



---

**Universidad de Valladolid**

# **HIDROGELES DE ELASTINA OBTENIDOS POR QUÍMICA *CLIK* PARA EL CRECIMIENTO DIRIGIDO DE CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO**

***TÉCNICAS AVANZADAS EN QUÍMICA ANÁLISIS Y CONTROL DE  
CALIDAD QUÍMICOS***

Autor: Pedro Luis Pérez Alonso  
Tutoras: Mercedes Santos García  
Matilde Alonso Rodrigo

Valladolid, Julio 2021



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN Y ABSTRACT</b>	<b>7</b>
1.1 RESUMEN	7
1.2 ABSTRACT	8
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
2.1 EL SISTEMA NERVIOSO	9
2.2 EL CICLO CELULAR Y LA REGENERACIÓN TISULAR	12
2.3 POLÍMEROS TIPO ELASTINA	14
2.4 PRODUCCIÓN DE POLÍMEROS	16
2.5 HIDROGELES	19
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
4.1 MATERIALES	21
4.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS Y DISOLVENTES	21
4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN	22
4.1.3 CULTIVOS CELULARES	22
4.2 EQUIPAMIENTO INSTRUMENTAL UTILIZADO	23
4.3 TÉCNICAS UTILIZADAS	23
4.3.1 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	23
4.3.2 ESPECTROFOMETRÍA	24
4.3.3 GRABACIONES DE IMÁGENES	25
4.3.4 FLUORESCENCIA	25
4.3.5 MALDI-TOF	26
4.3.6 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	26
4.3.7 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	27
4.4 METODOLOGÍA	28
4.4.1 PRODUCCIÓN DE LOS POLÍMEROS	28
4.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS PRODUCIDOS	29
4.4.3 MODIFICACIÓN QUÍMICA	31
4.4.4 FORMACIÓN DE LOS HIDROGELES	37
4.4.5 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES	37



4.4.6	ENSAYO DE ADHESIÓN TEMPRANA	37
4.4.7	TINCIÓN DE LAS MUESTRAS	38
4.4.8	ESTUDIO DE LA LONGITUD AXONAL	38
4.4.9	ANÁLISIS DE LOS DATOS	38
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
5.1	PRODUCCION Y PURIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO	39
5.1.1	SCREENING	39
5.1.2	PRODUCCIÓN EN BIOREACTOR	40
5.1.3	LISIS CELULAR	41
5.1.4	PURIFICACIÓN	41
5.1.5	USO DEL POLÍMERO	43
5.2	CARACTERIZACIÓN	43
5.3	FORMACIÓN DE HIDROGELES	46
5.3.1	PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES	46
5.3.2	DOMINIO DE LOS HIDROGELES	47
5.4	ENSAYOS IN VITRO	47
5.4.1	ENSAYO DE ADHESIÓN PRELIMINAR	47
5.4.2	ENSAYO DE CRECIMIENTO AXONAL	49
5.4.3	PRÓXIMOS TRABAJOS	53
5.5	OTROS ESTUDIOS SIMILARES	54
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>BILIOGRAFÍA</b>	<b>59</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Reactivos utilizados y su casa comercial. _____	21
Tabla 2	Disoluciones usadas para la producción de los polímeros. ____	22
Tabla 3	Materiales utilizados para la experimentación in vitro. ____	22
Tabla 4	Relación de técnicas y equipos utilizados. _____	23
Tabla 5	Secuencia de aminoácidos abreviada con el peso molecular de los polímeros usados. La secuencia de adhesión celular está en rojo, los dominios sensibles a proteasas de degradación rápida y lenta se encuentran en verde y azul, respectivamente. Tomado de [59]. _____	28
Tabla 6	Secuencia de los péptidos IK y QK comprados a BACHEM para la modificación química. _____	32
Tabla 7	Lista de los polímeros que se mezclan para crear los diferentes hidrogeles. _____	37
Tabla 8	Media y desviación estándar de las medidas tomadas a los axones de las células C6. _____	51





## 1. RESUMEN Y ABSTRACT

### 1.1 RESUMEN

El sistema nervioso es el encargado de generar y transmitir las señales necesarias para coordinar todo el cuerpo. Las células que lo componen, neuronas y células gliales, poseen muy limitada su capacidad de regeneración en humanos adultos, por lo que cualquier daño que reciban será casi irreversible. La elastina es una proteína que forma parte de la matriz extracelular. Mediante técnicas de ingeniería genética se pueden diseñar polímeros proteicos que imiten a esta elastina e incluir en sus secuencias dominios específicos de adhesión y/o degradación.

En este Trabajo Fin de Master se han producido polímeros recombinantes tipo elastina, ELRs (Elastin-like recombinamers), usando una cepa no patógena de *E.coli*. Asimismo, se han realizado modificaciones químicas en estos biopolímeros ELRs para introducir en ellos los grupos funcionales necesarios para llevar a cabo química *click* entre sus cadenas, de manera que se puedan formar hidrogeles por entrecruzamiento de dichos polímeros.

Los hidrogeles preparados se han utilizado como soporte en el cultivo de células gliales C6 con objeto de estudiar el comportamiento celular en diferentes entornos peptídicos. Se ha estudiado su comportamiento en cuanto a su adhesión y proliferación con el tiempo. La medición de la longitud del axón mediante técnicas inmunohistoquímicas, que permite la identificación de dicho axón, nos permite proponer a este tipo de hidrogeles de elastina como potencialmente adecuados para promover y dirigir el crecimiento de estas células. Por tanto, estos hidrogeles se muestran como potenciales análogos de tejido con importante papel en regeneración de tejido neuronal dañado, con la posibilidad en el futuro de trasladarlo a las neuronas.



## 1.2 ABSTRACT

The nervous system is in encharged of generating and transmitting the necessary signals to coordinate the entire body. It is composed by two different types of cells, neurons and glial cells. They have a very limited capacity for regeneration in adult humans. Any damage they receive will be almost irreversible. Elastin is a protein that is part of the extracellular matrix. Using genetic engineering techniques, we can design protein polymers that mimic this elastin and add specific sequences such as adhesion or degradation domains.

In this work we produced Elastin-like recombinamers (ELRs), using a non-pathogenic strain of *E.coli*. We made chemical modifications to these polymers to be able to do click chemistry between their chains. Crosslinking allows the formation of hydrogels.

The prepared hydrogels were used as surface for the culture of glial cells C6, so we can study their behavior in different peptide environment. We studied their adherence and proliferation. Using immunostaining we can identify and measure their axon length. The results allow us to propose these hydrogels as potentially suitable for enhancing and leading the growth of this cells. Therefore, these hydrogels present potential tissue analogs with important role in the regeneration of damaged neural tissue, with the possibility in the future of transferring it to neurons.





## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso sigue siendo un gran misterio para la humanidad. Con el paso de los años, se han ido descubriendo cosas que no se sabían antes e incluso, algunos han hecho cambiar completamente la percepción que se tenía del sistema nervioso. El sistema nervioso se clasifica en dos grupos: el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP). Tanto el central como el periférico comparten ciertas similitudes, pero también tienen grandes diferencias, lo que les permite desempeñar y desarrollar diferentes funciones.

