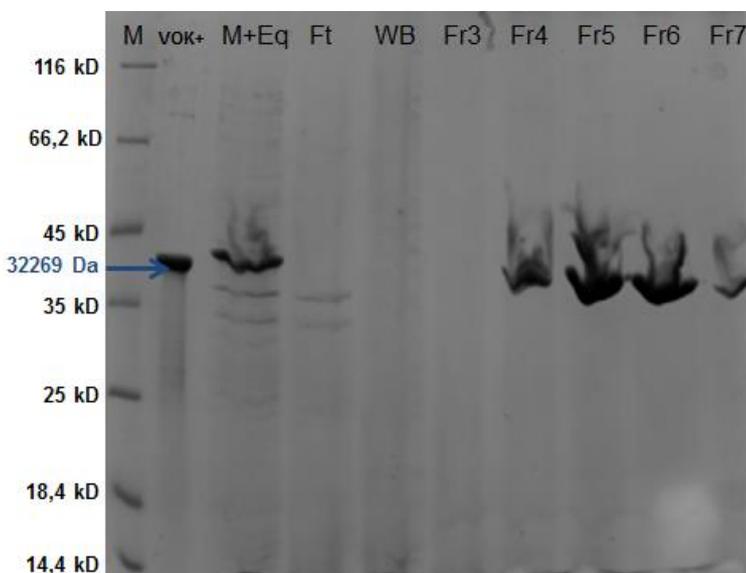
Una vez se completa la bioproducción del polímero VOKHis6tag se estudia en un gel SDS-PAGE para comprobar la presencia de polímero en diferentes momentos y fases del proceso; y así saber en caso de que haya habido algún problema saber en qué paso ha tenido lugar el error, o como es mi caso comprobar en cuál de las dos fracciones resultantes de la bioproducción se encuentra el polímero VOKHis6tag: en el



pellet/precipitado de producción o en el sobrenadante de producción.

**Ilustración 9-** En este gel SDS-PAGE se observan: marker de proteínas (1), control positivo de VOK sin cola de histidinas (2), muestra del inoculo (3), muestra de la colonia 3 usada en el screening (4), muestra de los Erlenmeyer de producción al primer (5) y segundo (6) tiempo, precipitado de sonicación (7), sobrenadante de sonicación (8), precipitado de producción (9) y sobrenadante de producción (10).

A raíz de los resultados obtenidos en este gel (ilustración 9) se deduce que no han acontecido errores durante el proceso, y que el polímero VOKHis6tag se encuentra en el precipitado o pelet resultante de todo el proceso de bioproducción.



#### 4.1.3-Purificación de polímero VOKHis en columna.

Después eliminar los desechos celulares y purificar el polímero cromatografía de afinidad en columna se prepara un gel SDS-PAGE para comprobar la efectividad de la producción y en qué fases y fracciones del proceso encontramos el polímero VOKHis6tag.

**Ilustración 10-** marker de proteínas (M), control positivo VOK+, polímero + buffer de equilibrado (M+Eq), el follow through (Ft), los primeros 50 ml que pasaron del buffer de lavado (WB), y cinco de las fracciones resultantes de la elución (Fr 3 a 7).

Las sales de guanidina usadas al resuspender las muestras a purificar hacen que las bandas tengan una apariencia heterogénea y asimétrica, debido a su elevada concentración (ilustración 10).

En el caso de la ilustración 10 se eligen las fracciones 3, 4, 5, 6 y 7; dado que según las absorbancias medidas en el nanodrop durante la elución son las que se encuentran en los límites donde se ha encontrado polímero.

| Nº de lote de VOK | mg de polímero |
|-------------------|----------------|
| 1                 | 28             |
| 2                 | 39             |
| 3                 | 30             |
| 4                 | 38             |
| 5                 | 44,1           |
| 6                 | 40,1           |
| 7                 | 39,2           |
| 8                 | 36             |
| 9                 | 35,3           |
| 10                | 39             |
| 11                | 37,2           |
| TOTAL             | 405,9          |

Debido a que en el gel no se observa polímero en la fracción 3, no se carga en la tripa de diálisis, pero las fracciones 4, 5, 6 y 7 sí. Además, dado que no se ve la banda de VOKHis6tag en Ft y WB quiere decir que no ha habido pérdida de polímero, en este caso, y todo se quedó en la resina.

A partir de los mg totales de polímero obtenido (ilustración 11), y teniendo en cuenta que en la bioproducción se han utilizado 6 L de medio TB, se calcula que el rendimiento ha sido de 67,65 mg de polímero/L de medio (405,9 mg/6L). En comparación con el rendimiento de la

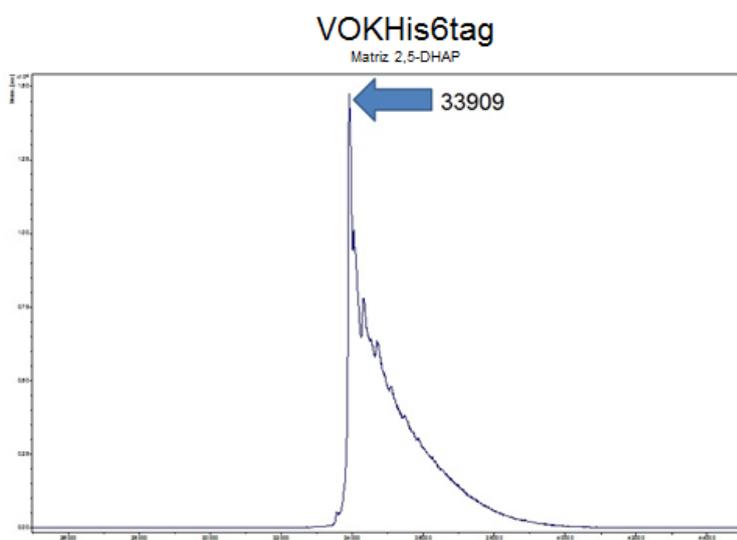
**Ilustración 11- lotes resultantes tras la purificación.**

producción de VOK (150 mg de polímero/L de medio), el rendimiento de VOKHis6tag es menor, debido a que al sobresaturarse la resina no puede retener todo del polímero y hay pérdidas en cada lote.

#### 4.1.4- Caracterización del polímero

Se llevó a cabo la caracterización del polímero, mediante espectrometría de masas y un análisis de aminoácidos, para comprobar si los resultados de la producción concordaban la composición del polímero que se quería producir.

→MALDI-TOF



Con la ayuda de esta técnica se confirmó el peso molecular del polímero VOKHis6tag, a partir de 1 mg disuelto en agua MQ (1 mg/mL).