Las células más conocidas del sistema nervioso son las neuronas, pero la glía que es bastante menos conocida, tiene bastante importancia en el sistema [1]. Hasta el siglo XIX, lo poco que se sabía del sistema nervioso se debía a que no existían técnicas adecuadas para poder visualizar estas células. No fue hasta finales del siglo XIX, que gracias a la tinción de Golgi (inventada por Camilo Golgi), por primera vez se pudo teñir las neuronas con dicromato de osmio y nitrato de plata.

El problema de esta tinción era que sólo se teñía menos del 1% de las neuronas, pero las que se teñían, se teñían completamente [2]. Gracias a esta tinción surgieron dos teorías, una mucho más conocida que la otra: la teoría reticular y la teoría neuronal. La primera fue establecida por Golgi en la que decía que las conexiones de las neuronas eran al azar, no existía polaridad celular y tampoco había un espacio sináptico. La otra teoría, la neuronal, refutaba la anterior y fue creada por Santiago Ramón y Cajal.

Esta teoría afirmaba que existía una separación entre las células, que mediante conexiones especializadas (sinapsis) las células podían comunicarse entre ellas, y las partes que participaban en la conducción nerviosa eran el cuerpo celular (soma) y la prolongación (axón).

También afirmaba que existía una polaridad, por ello la comunicación era unidireccional. Además, existía una alta organización entre las células, por lo que las conexiones no podían ser por azar. Camilo Golgi y Santiago Ramón y Cajal recibieron el Nobel de medicina en 1906, por las aportaciones de la tinción de Golgi y los dibujos y teoría neuronal de Ramón y Cajal [3]. Basándose en los estudios de Ramón y Cajal, Heinrich Wilhelm Gottfried Waldeyer nombró a esa célula nerviosa, que era la unidad estructural básica del sistema nervioso (ver figura 1), como neurona, que es como la conocemos hoy en día [4].

La escuela de Ramón y Cajal ha sido muy importante en el campo de la neurología, ya que produjo muchos descubrimientos, como el protagonizado por su discípulo Pío del Río Hortega que identificó la microglía y los oligodendrocitos [5].



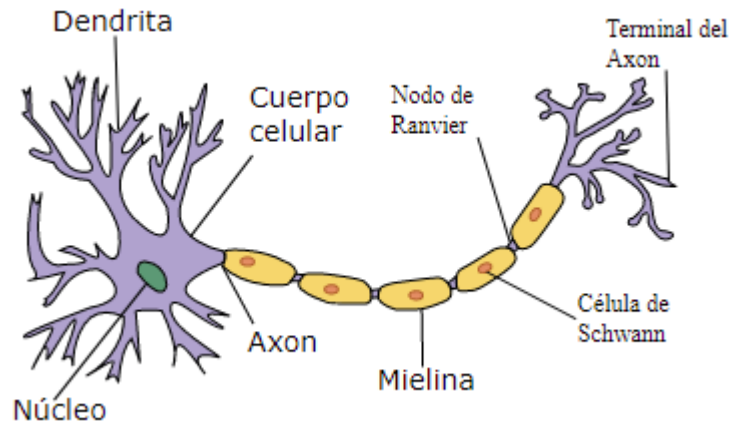


Figura 1 Estructura de una neurona.

La neurona es la unidad estructural básica del sistema nervioso. Es una célula con características especiales, todas ellas dirigidas a la mejora de la transmisión de los impulsos eléctricos que actúan como señales. La primera característica es su polaridad causada por la distribución desigual de iones a lo largo de la membrana permite que sea excitable, permitiendo que todas las señales que se transmiten por las neuronas vayan en un sentido y no puedan retroceder.

Cada una de las diferentes partes de las neuronas, el soma, las dendritas y el axón, participa en una fase diferente de la transmisión de las señales. El soma es el cuerpo de la neurona, donde se sitúa el núcleo y es el eje central de la célula, que se encarga de recoger, analizar y ordenar la transmisión de las señales [6]. Las otras dos partes, el axón y las dendritas son las principales estructuras de la sinapsis celular, la forma en la que se comunica la neurona con otras células, que puede ser eléctrica o química. La sinapsis química se produce por la liberación de neurotransmisores y la eléctrica por el paso de iones [7]. Y aquí es donde la segunda característica especial de las neuronas entra en juego: la membrana permite la conducción de los impulsos nerviosos, debido a que posee muchos canales iónicos dependientes de voltaje.

El potencial de la membrana en reposo es de  $-65$  mV, y viene dado por la diferencia de concentración de iones en el interior y exterior celular. Este potencial puede variar por el movimiento de los iones, principalmente  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . Cuando entran iones positivos en la célula, el potencial de membrana se vuelve más positivo y decimos que la membrana se despolariza, y si se vuelve más negativo que se repolariza.

El movimiento de iones se produce gracias a los transportadores iónicos. El impulso nervioso no se transmitirá hasta que no se produzca un potencial de acción, es decir, hasta que el potencial de membrana no supere

el potencial umbral no se producirá el impulso nervioso. Se activarán los transportadores de iones, que permitirán el traslado del potencial por todo el axón hasta el botón sináptico. Dependiendo del tipo de sinapsis, se liberará un neurotransmisor (sinapsis química) o ion (sinapsis eléctrica), que será recibida por la célula siguiente. Si la célula receptora es una célula nerviosa, el impulso será recibido por las dendritas que transmitirán el impulso hasta el soma de la neurona [8].

Para que el impulso nervioso se transmita lo suficientemente rápido, el axón está recubierto de una sustancia denominada mielina, que permite que la transmisión del impulso llega a una velocidad media de 10 metros por milisegundo [9]. La neurona está siempre acompañada de otras células llamadas células gliales o glía (ver figura 2).

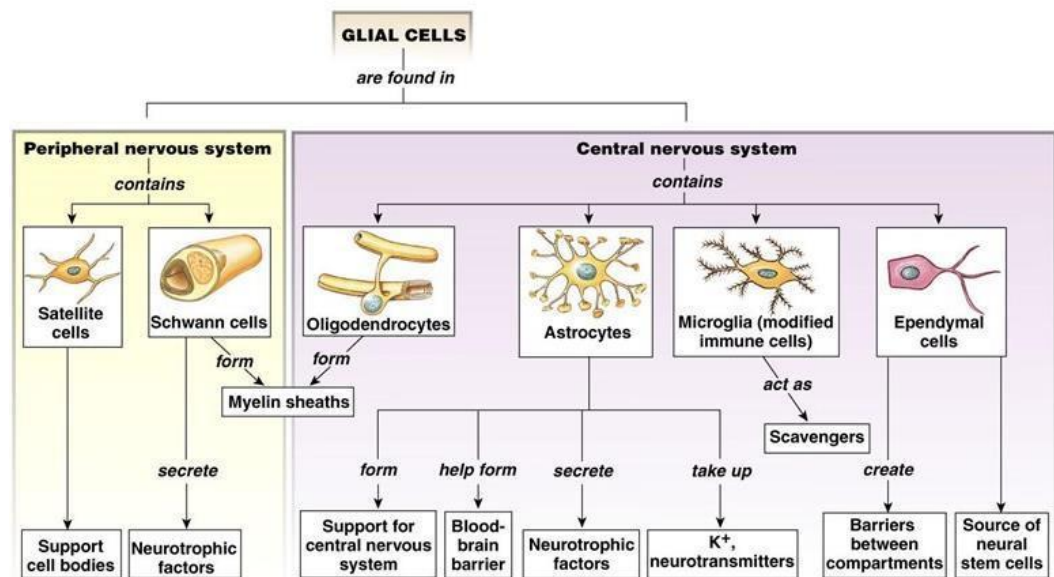


Figura 2 Clasificación de las células gliales, diferenciándolas entre las pertenecientes al sistema nervioso central o al sistema nervioso periférico. Algunos de estos tipos celulares realizan funciones similares como las células de Schwann y los oligodendrocitos.

La relación neurona:glia es de 1:10, es decir que hay muchas más células gliales que neuronas [10]. Las células gliales realizan funciones muy importantes que la neurona no realiza. Poseen prolongaciones nerviosas, son excitables, pero no pueden producir nuevas señales.

Otra de las diferencias con respecto a las neuronas, es la capacidad proliferativa de las glías, que es mucho mayor que la de las neuronas. Atendiendo al sistema nervioso al que pertenezcan las glías, podemos encontrar células satélites, de Schwann (SNP) y oligodendrocitos, astrocitos, microglías y ependimocitos (en el SNC).

Cada tipo celular desempeña una función diferente. Las únicas que comparten función son las células de Schwann y los oligodendrocitos.

Mientras que el oligodendrocito en el SNC puede mielinizar hasta 60 axones a la vez, la célula de Schwann solo mieliniza una parte de un axón.

Los oligodendrocitos tienen otras funciones tróficas y de regulación del metabolismo neuronal. Por tanto, las células gliales son las que apoyan a las neuronas para que éstas pueden cumplir su función a la perfección [7, 11, 12].

## 2.2 EL CICLO CELULAR Y LA REGENERACIÓN TISULAR

Todas las células siguen un ciclo celular que contiene diferentes fases. En cada una de estas fases van ocurriendo diferentes procesos controlados por diferentes proteínas. El ciclo celular es el mecanismo esencial por el cual un organismo se puede reproducir y reparar sus tejidos dañados. Las células pueden duplicar su DNA y distribuir las copias entre las células hijas. Existen 4 fases (ver figura 3).

La fase M o mitosis se produce cuando la célula distribuye su material genético en dos y se divide en 2 células hijas. El resto de fases se engloban en la Interfase, que es cuando la célula no se está dividiendo. La fase G<sub>1</sub> es el estado entre la fase M y S. La fase S se produce cuando la célula empieza a replicar su DNA.

Por último, está la fase G<sub>2</sub>, que es el estado intermedio entre S y M. La mayor parte del tiempo, las células se encuentran en fase G<sub>1</sub>, en el momento que pasa a fase S la célula tiene que acabar el ciclo. Una célula en fase G<sub>1</sub> puede entrar en fase G<sub>0</sub>, en la que las células no se dividen, pero están activas [13, 14]. El tiempo que permanece en cada ciclo celular depende del tipo celular. Las células epiteliales (de la piel) se dividen muy rápidamente; en cambio, las células hepáticas tardan mucho en dividirse.

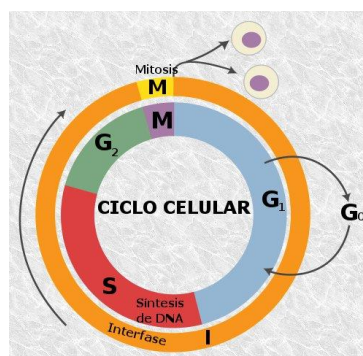


Figura 3 Representación del ciclo celular. Se puede diferenciar La interfase con sus fases características y la mitosis dando lugar a dos células hijas. Estas células a su vez continuarán con su propio ciclo celular pudiendo pasar a la fase G<sub>0</sub>.

Las células madre son aquellas que pueden dividirse constantemente, según los tipos celulares que puedan originar se denominan de una manera u otra. Cuando se van dividiendo, las células hijas van diferenciándose, lo que permite que vayan adquiriendo características del tipo celular que serán al final, pero van perdiendo la capacidad de proliferación [15].

El valle de Waddington es una representación gráfica de este suceso (ver Figura 4). Una célula puede bajar el valle mientras se va diferenciando, pero no puede volver a subir. En principio se pensaba que era así, pero la aparición de la epigenética y de los genes de Yamanaka en los últimos años, ha mostrado que se pueden reprogramar las células para que puedan subir ese valle y puedan seguir dividiéndose [16, 17].

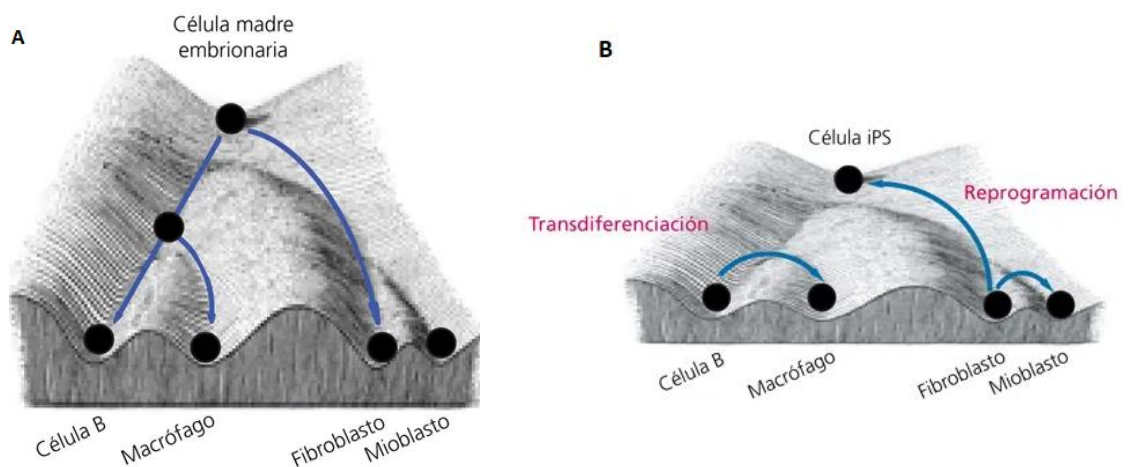


Figura 4 A) Representación del valle de Waddington en el que las células sólo podían diferenciarse. B) Representación del mismo valle con los avances de la epigenética, en el que una célula puede reprogramarse para que ascienda y pueda diferenciarse.

Existen otro tipo de células con capacidad proliferativa ilimitada que son las células tumorales. En este caso, las células sufren un acúmulo de mutaciones en su material genético que evita que los mecanismos de control del ciclo celular funcionen correctamente, por lo que están replicándose constantemente, dando lugar a la producción de los tumores [18].

En el sistema nervioso, la regeneración celular es especial [19]. Los organismos inferiores tienen una alta capacidad regenerativa, pero en humanos es limitada y presenta diferentes comportamientos entre el SNC y el SNP [20].

Tal es el caso de Henry Head que se cortó los nervios periféricos de uno de sus brazos, por lo que perdió toda su sensibilidad y control motor de esa zona. Henry Head recuperó muy poco la sensibilidad a la presión y el tacto

a las 6 semanas; hasta los 2 años no pudo discriminar temperaturas, pinchazos y el control motor fino. Fue necesario el paso de 4 años para que pudiera recuperar totalmente la sensibilidad y el control motor [21, 22].