El resultado obtenido concuerda con el peso teórico del polímero (33903 Da)

**Ilustración 3- MALDI-TOF del polímero producido, en el que se observa el peso molecular de 33903 Da correspondiente a VOKHis6tag.**

→Análisis de aminoácidos

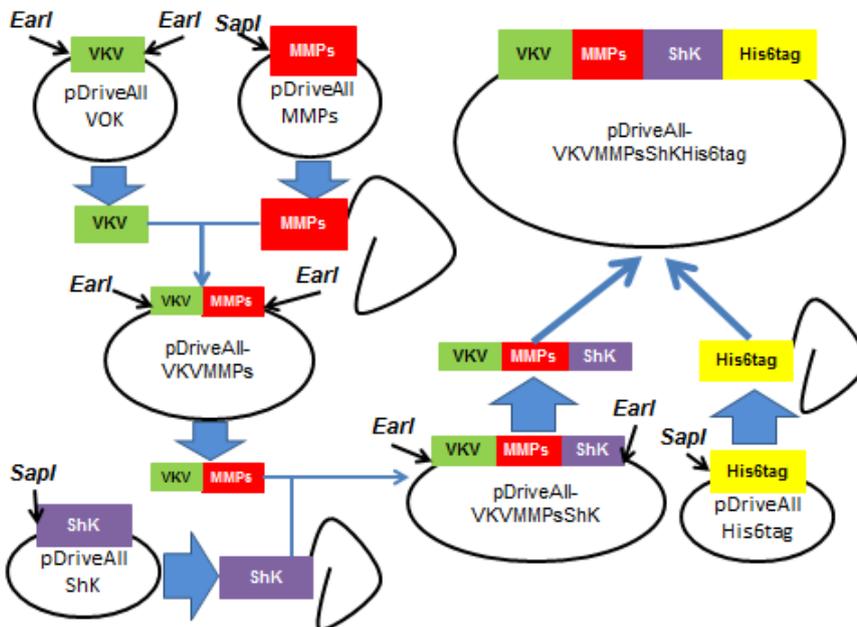
| Ref. Interna | C18097 | Ref. Externa | VOK His   |        | Teorico |
|--------------|--------|--------------|-----------|--------|---------|
|              |        |              | Calculado |        |         |
|              | AA     | Mr patron    | % masa    | count  | count   |
| D            | ASP    | 133,11       | 0,00      | 0,00   |         |
| E            | GLU    | 147,13       | 1,19      | 3,30   | 1       |
| N            | ASN    | 132,12       | 0,00      | 0,00   |         |
| S            | SER    | 105,09       | 0,50      | 1,96   | 1       |
| Q            | GLN    | 146,15       | 0,00      | 0,00   |         |
| H            | HIS    | 151,9        | 2,21      | 5,94   | 6       |
| G            | GLY    | 75,07        | 28,11     | 152,83 | 153     |
| T            | THR    | 119,12       | 0,00      | 0,00   |         |
| R            | ARG    | 174,2        | 0,00      | 0,00   |         |
| A            | ALA    | 89,1         | 0,00      | 0,00   |         |
| Y            | TYR    | 181,19       | 0,00      | 0,00   |         |
| C            | CYS    | 240          | 0,00      | 0,00   |         |
| V            | VAL    | 117,15       | 19,99     | 69,63  | 75      |
| M            | MET    | 149,21       | 0,57      | 1,57   | 1       |
| W            | TRP    | 204,33       | 0,00      | 0,00   |         |
| F            | PHE    | 165,19       | 0,00      | 0,00   |         |
| I            | ILE    | 131,18       | 0,00      | 0,00   |         |
| L            | LEU    | 131,18       | 1,31      | 4,06   | 2       |
| K            | LYS    | 146,65       | 26,10     | 72,62  | 72      |
| P            | PRO    | 115,13       | 20,02     | 70,95  | 73      |
|              |        |              | 100       | 382,9  | 384     |

A partir de 5 mg del polímero VOKHis6tag liofilizado se comprobó la composición aminoacídica del polímero producido. Los resultados del análisis mostrados en la tabla coinciden con la composición aminoacídica esperada del VOKHis6tag.

Ilustración 4- en la tabla se muestra el número de los diferentes aminoácidos calculados que componen VOKHis6tag, con el porcentaje que suponen de la masa del polímero, respecto a los esperados.

4.2-Construcción, producción y caracterización del polímero VKVMMPsShKHis6tag

Se quiere construir un plásmido con una secuencia de genes que permita la expresión del polímero derivado del VKV, con 3 bloques correspondientes a secuencias de



reconocimiento para las metaloproteasas 2, 9 y 13 (MMPs), un grupo funcional (ShK) y una cola de polihistidinas (His6tag). Partiendo de las secuencias

Ilustración 5-Proeso de construcción del plásmido pDriveAll-VKVMMPsShKHis6tag. Se extraen los bloques más grandes, porque cuanto más grande es el inserto menor es la posibilidad de que entre dos veces durante la ligación

genéticas que codifican los diferentes bloques

por separado se construye la secuencia en un pDriveAll del cual se extrae para su inserción en un plásmido p7RARE, por medio de ciclos ligación direccional recursiva, fusión de genes sin costura, extracción de secuencias de DNA y transformaciones.

El plásmido resultante se introducirá en células de expresión competentes que son capaces de producir el polímero **VKV-MMP-SHK-His6tag**, del que se espera un peso de 71034 Da y la siguiente secuencia de aminoácidos:

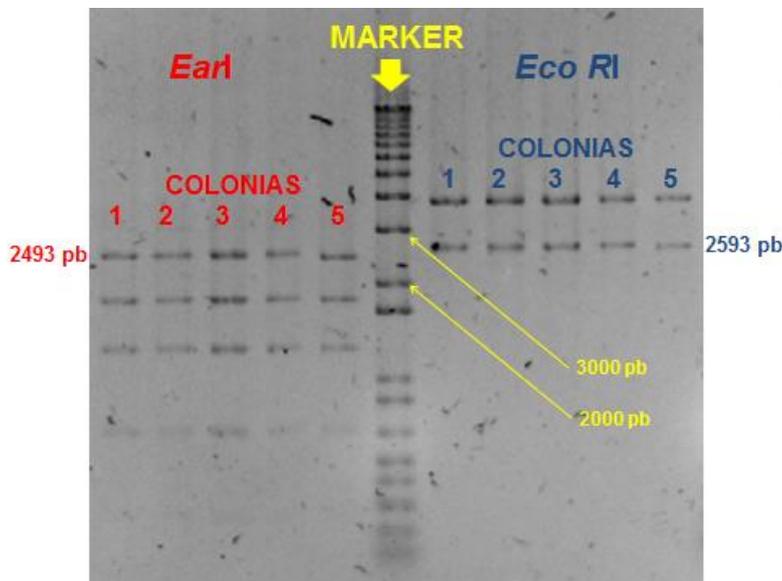
Este polímero está compuesto por 3 bloques principales:

- VKV (o VKV x24): este bloque está compuesto por la repetición del pentapeptido VPGVG, responsable de que el ELR tenga la biocompatibilidad y el comportamiento termosensible, y una secuencia VPGKG, cuya lisina permite la modificación química del polímero, a través del grupo amino de su cadena lateral, y le confiere un carácter sensible al pH del medio, además de pH básico y carga positiva; dando lugar a la siguiente secuencia de 720 aminoácidos (2160 pb): “MESLLP VG VPGVG [VPGKG (VPGVG)<sub>5</sub>]<sub>23</sub> VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGV”.
- MMP: este bloque, compuesto por la secuencia de 50 aminoácidos (150 pb). Le confiere al polímero una sensibilidad a las metaloproteasas humanas propias de la angiogénesis (\_\_\_\_\_ es específica de MMP9 cortando entre G y P, \_\_\_\_\_ es específica de MMP2 que corta entre G e I, y \_\_\_\_\_ es específica de MMP13 que corta entre G y L), un tipo de enzima proteolítica que juega un papel fundamental en procesos de curación de heridas, la angiogénesis y la metástasis de células tumorales; y se localiza en la matriz extracelular. Esto hace posible la escisión, en tres puntos de corte, del resto de los bloques para que cada uno lleve a cabo sus funciones una vez se cumplan las condiciones adecuadas.
- ShK: este bloque peptídico, compuesto por 43 aminoácidos (129 pb) , procede de la toxina de Stichodactyla (ShK), un péptido de 35 residuos que produce la anémona de mar Stichodactyla helianthus. ShK y sus análogos son capaces de unirse a las cuatro subunidades del tetrámero de canales de potasio regulados por voltaje provocando su inhibición y con ello cumplir la función deseada de suprimir la respuesta autoinmune mediada por células T frente a stent.
- Cola de histidinas: este bloque está compuesto por la secuencia \_\_\_\_\_, el motivo por el que se añade este bloque en la construcción se debe a que la histidina es el aminoácido con mayor capacidad de interacción con matrices de iones metálicos inmovilizados, lo cual es útil para el IMAC, el método de purificación de proteínas que se utiliza en el proceso; además permite localizar el polímero utilizando anticuerpos comerciales que se dirigen específicamente

a este bloque. Por tanto es útil que tenga una gran cantidad de histidinas, pero sin alcanzar niveles que interfieran con la función o propiedades del polímero.

#### 4.2.1-Construcción del plásmido para VKVMMPsShKHis

-Gel analítico pDriveAll VKV24MMPsShK con *EarI* y *EcoRI*



**Ilustración 6-gel SDS-PAGE analítico para pDriveAll-VKVMMPsShKHis6tag de las colonias 1 a 5 tratadas con *EarI*, Marker de DNA y las colonias 1 a 5 tratadas con *EcoRI***

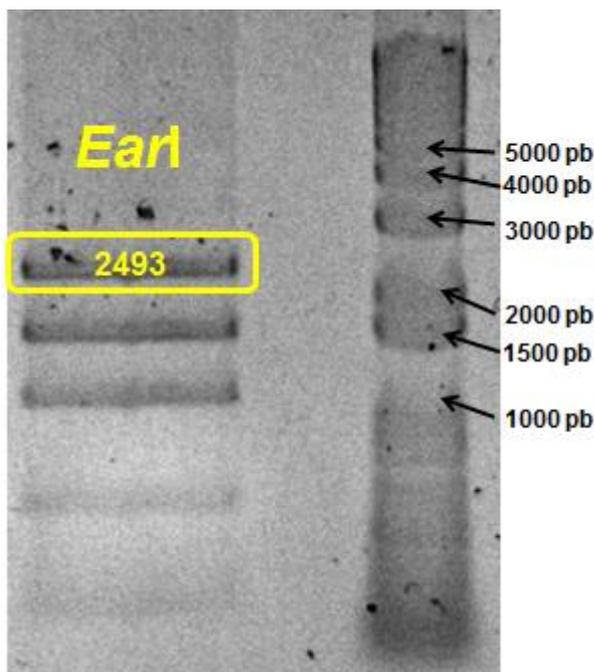
Al terminar la construcción Del inserto en el plásmido pDriveAll se comprueba si es correcta con un gel analítico, en el que se cargan muestras de cinco colonias en las que se ha digerido el plásmido con las enzimas de restricción *EarI* y *EcoRI* respectivamente.

Al analizar el gel resultante (ilustración 14), observamos:

$pDAIIVKV_{24}MMPsShK\ 2160pb+150pb+129pb+His\ tag\ 54pb= 2493pb$  (*EarI*)

$pDAIIVKV_{24}MMPsShK\ 2160pb+150pb+129pb+His\ tag\ 54pb +100pb=2539pb$  (*EcoRI*)

En cada caso se observa una banda correspondiente a los pares de bases del polímero, y otras bandas que corresponden al resto de las bases que conforman el plásmido (y 100 pb mas debido al punto en que corta *EcoRI*). Por tanto se considera que la construcción es correcta y se puede extraer para introducir el inserto en un plásmido de expresión.

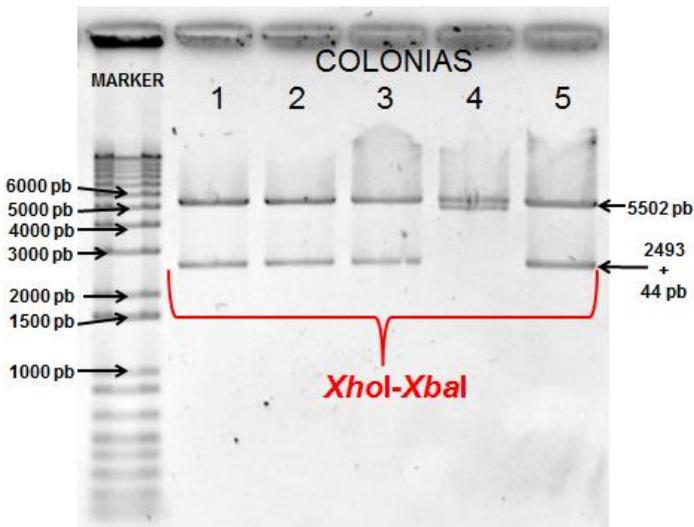


-Gel preparativo pDAIIVKV24MMPsShKHis6tag con *EarI*

El gel preparativo resultante permite extraer el material genético correspondiente al inserto utilizando un kit de purificación de DNA. Una vez purificado se lleva a cabo una ligación con el plásmido de expresión p7RARE.

**Ilustración 7- en este gel se observa la banda correspondiente a VKVMMPsShKHis6tag, de 2493 pb, resultante de la digestión con *EarI* que se quiere extraer.**

-Gel analítico p7RARE VKV24MMPsShKHis6tag de col1-5 con *XhoI*-*XbaI*



Tras la ligación del inserto a p7RARE y sembrar las células resultantes en placas, se comprueba si el proceso sido correcto midiendo la concentración de DNA en el nanodrop y elaborando un gel analítico de p7RARE-VKV24MMPsShKHis6tag digerido con *XhoI*-*XbaI*.

En este gel de agarosa analítico se comprueba si la construcción genética se ha introducido correctamente en el plásmido de expresión p7RARE y en cuál de las colonias la expresión del polímero VKVMMPsShKHis es mayor, para continuar con la producción. Para ello se ha llevado a cabo una digestión

**Ilustración 8-** en este gel se observan las bandas del marker y las resultantes de la digestión con *XhoI*-*XbaI* del material genético de 5 colonias seleccionadas al azar en las que está el plásmido p7RARE-VKVMMPsShKHis6tag

| colonias | [DNA] ng/ $\mu$ L |
|----------|-------------------|
| 1        | 97,4              |
| 2        | 102,3             |
| 3        | 90,3              |
| 4        | 82,8              |
| 5        | 110,6             |

del material genético con las enzimas *XhoI*-*XbaI* que cortan al plásmido en dos segmentos: uno con 5502 pb de las 5546 que tiene el plásmido original, y otro con 44 pb del plásmido original y las 2493 pb correspondientes al polímero.