Sin embargo, en el caso de los ratones sí que hay nichos en el hipocampo que permiten la regeneración celular, pero fuera del hipocampo y en el humano no se tiene todavía constancia de una posible regeneración [23].

### 2.3 POLÍMEROS TIPO ELASTINA

Los organismos están formados por multitud de moléculas diferentes, algunas de las cuales presentan mayor complejidad estructural que otras, pero todas ellas desempeñan una o varias funciones. Existen 4 grandes grupos dentro de las biomoléculas orgánicas: hidratos de carbono, ácidos nucleicos, aminoácidos y lípidos. Algunas de las funciones que pueden desempeñar son estructurales, metabólicas, reguladores y de almacenamiento de información [24, 25].

Las proteínas son cadenas de aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En la naturaleza, existen 20 aminoácidos distintos (ver figura 5); por lo tanto, la diferente combinación de éstos da lugar a diferentes secuencias o, lo que es lo mismo, a diferentes proteínas. No sólo es importante el tipo de aminoácido que forma la proteína, sino el lugar que ocupa en la cadena y la longitud de ésta, ya que mediante interacciones atractivas o repelentes en las moléculas provocarán que éstas adopten una forma u otra que será la responsable de que la proteína desarrolle una determinada función [26].

Abreviación	Aminoácido
A	<i>Ala</i> Alanina
C	<i>Cys</i> Cisteína
D	<i>Asp</i> Ac. Aspartico
E	<i>Glu</i> Ac. Glutámico
F	<i>Phe</i> Fenilalanina
G	<i>Gly</i> Glicina
H	<i>His</i> Histidina
I	<i>Ile</i> Isoleucina
K	<i>Lys</i> Lisina
L	<i>Leu</i> Leucina
M	<i>Met</i> Metionina
N	<i>Asn</i> Asparragina
P	<i>Pro</i> Prolina
Q	<i>Gln</i> Glutamina
R	<i>Arg</i> Arginina
S	<i>Ser</i> Serina
T	<i>Thr</i> Treonina
V	<i>Val</i> Valina
W	<i>Trp</i> Triptofano
Y	<i>Tyr</i> Tirosina

Figura 5 Código de 1 y 3 letras para cada aminoácido.



La elastina es una proteína presente en la matriz extracelular cuya principal función es aportar elasticidad a los tejidos. Esta proteína presenta una secuencia aminoacídica en la que se repite con frecuencia el dominio VPGXG (en el código de 1 letra) o Val-Pro-Gly-X-Gly (código de 3 letras); siendo X cualquier aminoácido menos la prolina (P/Pro). La elastina es una proteína que cumple un papel estructural bastante importante formando la matriz estructural debido a su elasticidad y resiliencia que se puede adaptar a multitud de tejidos. La elastina puede entrecruzarse formando así una red que puede interactuar con otras proteínas, ya sean celulares o de la propia matriz extracelular [27].

Los polímeros tipo elastina (ELPs) presentan unas características especiales que les confiere una gran utilidad no sólo para su uso en biomedicina sino también para su producción en biorreactores [28].

Los ELPs presentan un comportamiento singular en soluciones acuosas ya que presentan una agregación reversible según la temperatura. Cada polímero tiene una temperatura de transición ( $T_t$ ), que es una temperatura crítica en la conformación estructural del polímero, por lo que a diferentes temperaturas la conformación del polímero es diferente. Si el polímero se encuentra a una temperatura inferior a la  $T_t$  se encontrará disuelto, pero si la temperatura es superior, se formarán agregados que permitirán la precipitación del polímero [29, 30].

La temperatura a la que se produce esta transición,  $T_t$ , se ve afectada por diversos factores como la concentración del polímero o la presencia de sales. En el caso de las sales, al aumentar la concentración de éstas, la temperatura de transición disminuye. Para la purificación de estos polímeros se aprovecha mucho esta transición inversa con la temperatura (ITT) y cómo se ve modificada la temperatura de la transición,  $T_t$ , por la presencia de sales [31].

Si la temperatura a la que trabajamos nuestro polímero es inferior a la temperatura de transición, las cadenas poliméricas se encuentran desordenadas e hidratadas por la formación de clatratos, que son las moléculas de agua dispuestas alrededor de los residuos apolares del polímero.

En cambio, si la temperatura de trabajo es superior a la de transición, estos clatratos se rompen por la agitación térmica y la conformación del polímero cambia a una hélice  $\beta$ , en la que los residuos apolares están en el exterior y en el interior de la hélice los residuos polares que retienen moléculas de agua cuando se transiciona de una conformación a otra (ver figura 6). Por estas características, estos polímeros son unos buenos candidatos para su uso en ingeniería de tejidos o para la administración controlada de diversos fármacos [32, 33].







Existen numerosas cepas, algunas patógenas y otras no. Es una bacteria bastante fácil de crecer, ya que no requiere condiciones muy estrictas y fácilmente asequibles [35, 36].

Las bacterias poseen plásmidos, que son unas estructuras de DNA extracromosómico que pueden replicarse independientemente. Por tanto, si añadimos nuestro inserto que codifica para nuestro polímero, conseguiremos que las bacterias lo produzcan. Es necesario realizar un estudio exhaustivo del vector que usaremos (el plásmido que utilizaremos) como del inserto.

Los vectores de expresión (ver figura 7) llevan diferentes secuencias que permiten modificar la transcripción de los genes que se encuentran a continuación, ya sea aumentando o inhibiendo la expresión de manera constitutiva o dependientes de un sustrato. Es un proceso complejo en el que cualquier error puede ocasionar que no se produzca la expresión de nuestro inserto o se requieran ciertas condiciones para que nuestro gen se exprese.

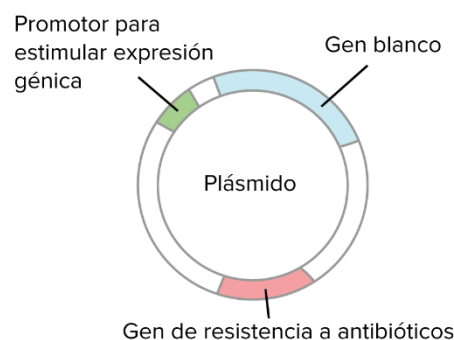


Figura 7 Estructura simplificada de un plásmido que se usa para la expresión de un gen que codifica para una proteína de interés.

Hay que comprobar qué enzimas de restricción (reconocen secuencias específicas y producen un corte en la cadena) se van a usar para añadir nuestro inserto, así como verificar que esté en el marco de lectura correcto para producir nuestra proteína. Una vez realizada la transformación bacteriana y una vez comprobado que está nuestro inserto, se ponen a crecer las bacterias para que se dividan y poder congelar varios stocks de nuestras bacterias transformadas [34].

Esto se debe a que las polimerasas (enzimas que transcriben o replican ácidos nucleicos) no son perfectas, y pueden cometer algunos errores, algunas tienen capacidad correctora de errores y otras no [37]. Estos errores son mutaciones que, al acumularse durante sucesivas replicaciones, pueden desembocar en la no producción de nuestra proteína o que expresen otra diferente. Por tanto, tener un stock que no ha sufrido apenas replicaciones es útil para evitar tener que realizar todo el proceso una vez que no podamos usar un stock [38].

Para realizar la producción hay que obtener un inóculo de una colonia aislada (indicativo que todas las bacterias han surgido de una misma). Esta colonia la elegiremos mediante un screening previo, que es una pequeña producción que haremos en las mismas condiciones que luego usaremos en el biorreactor.

Mediante electroforesis en gel de acrilamida podremos observar las bandas correspondientes a las proteínas. En el gel, las proteínas se desplazan según su tamaño: cuanto más pequeño es éste avanzarán más rápido.

Una vez elegida la colonia que más exprese nuestra proteína, el siguiente paso consiste en hacer el inóculo. Las fases del crecimiento bacteriano incluyen inicialmente una fase *lag* o latencia en la que se produce la adaptación al medio, por lo que apenas crecen; posteriormente se produce una fase exponencial donde las bacterias se reproducen. La siguiente fase es la estacionaria donde no hay grandes cambios en la población, seguida de la fase de muerte donde empiezan a acabarse los nutrientes y las células mueren.

Como queremos producir y evitar gastar tiempo y dinero, tenemos que conseguir una proporción del volumen total del reactor que se encuentre en fase exponencial. Como se trabaja con microorganismos, la esterilidad es muy importante ya que cualquier contaminación puede hacer que nuestra bacteria no crezca, por eso se esteriliza el medio del biorreactor en un autoclave antes de añadir nuestro inóculo.

El fermentador permite controlar las condiciones necesarias para una producción óptima como la temperatura, CO<sub>2</sub>, pH, presión, así como mantener estas condiciones a lo largo del proceso. Mediante la medida de la absorbancia de las muestras de producción podremos observar en qué fase se encuentra nuestro cultivo. Una mayor absorbancia implica un mayor crecimiento celular, que no siempre es indicativo de una buena producción, ya que las condiciones óptimas de crecimiento no tienen por qué ser iguales a las óptimas de producción.

Después de extraer el contenido del biorreactor, se realizarán lavados con tampón de lavado de bacterias y centrifugaciones sucesivas para eliminar todo el medio que pudiera haber. Mediante un disruptor que, por presión diferencial, romperá las membranas bacterianas, se liberará nuestro polímero. Se añaden inhibidores de proteasas porque éstas pueden degradar nuestro polímero.

La última fase de la producción es la purificación, en la que se aprovecha la agregación reversible de los polímeros con la temperatura. Dependiendo del polímero, se realizarán centrifugaciones sucesivas en frío o en caliente para ir eliminando proteínas que no son de interés.



También se puede modular el pH para favorecer que precipite la proteína. Una vez eliminada todas las impurezas se realizarán diálisis para eliminar todas las sales que puedan quedar. Por último, se filtrará y liofilizará, obteniéndose nuestro polímero puro y estéril. Es un proceso largo y costoso. Por cada 15 litros de medio que se usa se obtienen unos 2-3 gramos de polímero, dependiendo del que se produzca [39, 40].

## 2.5 HIDROGELES

Los hidrogeles son redes que se forman a partir de polímeros naturales o sintéticos. Normalmente se mezclan dos polímeros diferentes para obtener un hidrogel con unas características determinadas que no pueden obtenerse a partir de un solo polímero [41]. Por lo general son materiales con una gran capacidad de absorción de agua y pueden llegar a absorber incluso de 500 a 600 veces su peso en agua, dependiendo del hidrogel. Debido a esta capacidad de absorción de agua, presentan unas propiedades bastante similares a los tejidos biológicos.

Los hidrogeles son materiales que tienen un futuro bastante prometedor en la regeneración tisular y de aplicación, por ejemplo, en heridas o en quemaduras [42]. Al permitir que el área con el hidrogel esté hidratada, el exceso de agua exudado se absorbe y, al cubrir el tejido sin adherirlo, permite una mayor y mejor regeneración. Además, muchos hidrogeles son transparentes lo que permite que se pueda ir monitorizando el proceso de regeneración, otros son traslúcidos [43, 44].

Para mejorar la bioactividad de los hidrogeles, los polímeros se pueden diseñar de manera que sean capaces de liberar fármacos de manera controlada, o que favorezcan la adhesión de células específicas o de proteínas. También pueden diseñarse para que sean sensibles a proteasas específicas de manera que pueda degradarse a lo largo del tiempo, permitiendo que las células se adhieran y vayan creciendo sobre el hidrogel, mientras éste se va degradando, permitiendo una regeneración del tejido similar a la inicial y sin necesidad de eliminarlo puesto que se va absorbiendo progresivamente [45].

Para obtener nuestros hidrogeles realizaremos una modificación química a los dos polímeros que usaremos para crear cada tipo de hidrogel. Esta modificación es necesaria para poder utilizar la *química click* como reacción de entrecruzamiento de las cadenas de los polímeros tipo elastina.

El término "*química click*" fue introducido en 2001 por K. Barry Sharpless para referirse a aquellas reacciones con un rendimiento muy alto, que requieran condiciones suaves, que puedan realizarse en disolventes no tóxicos o que se puedan eliminar fácilmente sin la producción de subproductos.



La reacción elegida en este trabajo es la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos, que cumple con las características de la química *click*. En general, esta reacción requiere  $\text{Cu}^+$  como catalizador, pero la elección de alquinos activados tales como los derivados de ciclooctino evita la utilización de catalizador en la reacción.

Las modificaciones químicas se realizarán sobre los grupos aminos de las cadenas laterales del polímero, perteneciente a los aminoácidos lisina. Realizaremos reacciones de modificación mediante reacción de sustitución nucleófila con los correspondientes derivados de N-hidroxisuccinimidil ester que permiten introducir los grupos azido y ciclooctino necesarios para obtener nuestro hidrogel [46].



### 3. OBJETIVOS

El tejido nervioso tiene una regeneración limitada respecto a otros tipos de tejidos. El uso de hidrogeles con secuencias específicas que favorezcan el crecimiento de las células neuronales y de una manera dirigida podrían ayudar en la regeneración de este tejido, para poder usarlo en clínica y regenerar los tejidos nerviosos dañados y así tratar las enfermedades causadas por el daño a estas células.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 MATERIALES

##### 4.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS Y DISOLVENTES

Los reactivos y disolventes listados en la siguiente tabla (ver tabla 1) son los que se han utilizado, indicando también su casa comercial.

REACTIVO	CASA COMERCIAL	REACTIVO	CASA COMERCIAL
(3-amino propil)-trimetoxisilano	Sigma-Aldrich	Dodecil sulfato sódico(SDS)	Apollo Scientific
Acetona	Sigma-Aldrich	Etanol	Panreac
Ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich	Glicerol	Fisher-Scientic
Acrilamida	Iberlabo	Glucosa	Acros
Ampicilina	Panreac	Hidróxido sódico	Panreac
Carbonato de (1R,8S,9S) bicyclo [6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo	Galchimia	Metanol	Scharlau
Carbonato de 2-Azidoethyl (2,5-dioxopirrolidin-1-il)	Synaffix	Persulfato de diamino	Sigma Aldrich
Diciclohexilcarbodiimida(DCC)	Sigma-Aldrich	Sulfato de cobre	Fluka
Diclorometano(DCM)	Sigma-Aldrich	TEMED	Sigma-Aldrich
Diethyl éter	Scharlau	THF	Scharlau
Dimetilformamida (DMF)	Acros Organics	Trietilamina	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	Tris(hidroximetil)aminometano(TRIS)	Sigma Aldrich

Tabla 1 Reactivos utilizados y su casa comercial.