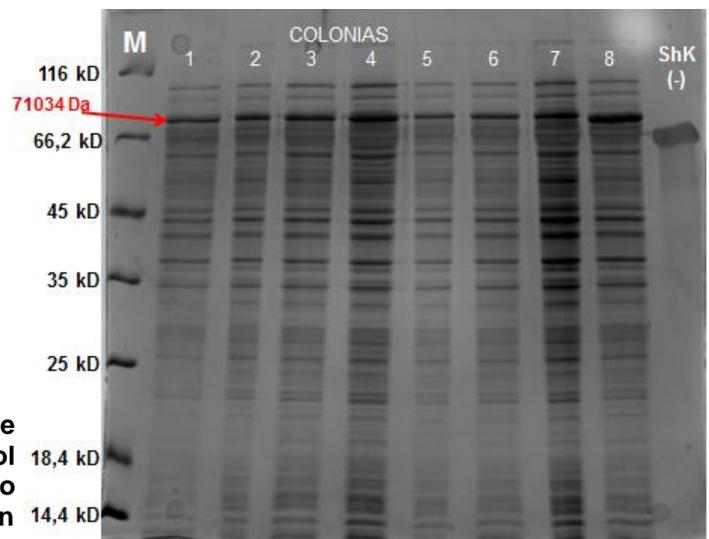
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (ilustración 17) se descarta la colonia 4, en la que el inserto ha entrado por duplicado como se puede ver en el gel. Por lo tanto utilizaremos la colonia 5, en la que el inserto ha entrado 1 vez correctamente y tiene la mayor concentración de DNA, para la transformación en células de expresión BLR que se incuban en medio SOC durante 1 hora y se siembran en placas.

**Ilustración 17-** concentración de DNA en las colonias del gel analítico p7RARE VKV24MMPsShKHis6tag

#### 4.2.2-Bioproducción del polímero VKVMMPsShKHis6tag

-Screening de colonias 1-8.

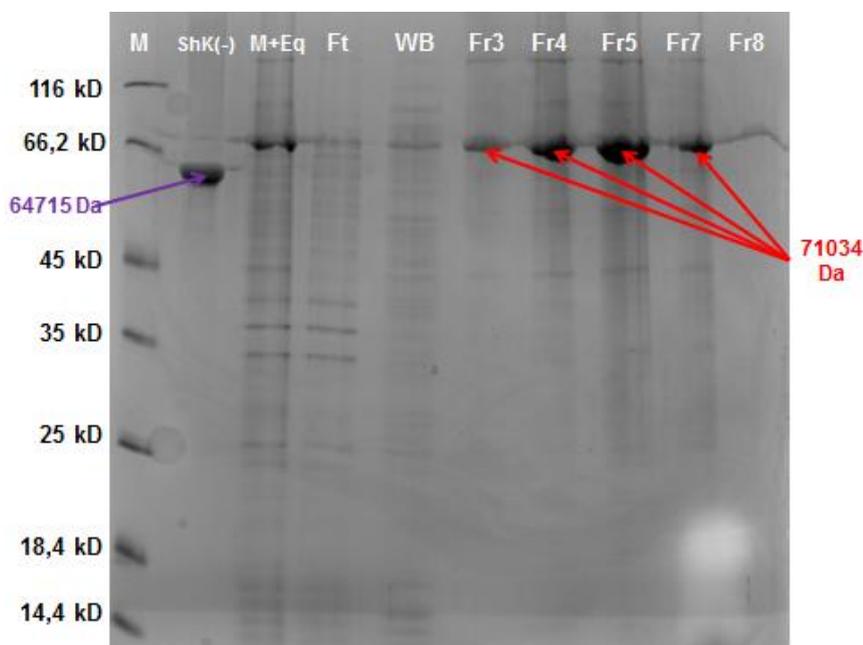
Las colonias resultantes de las células BLR con el plásmido p7RAREVKVMMPsShKHis se someten a un screening, eligiendo 8 al azar, para determinar cuál de ellas es la que expresa mayor cantidad de polímero y así utilizarla en la bioproducción (ilustración 18).



**Ilustración 18-** En el gel se observan el marker de proteínas (M) las colonias 1-8 y un control negativo para ShK (ShK(-)) que es un polímero VKV sin el bloque de ShK, por lo que tiene un peso menor (64715 Da) y permite comprobar que en el gel el polímero VKVMMPsShKHis6tag está completo y no se ha degradado.

Las bandas a la altura señalada por encima de los 66.2 kDa corresponden a los 71034 Da del polímero, dado que la más marcada, y por consiguiente la que presenta mayor expresión de la proteína de interés, es la de la colonia 8, es esta la que se utiliza en la bioproducción.

#### 4.2.3-Purificación de polímero VKVMMPsShKHis6tag en columna.



Después de la cromatografía de afinidad en columna para purificar el polímero evalúa la efectividad de la misma por medio de un gel de electroforesis SDS-PAGE (ilustración 19) con: En el caso de la imagen se eligen las fracciones 3, 4, 5, 7 y 8; dado que según las absorbancias medidas en el nanodrop durante la elución son las que se encuentran en los extremos donde se ha encontrado polímero.

**Ilustración 19-SDS-PAGE con marker de proteínas (M), control negativo para ShK (ShK (-)), polímero + buffer de equilibrado (M+Eq), el follow through (Ft), los primeros 50 mL que pasaron del buffer de lavado (WB), y cinco de las fracciones resultantes de la elución (Fr).**

Al interpretar el gel se observa que hay polímero en las fracciones 3, 4, 5, y 7; por lo que también habrá en la fracción 6, por lo que estas serán las fracciones para diálisis y liofilización.

| Nº de lote de VKVMMPsShKHis6tag | mg de polímero |
|---------------------------------|----------------|
| 1                               | 65             |
| 2                               | 41,5           |
| 3                               | 47             |
| 4                               | 37             |
| 5                               | 19,2           |
| 6                               | 3              |
| 7                               | 33             |
| 8                               | 29,4           |
| 9                               | 31,3           |
| 10                              | 25             |
| <b>TOTAL</b>                    | <b>331,4</b>   |

**Ilustración 20- cantidad de lotes y mg de VKVMMPsShKHis6tag obtenidos**

VKVMMPsShKHis6tag a partir de 5 L de medio TB, que al compararse con la producción del polímero VKV purificado por otros métodos (96,25 mg/L) indica que ha habido pérdidas de polímero y el rendimiento es menor.

Además el que no se observen bandas e los carriles del Ft y WB significa que no hay pérdida de polímero durante la purificación.

Después de purificar y liofilizar todo el polímero producido se obtienen: 331,4 mg

Esto implica que el rendimiento del proceso de bioproducción y purificación es de 60,28 mg/L (se obtuvieron 331,4 mg de

#### 4.2.4- Caracterización del polímero VKVMMPsShKHis6tag.

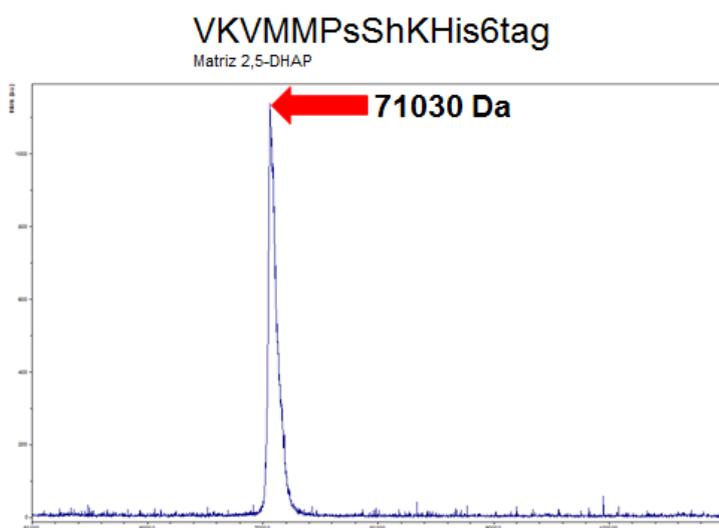
Se llevó a cabo la caracterización del polímero VKVMMPsShKHis6tag obtenido después de todo el proceso de producción, para comprobar si los resultados de la composición esperada del polímero concordaban con el que se quería producir. Se utilizaron técnicas de análisis de aminoácidos y espectrometría de masas.

→Análisis de aminoácidos: partir de 5 mg del polímero VKVMMPsShKHis6tag liofilizado se comprobó la composición aminoacídica del polímero producido. Hay que tener en cuenta que algunos aminoácidos salen muy mal. La técnica tiene una alta variabilidad cuando hay gran disparidad de concentración de aminoácidos dentro de la misma muestra, por eso no coincide la primera columna con la segunda. Los resultados del análisis mostrado en la tabla (ilustración 21) coinciden con la composición aminoacídica esperada del VKVMMPsShKHis6tag.

| Ref. Interna | C18096    | Ref. Externa | VKV-MMP-SHK-His |        |         |
|--------------|-----------|--------------|-----------------|--------|---------|
|              | AA        | Mr patron    | Calculado       |        | Teorico |
|              |           |              | % masa          | count  | count   |
| D            | ASP + GLN | 133,11       | 1,40            | 9,14   | 1 + 4   |
| E            | GLU       | 147,13       | 2,41            | 14,20  | 2       |
| N            | ASN       | 132,12       | 0,00            | 0,00   |         |
| S            | SER       | 105,09       | 1,44            | 11,88  | 8       |
| Q            |           |              |                 |        |         |
| H            | HIS       | 151,9        | 1,54            | 8,79   | 7       |
| G            | GLY       | 75,07        | 27,93           | 323,10 | 332     |
| T            | THR       | 119,12       | 1,14            | 8,30   | 4       |
| R            | ARG       | 174,2        | 1,66            | 8,30   | 4       |
| A            | ALA       | 89,1         | 1,10            | 10,69  | 3       |
| Y            | TYR       | 181,19       | 0,85            | 4,08   | 1       |
| C            | CYS       | 240          | 0,00            | 0,00   | 6       |
| V            | VAL       | 117,15       | 31,29           | 231,96 | 272     |
| M            | MET       | 149,21       | 0,57            | 3,30   | 2       |
| W            | TRP       | 204,33       | 0,00            | 0,00   | 3       |
| F            | PHE       | 165,19       | 0,91            | 4,78   | 2       |
| I            | ILE       | 131,18       | 1,00            | 6,61   | 4       |
| L            | LEU       | 131,18       | 1,68            | 11,11  | 4       |
| K            | LYS       | 146,65       | 5,57            | 32,97  | 30      |
| P            | PRO       | 115,13       | 19,53           | 147,28 | 151     |
|              |           |              | 100             | 836,5  | 840     |

**Ilustración 21-** en la tabla se muestra el número de los diferentes aminoácidos calculados que componen VKVMMPsShkHis6tag, con el porcentaje que suponen de la masa del polímero, respecto a los esperados

→MALDI-TOF



Mediante esta técnica se confirmó el peso molecular del polímero VKVMMPsShkHis6tag, a partir de 1 mg disuelto en agua MQ (1 mg/mL).

El resultado (ilustración 22) obtenido concuerda con el peso teórico del VKVMMPsShkHis6tag (71034 Da)

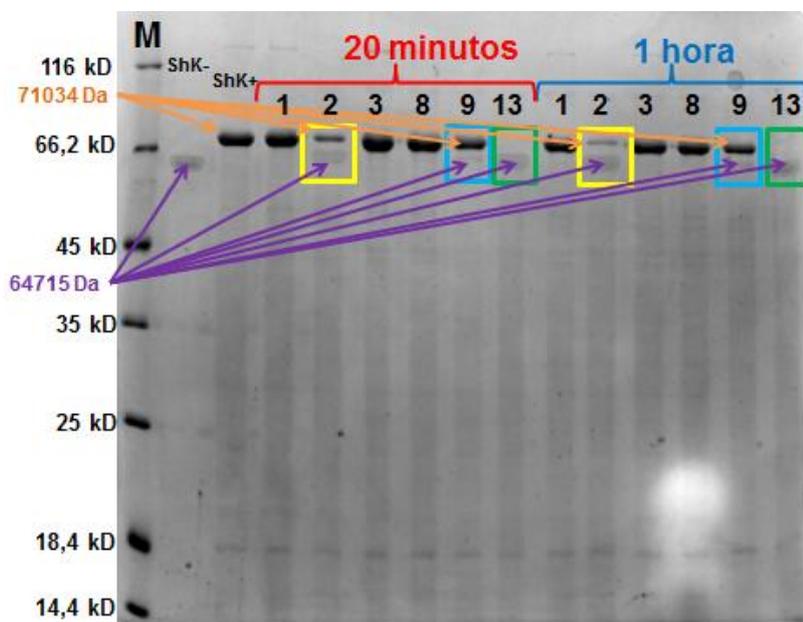
**Ilustración 22-** MALDI-TOF del polímero VKVMMPsShkHis6tag producido, en el que se observa un peso molecular de 71030 Da.

Gracias a la espectrometría de masas, el análisis de aminoácidos y la secuenciación se establece que la composición de polímero resultante de la producción se corresponde con el polímero teórico que se esperaba obtener.

#### 4.2.5 - Ensayo de degradación.

Una vez determinado que el polímero purificado es el que se pretendía producir, se hace un estudio de degradación en el que se analiza la efectividad que tienen diferentes metaloproteasas a la hora de cortar en las secuencias de reconocimiento específicas del bloque MMPs, que haría posible la separación del bloque SHK del polímero permitiéndole llevar a cabo su función.

Tras la incubación del polímero con las metaloproteasas comerciales 1,2, 3, 8, 9 y 13 se analizó su actividad mediante un gel SDS-PAGE. La actividad proteolítica se analizó tras 20 minutos y una hora de incubación, y el gel muestra que las metaloproteasas que cortan efectivamente el polímero son la MMP 2, la MMP13 y MMP9.