### 4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN

Para la producción se utilizaron los siguientes medios para el crecimiento de las bacterias y para el lavado de células las disoluciones (ver tabla 2).

- ✓ LB: medio de cultivo rico nutricionalmente para el crecimiento de bacterias. Se prepara a una concentración de 25g/L en agua destilada. Requiere esterilización en autoclave. Casa comercial Conda
- ✓ LB agar: para la preparación de placas necesarias para sembrar. Preparado con 25 g/L de medio LB y 15 g/L de agar.
- ✓ TB: medio usado para mejorar la expresión de los plásmidos de E.coli. Preparado a una concentración de 55.8 g/L y se le añade 8 mL/L de glicerol.

TAMPÓN	BUFFER	SAL	OTROS
Tampón de lavado	Tris pH 8 20 mM	NaCl 0.2 M	-
Tampón de sonicación	Tris pH 8 20 mM	-	EDTA 1 mM

Tabla 2 Disoluciones usadas para la producción de los polímeros.

### 4.1.3 CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron los siguientes materiales para la realización de los estudios in vitro (ver tabla 3).

MATERIAL	CASA COMERCIAL
Millicel EZ slice 8-well	Thermo Scientific
Células gliales de rata C6	ATCC
Medio F-12k	ATCC
Suero Fetal Bovino	Lonza
Suero de caballo	Gibco
Paraformaldehído	Sigma Aldrich
Tritón X-100	Sigma Aldrich
BSA	Sigma Aldrich
PBS	
Anticuerpo primario Anti-beta III tubulin	Abcam
Anticuerpo secundario Goat Anti-rabbit IgG H&L (AlexaFluor® 488)	Abcam
Rhodamine-Phalloidin	Invitrogen
Medio de montaje con DAPI	Abcam

Tabla 3 Materiales utilizados para la experimentación in vitro.



## 4.2 EQUIPAMIENTO INSTRUMENTAL UTILIZADO

En la siguiente tabla (ver tabla 4) se recogen las diversas técnicas utilizadas con su correspondiente equipo utilizado.

TÉCNICA INSTRUMENTAL	EQUIPO	CASA COMERCIAL
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	DCS 8822 <sup>e</sup>	Mettler Toledo
Centrifugación	Centrífuga ST 16R	Thermo-Scientific
Centrifugación	Centrífuga Avanti	Beckman
Espectrometría de masas MALDI TOF	Espectrómetro de masas Bruker Autoflex (Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA)	Bruker
Espectrometría infrarroja (FTIR)	Infrarrojo Tensor27	Bruker
Espectrofotometría	Nanodrop 2000c	Thermo-Scientific
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	RMN 400 (L.T.I. UVA)	Agilent Technologies
Fluorescencia	Microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E epifluorescne	Nikon Corporation
Fluorescencia	Microscopio confocal Leica TCS SP8 LIGHTNING	Leica Microsystems
Grabación de imágenes	Cytosmart Lux2	Cytosmart

Tabla 4 Relación de técnicas y equipos utilizados.

## 4.3 TÉCNICAS UTILIZADAS

### 4.3.1 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes permite la separación proteica de acuerdo a su movilidad electroforética. Al desnaturalizar la proteína, esta pierde su conformación

tridimensional y mediante la aplicación de una corriente eléctrica se hace migrar por el gel de acrilamida.

La migración depende de la longitud de la cadena polipeptídica y su peso, cuanto más pequeña sea la proteína más migrará en el gel. Dependiendo del porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida que se use, el tamaño del poro que se forme será mayor o menor.

A mayor porcentaje de bis-acrilamida, el tamaño del poro es mucho mayor, por lo que las proteínas con mayor peso molecular se separarán mucho más. Si se usa un menor porcentaje de acrilamida, se producirá una mayor separación en las bandas correspondientes a las proteínas de pesos moleculares más bajos. Para proteínas entre el rango de 90-100 kDa se hace un gel al 10% y entre 60-100 al 12% de acrilamida.

Se añade a las muestras tampón de carga que contiene azul de bromofenol y glicerol. Esto permite que las muestras no floten en el pocillo y difundan al resto y podemos controlar cuánto tiempo queda de la electroforesis, ya que el frente de banda del azul de bromofenol es el primero en llegar al final del gel.

Para determinar el peso molecular de cada banda, en uno de los pocillos se añade un marcador, que contiene diversas bandas de peso conocido, permitiendo así relacionar el peso de nuestra proteína con la banda del marcador según lo que ha corrido en el gel [49].

Realizando una tinción negativa con  $\text{CuCl}_2$  podremos ver las bandas de nuestra proteína, ya que se forman complejos entre el  $\text{CuCl}_2$  y el SDS. Observando las bandas no sólo podemos inferir el peso aproximado de la proteína, sino que también podemos observar cuánta proteína hay según el grosor de la banda.

### 4.3.2 ESPECTROFOMETRÍA

La espectrofotometría es una técnica que permite medir cuánta luz absorbe una muestra y, usando la ley de Lambert-Beer, podemos conocer la concentración del analito en la muestra, ya que dicha absorbancia es directamente proporcional a su concentración. La finalidad de esta técnica en este trabajo no es conocer la concentración de un determinado analito.

Midiendo la absorbancia a 600 nm, que es el estándar para medir absorbancia en las diluciones microbiológicas, podremos llevar el control de la fase en que se encuentra nuestro cultivo bacteriano. Si el valor de la absorbancia disminuye significa que las bacterias se están muriendo, si sigue aumentando significa que siguen creciendo [50].





Utilizando esta técnica a modo de control, podemos decidir cuándo acabar la fermentación en el biorreactor.

El espectrofotómetro es un instrumento que proyecta un haz de luz monocromática. Parte de la intensidad del haz de luz es absorbida por la muestra y el espectrofotómetro es capaz de medir esa luz absorbida.

### 4.3.3 GRABACIONES DE IMÁGENES

El CytoSmart Lux2 es un microscopio invertido que permite ir tomando fotos de un cultivo celular en intervalos de tiempo programados. Este aparato lleva incorporado una luz en la parte superior para iluminar la muestra debido a que se encontrará en el interior del incubador a oscuras. Al colocar la muestra sobre el Cytosmart, se asegura que la muestra no se mueva y siempre se grabe la misma zona.

Mediante la toma de fotos durante el tiempo de estudio permite ver cómo interaccionan las células con el soporte y entre ellas, así como ver cómo proliferan a lo largo del experimento. Con estas fotos se monta un video time-lapse, que muestra a cámara rápida cómo ha sido la evolución [51].

### 4.3.4 FLUORESCENCIA

La fluorescencia es la capacidad que tienen algunas sustancias de absorber energía de una longitud de onda determinada y emitir a otra longitud de onda mayor. La medida de la fluorescencia de fluorocromos presentes en anticuerpos, la inmunofluorescencia, permite detectar la presencia de los antígenos en las células y tejidos, su localización y cuantificar según la intensidad del fluorocromo.