**Ilustración 23-** en este gel de proteínas encontramos las bandas resultantes de exponer el polímero VKVMMPsShKHis6tag a cada una de las metaloproteasas 1,2, 3, 8, 9 y 13 durante 20 minutos y durante 1 hora; frente a un marker del peso molecular de proteínas, un control ShK- que se usa de referencia para identificar los casos de degradación, y un control ShK+ que consiste en el polímero VKVMMPsShKHis6tag sin modificar ni degradar para identificar casos en los que no haya degradación.

En el gel resultante (ilustración 23) se observa que de las metaloproteasas que han provocado cortes

en el polímero la MMP2 y la MMP13 son las que han provocado mayor cantidad de degradación, por lo que se lleva a cabo una espectrometría de masas para comprobar su especificidad respecto a los posibles puntos de corte. La MMP9 también corta en su secuencia de reconocimiento pero la cantidad de polímero que se corta respecto al tiempo que dura la reacción es mucho menor a las otras dos. Esto se comprueba porque las bandas correspondientes a polímero degradado se ven a la misma altura que el control ShK- y tienen la misma tinción clara, debido a que no tienen la secuencia ShK y la cola de polihistidinas responsables de la mayor parte de la coloración con comassie blue.

→MALDI-TOF del ensayo de degradación

A partir de los resultados obtenidos en la espectrometría de masas se concluye que:

- MMP13: corta en dos de los sitios de reconocimiento. El corte más frecuente corresponde a su secuencia de reconocimiento específica y el otro corte corresponde a la secuencia específica para la MMP2. En este caso se considera que la MMP13 tiene poca especificidad por su secuencia, ya que hay una elevada frecuencia de cortes en la secuencia específica de MMP2.

- MMP2: también corta en dos de los sitios de reconocimiento del bloque MMP. Uno de esos cortes es mucho más frecuente, correspondiendo a su secuencia específica de corte, mientras que el otro corte con menor frecuencia corresponde a la secuencia de reconocimiento de la MMP13. Por lo que se considera que MMP2 actúa de forma mucho más específica.

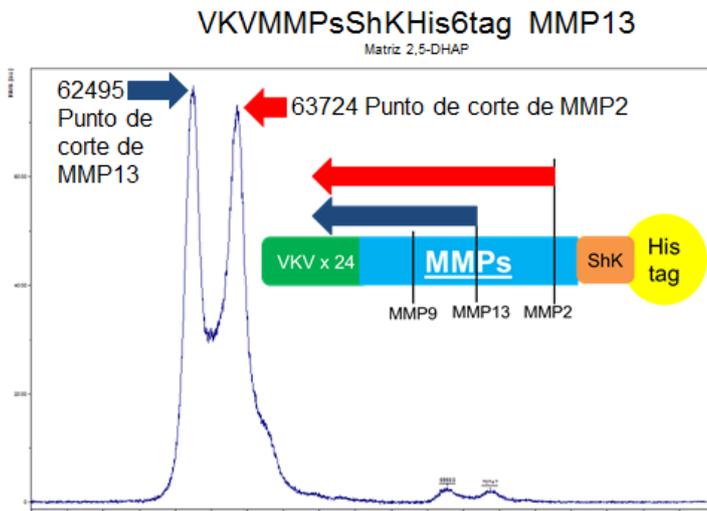
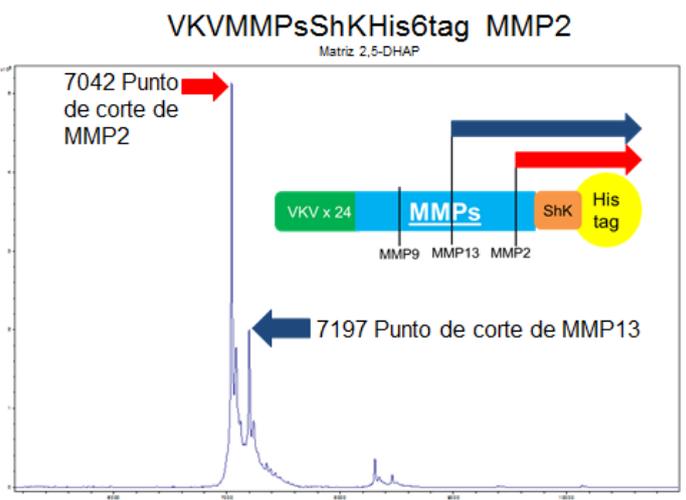
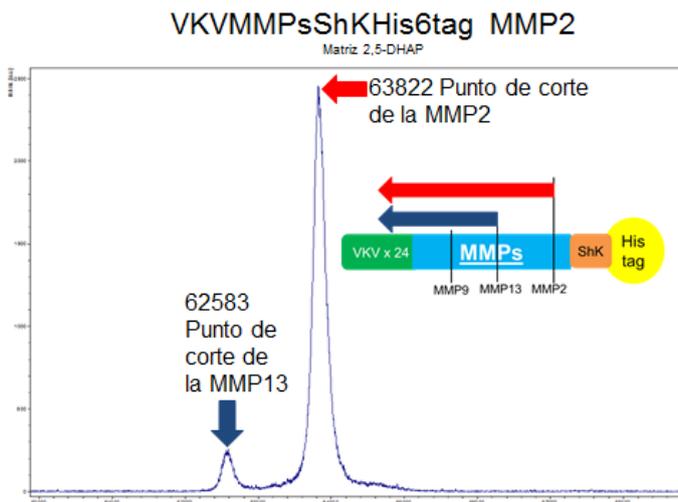


Ilustración 24- En la gráfica de la izquierda se observa la espectrometría de masas resultante de la muestra de VKVMMPsShKHis6tag degradada con MMP13 que representa el peso de los fragmentos correspondientes a la secuencia que va desde el punto de corte hasta al bloque de VKV incluido. En las 2 gráficas de abajo se observa la espectrometría de masas resultante de la muestra de VKVMMPsShKHis6tag degradada con MMP2, una de las gráficas representa el peso de los fragmentos correspondientes a la secuencia que va desde el punto de corte hacia al bloque de VKV (derecha), y en la otra la secuencia que va desde el punto de corte hacia el bloque de ShK y la cola de histidinas.



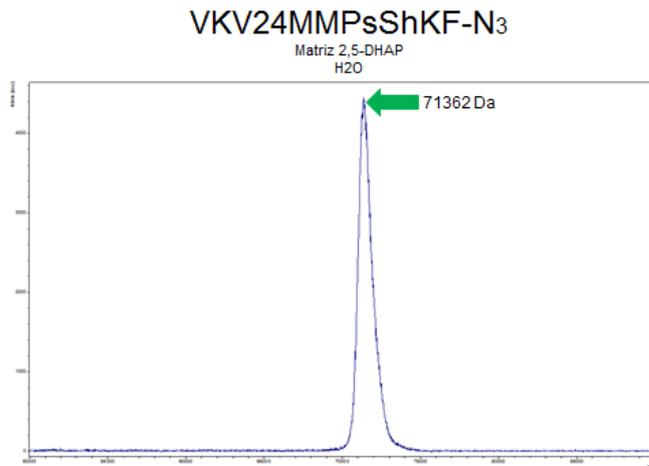
#### 4.2.6-Modificación del polímero con azida

Se ha llevado a cabo la sustitución de los grupos amino correspondientes a los aminoácidos lisina del polímero VKVMMPsShKHis6tag mediante sustitución con carbonato de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) introduciendo grupos azido (-N<sub>3</sub>) para poder utilizar este polímero en la obtención de hidrogeles entrecruzamiento vía química “click” con otros polímeros con grupos ciclooctino [7].

En este caso debido a que solo disponemos de 306.4 mg de polímero VKVMMPsShKHis6tag para modificar se saltan los pasos 4 y 5, descritos en materiales y métodos, procediendo directamente a dializar el polímero modificado para evitar la pérdida del mismo.

Una vez modificado, el polímero resultante se caracteriza con:

- a) MALDI-ToF: mediante la técnica espectrometría de masas, se determinó que el polímero modificado VKVMMPsShKHis6tag-N<sub>3</sub> pesa 71024Da. El peso del

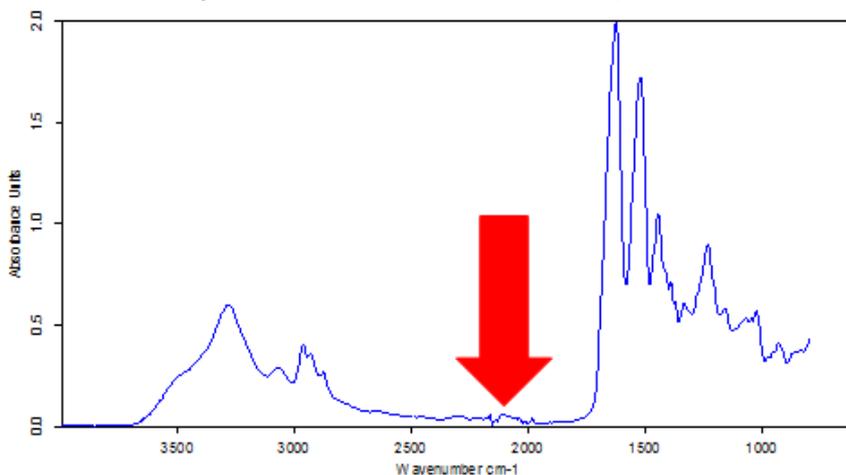


**Ilustración 25-** en esta grafica de resultados de espectrometría de masas se observa el pico representativo del peso molecular del polímero VKVMMPsShKHis6tag-N3 resultante de la modificación química con azida.

polímero modificado, hallado por medio del MALDI-ToF, es de 71362. Teniendo en cuenta que utilizando esta técnica puede haber perdidas de masa que no se observan en la gráfica (ilustración 25) y que la cantidad de lisinas que se modifican es muy reducida (equivalencia=0,25),

pero se observa una diferencia en la masa entre los dos polímeros de unos 330 Da, debida a la modificación química, que puede apreciarse por medio de espectrometría de masas.

- b) FTIR (espectroscopía infrarroja): permite identificar los grupos funcionales de la estructura, los cuales absorben luz infrarroja a diferentes longitudes de onda originando bandas características [12]. Su finalidad es identificar de manera



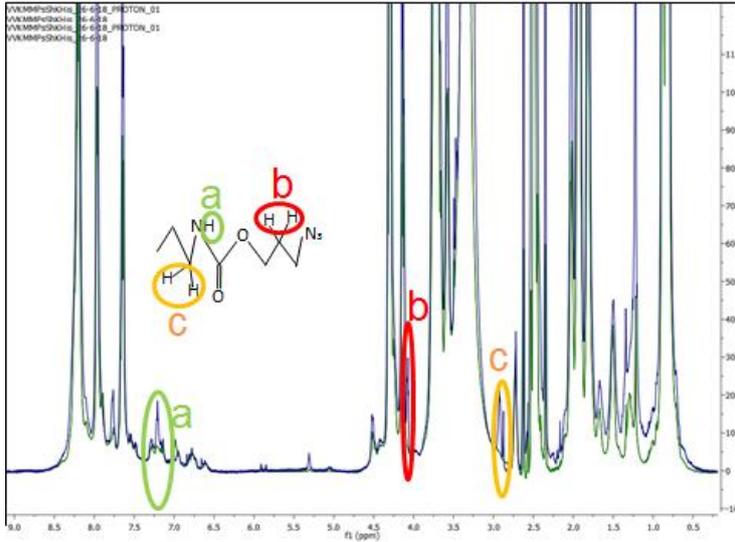
cualitativa la modificación química en el polímero VKVMMPsShK-N3, ya que los grupos azido presentan una banda característica a una frecuencia de 2100  $\text{cm}^{-1}$ , que no aparece en el espectro del polímero sin modificar.

Debido a los resultados observados (ilustración 26), concluimos que ha tenido lugar la modificación química del polímero.

**Ilustración 26-** En la gráfica resultante de la espectrometría infrarroja se identifica un pico a una frecuencia de 2100  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la banda característica de las modificaciones con azida.

- c) RMN (resonancia magnética nuclear): esta técnica permite elaborar un espectro de H para determinar el tipo de estos hidrógenos en función del rango de frecuencia al que resuenan y la cantidad presentes en la estructura del espectro al integrar del área bajo la curva del espectro. De esta manera podemos aplicar los resultados obtenidos para hacer una evaluación cuantitativa de la modificación química del polímero que se caracteriza.

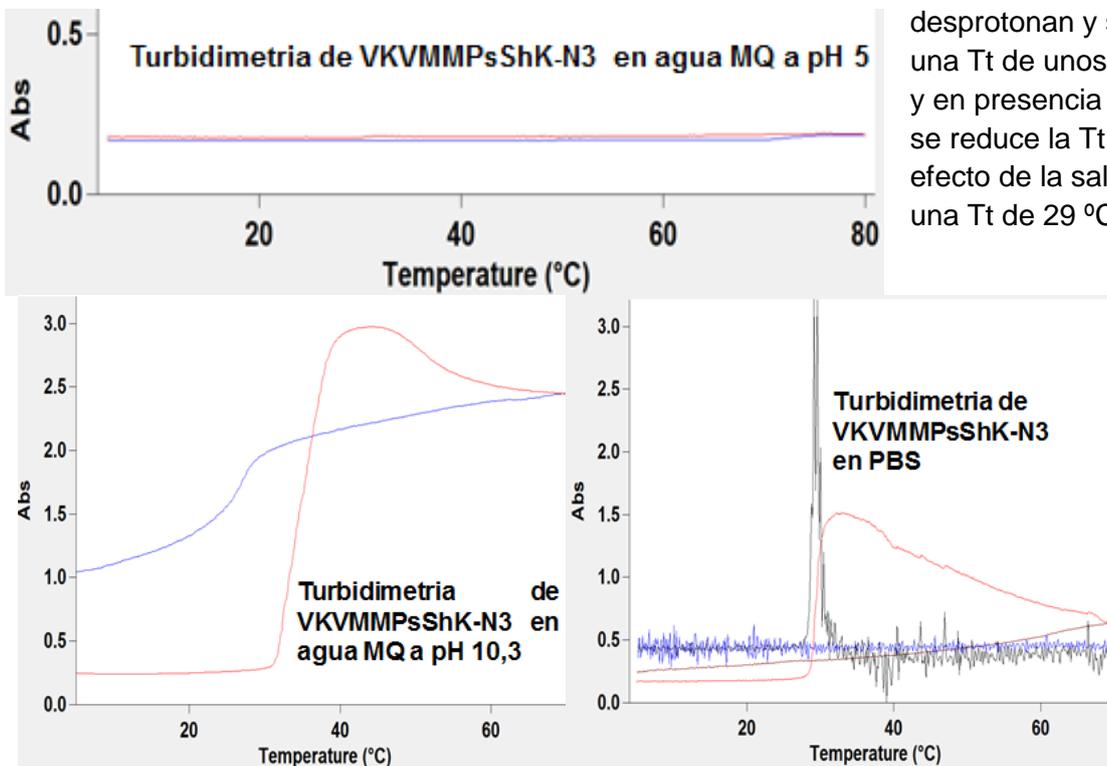
Los resultados (ilustracion27) indican que se han modificado un total de 6 lisinas, lo cual concuerda con los resultados esperados de una equivalencia del 0,025.