Los anticuerpos son cadenas peptídicas que son capaces de formar una unión muy fuerte específicamente con el antígeno que detecta. Por tanto, si se realizan tinciones con anticuerpos marcados con fluorocromos podremos localizar las estructuras que reconocen esos anticuerpos. Mediante microscopios invertidos de epifluorescencia o un microscopio confocal podemos tomar imágenes de las muestras celulares teñidas previamente con moléculas fluorescentes [52].

Estos instrumentos permiten excitar las muestras a la longitud de onda que requiera el fluoróforo, y a través de un conjunto de filtros que posee, elegir las longitudes de onda a las que quiere detectar la emisión. Mediante los softwares que incluyen, se puede elegir las condiciones a las que se quiere realizar la foto, e incluso programar secuencias en el caso que se quiera observar varios anticuerpos fluorescentes.



### 4.3.5 MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de diversa naturaleza obteniendo información cualitativa o cuantitativa sobre su masa molecular, estructura, detectar su presencia y/o cuantificar la concentración. Para ello se requiere que la molécula a analizar se ionice y pase a forma gaseosa.

MALDI permite implantar una macromolécula en una matriz sólida que permite preservar la molécula a analizar y facilita la vaporación y la ionización. Estos iones son acelerados hacia un analizador que separará mediante campos magnéticos los iones en función de su relación masa/carga, midiendo el tiempo que tardan en llegar al detector (TOF), que produce una señal que se procesa, se amplifica y se envía al ordenador obteniendo un espectro de masas.

Esta técnica nos permite determinar el peso molecular del polímero [53]. Se utilizó un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción de láser asistida por matrices (MALDI-ToF) Bruker Autoflex, perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVA.

Las muestras disueltas en agua fría se depositan en la placa de MALDI (1  $\mu\text{L}$ ) después se añade la matriz (1  $\mu\text{L}$ ), compuesta por ácido sinapínico en 70% ACN 0.1% TFA, y se deja secar al aire.

### 4.3.6 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Esta técnica permite el análisis no destructivo de muestras tanto sólidas como líquidas, requiriendo poca cantidad de muestra. Permite identificar los grupos funcionales de la molécula a analizar. Una molécula al absorber radiación infrarroja aumenta la intensidad de la vibración intramolecular que posee la misma frecuencia que la irradiada produciendo señales con frecuencias correspondientes a la vibración de un enlace específico [54].

Se utilizó la técnica FTIR-ATR (Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada). ATR es la técnica de muestreo que se produce cuando una radiación infrarroja llega a un cristal ATR (transmisor de alto índice de refracción) diseñado para permitir una reflexión interna total. Creando así una onda evanescente que mantiene el contacto íntimo con el cristal registrando el espectro infrarrojo del analito a analizar.

La Transformada de Fourier permite convertir el espectro de dominio del tiempo a uno del dominio de la frecuencia, permitiendo obtener espectros más rápidos, precisos y con bajo nivel de ruido [55]. Se utilizó un espectrómetro de Infrarrojo Bruker TENSOR 27, con un dispositivo ATR.



Los espectros FTIR adquiridos en este trabajo se realizaron mediante barridos de 64 escaneos en la región comprendida entre  $600\text{cm}^{-1}$ - $4000\text{cm}^{-1}$ . Una vez registrados, se realiza una corrección a la línea base y la normalización del espectro.

#### 4.3.7 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) proporciona información detallada sobre la estructura y el ambiente químico de las moléculas aprovechando las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos, principalmente se realiza en protones. Se realiza aplicando un campo magnético que produce un desdoblamiento de los niveles generados de energía del espín nuclear, induciendo transiciones entre los diferentes niveles de energía por la absorción de una radiación electromagnética adecuada.

La intensidad, la forma y la posición de las señales en el espectro está relacionado con su estructura. Si se analizan los espectros detalladamente se pueden distinguir los grupos funcionales y a qué se encuentra acoplado, ya que el entorno electrónico y las interacciones entre núcleos hace que los grupos funcionales con sustituyentes diferentes generen diferentes señales.

Para realizar esta técnica es necesario disolver nuestra muestra. Los disolventes presentan muchos protones sensibles al RMN por lo que hay que utilizar disolventes deuterados en los que más del 99% de los protones se han sustituido por deuterio para evitar que interfieran en el análisis. Esta técnica nos permite caracterizar la estructura del polímero sintetizado y también de los polímeros modificados [56, 57].

Se preparó una disolución de 25mg/mL del polímero y se llevó a un tubo de RMN. Se usó el espectrómetro automático Agilent Technologies NMR 400, perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Uva. El equipo está formado por el componente Agilen Technologies NMR 400, la sonda Agilent Technologies One NMR y el imán superconductor Agilent Technologies 400 MHz NMR.



## 4.4 METODOLOGÍA

### 4.4.1 PRODUCCIÓN DE LOS POLÍMEROS

En este Trabajo fin de Master se han bioproducido 4 polímeros diferentes, nombrados como GTAR-ELR, DRIR-ELR, RGD-ELR y VKV-ELR, que ya habían sido descritos anteriormente [48, 58] y cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 5.

Realizando un screening se elige la colonia con la que se va a efectuar la producción. Usando medio LB se fomentará el crecimiento de la población de bacterias que serán el inóculo que usaremos para realizar la producción. En un biorreactor de 15 L con medio TB estéril, que favorece la expresión de nuestro polímero, añadimos el inóculo y se deja 20 horas fermentando a 37°C, pH 7. Una vez pasadas las 20 h, se toman muestras cada 30 minutos y se mide la absorbancia a 600 nm. En el momento que se observe que el valor de absorbancia se incrementa muy poco o está empezando a disminuir, se finaliza la fermentación.

Se realizó la lisis celular mediante un disruptor (Panda Plus, GEA). Para la purificación del polímero se usaron ciclos sucesivos de centrifugación variando la temperatura para que se produzca la agregación reversible, así como variando el pH. Los polímeros resultantes fueron dializados en tripas especiales para diálisis usando agua MilliQ (MQ), seguido de su filtrado y su posterior liofilización.

	Abbreviated amino acid sequence	Mw (Da)
RGD-ELR	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP{[(VPGIG) <sub>2</sub> (VPGKG)(VPGIG) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> AVTGRGDSPASS[(VPGIG) <sub>2</sub> (VPGKG)(VPGIG) <sub>2</sub> ] <sub>5</sub> V}	60650
VKV-ELR	MESLLPVGVPGVG[VPGKG(VPGVG) <sub>5</sub> ] <sub>23</sub> VPGKG(VPGVG) <sub>3</sub> VPGV	60451
DRIR-ELR	MESLLPV{[(VPGIG) <sub>2</sub> VPGKG(VPGIG) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> YAVTGDRIRSASPASSA [(VPGIG) <sub>2</sub> VPGKG(VPGIG) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> V} <sub>4</sub>	42069
GTAR-ELR	MESLLPV{[(VPGIG) <sub>2</sub> VPGKG(VPGIG) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> YAVTGGTARSASPASSA [(VPGIG) <sub>2</sub> VPGKG(VPGIG) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> V} <sub>4</sub>	41448

Tabla 5 Secuencia de aminoácidos abreviada con el peso molecular de los polímeros usados. La secuencia de adhesión celular está en rojo, los dominios sensibles a proteasas de degradación rápida y lenta se encuentran en verde y azul, respectivamente. Tomado de [59].