**Ilustración 27-** en esta imagen se observan los espectros superpuestos de VKMMPsSHKHis6tag y VKMMPsSHKHis6tag-N<sub>3</sub>. Permite discernir los picos de 3 señales nuevas, presentes en el polímero modificado, a partir de los cuales se puede calcular el número de lisinas modificadas.

Turbidimetria: esta técnica consiste en la medida de la turbidez de una solución o suspensión en la que la cantidad de luz transmitida se cuantifica con un espectrofotómetro o se estima mediante comparación visual con soluciones de turbidez conocida [11]. De manera que se utilizan 2,5-3 mL de polímero modificado con azida en concentración 1 mg/mL para establecer la temperatura de transición del polímero a partir de una gráfica, en la que se representan los cambios de turbidez conforme se aumenta la temperatura y el gel comienza a polimerizar. A partir de la interpretación de los resultados (ilustración 28) se concluye que a pH 5 los grupos aminos de las lisinas estarán protonados (cargas) y por lo tanto el polímero es demasiado hidrófilo para presentar ITT por debajo de 80°C mientras, por el contrario, a pH 10 las lisinas se

desprotonan y surge una Tt de unos 35 °C, y en presencia de PBS se reduce la Tt por efecto de la sal con una Tt de 29 °C.



**Ilustración 28-** Ilustración 27- en estas graficas se representa la absorbancia VKMMPsSHKHis6tag-N<sub>3</sub> conforme aumenta y descende la temperatura, en diferentes medios: en MQ a pH 5 (arriba), en MQ a pH 10,3 (abajo izquierda) y en PBS (abajo derecha).

## **5-CONCLUSIONES**

A partir de los resultados obtenidos de este trabajo se concluye que:

- La construcción de los genes para la expresión de los polímeros deseados ha sido correcta ya que los insertos quedaron en orden y sin duplicaciones del material genético.
- La producción de los polímeros ha tenido lugar de forma satisfactoria. Así como la purificación por cromatografía de afinidad en columna, de la cual hemos obtenido el polímero puro para su liofilización y caracterización, por medio de la cual se estableció que los polímeros resultantes concuerdan con los polímeros, VOKHis6tag y VKVMMPsShKHis6tag, que se querían obtener.
- El estudio de degradación permitió establecer la especificidad de las metaloproteasas humanas por las secuencias de reconocimiento introducidas en el polímero, así como el grado de especificidad y el grado de degradación que generan. Siendo la MMP2 la más específica para su secuencia de reconocimiento, la MMP13 es menos específica pero es la que provoca por ello el mayor grado de degradación; y la MMP9 también provoca degradación al cortar en su secuencia de reconocimiento, pero el grado de degradación que produce es menor.
- La caracterización del polímero VKVMMPsShKHis6tag-N<sub>3</sub>, obtenido de la modificación química de VKVMMPsShKHis6tag con grupos azido, permite establecer que la modificación ha sido exitosa y el polímero resultante puede utilizarse para la elaboración de biogeles destinados al recubrimiento de stents.

Con vistas a futuro, habría que evaluar la efectividad del VKVMMPsSHKHis6tag-N<sub>3</sub> formando hidrogeles con otro polímero modificado y una vez aplicado en el recubrimiento de stents, para ver si cumple todas las funciones esperadas al formar hidrogeles y al liberar el bloque ShK.

## **6- BIBLIOGRAFÍA**

1. Sallach, RE; Cui, W; Balderrama, F; Martínez, AW; et al. Long-term biostability os self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking. *Biomaterials* 2010; 31: 779-791.
2. Arias, F J; Santos, M; Alicia Fernández-Colino, Pinedo, G; Girotti, A. Recent Contributions of Elastin-Like Recombinamers to Biomedicine and Nanotechnology. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014; 14, 819-836.
3. Arias, F J; Rebotto, V; Martin, S; López, I; Rodríguez-Cabello, JC. Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano (bio) technological applications. *Biotechnology Letters*, 2006; 28: 687-695.
4. Girotti A, Fernández-Colino A, López IM, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ. Elastin-like recombinamers: biosynthetic strategies and biotechnological applications. *Biotechnology Journal*, 2011; 6:1174-86.
5. Rodríguez-Cabello, JC; Pierna, M; Fernández-Colino, A; García-Arévalo, C; Arias, FJ. Recombinamers: combining molecular complexity with diverse bioactivities for advanced biomedical and biotechnological applications. *Advances in biochemical engineering/ biotechnology*, 2011; 125: 145-79.
6. Rodríguez-Cabello, J C; Girotti, A; Ribeiro, A; y 1. Arias, F J. Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials. *Methods in Molecular Biology*, 2012; 811: 17-38.
7. González de Torre, I; Santos, M; Quintanilla, L; Testera, A; Alonso, M; Rodríguez Cabello, JC. Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties. *Acta Biomaterialia*, 2014; 10: 2495–2505.
8. González de Torre, I; Wolf, F; Santos, M; Rongen, L; Alonso, M; Jockenhoevel, S; Rodríguez-Cabello, JC; Mela, P. Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases. *Acta Biomaterialia*, 2015; 12: 146–155.
9. Jenkins, GM; Crow, MT; Bilato, C; Gluzband, Y; Ryu, WS; Li, Z; Stetler-Stevenson, W; Nater, C; Froehlich, JP; Lakatta, EG; Cheng, L. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*, 1998; 97: 82-90.
10. Andrew C. Newby. Metalloproteinases and Vulnerable Atherosclerotic Plaques. *Trends Cardiovasc Medicine*, 2007; 17: 253–258.
11. Acebo-González, D y Hernández-García, A T. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2013; Vol. 44, No. 1.
12. FTIR:<https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>
13. Lara, A R. Recombinant protein production in escherichia coli. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2011; Vol. 10, 2: 209-223.
14. Fernández-colino, A; Girotti, A; López, MI; Arias, FJ; Rodríguez-Cabello, JC. Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. *Biomecánica*, 2011; 19: 8-16.