#### 4.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS PRODUCIDOS

El producto resultante fue caracterizado por electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE (figura 8), espectroscopía infrarroja FTIR-ATR (figura 9),  $^1\text{H-NMR}$  (figura 10) y DSC (figura 11). Mediante MALDI-ToF obtenemos el peso molecular del polímero. RGD-ELR tiene un peso molecular de 60.661 Da.

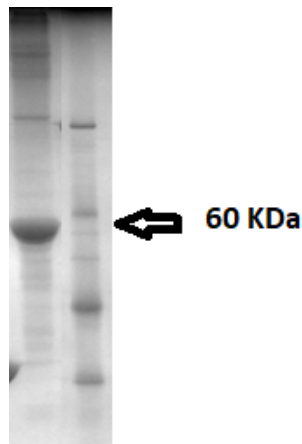


Figura 8 Electroforesis SDS-Page de RGD-ELR, peso molecular es 60650 Da.

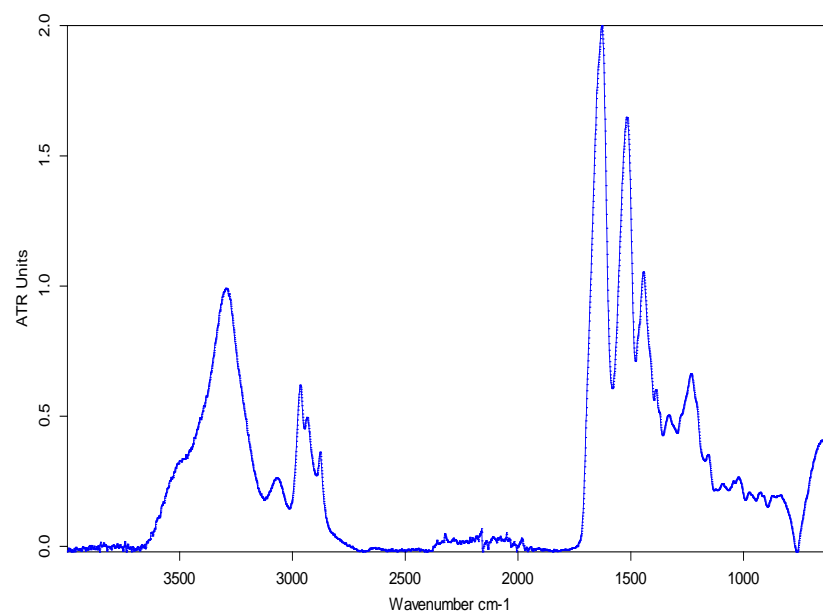


Figura 9 Espectro FTIR de RGD-ELR.

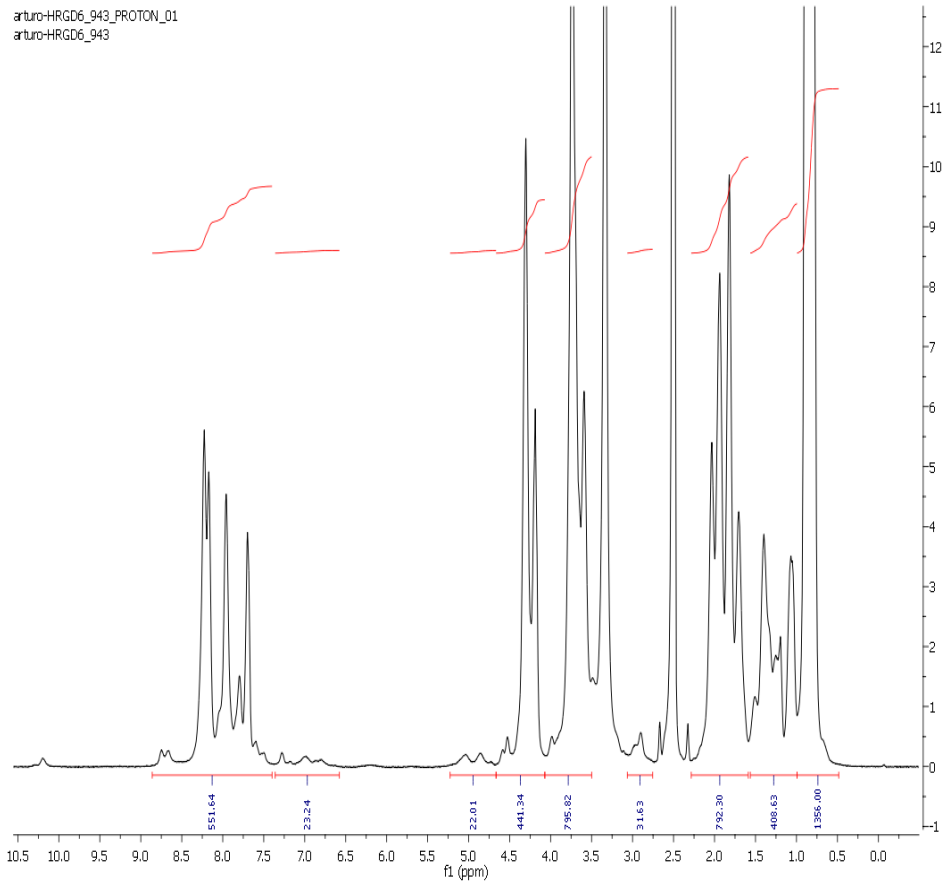


Figura 10 Espectro de 1H-NMR de RGD-ELR.

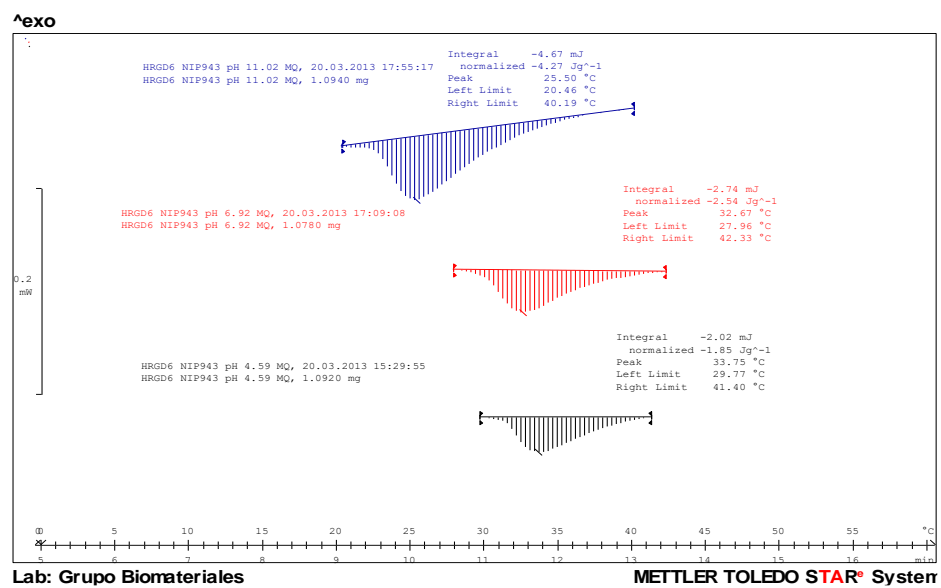


Figura 11 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de RGD-ELR.

### 4.4.3 MODIFICACIÓN QUÍMICA

Se realizaron modificaciones químicas en estos polímeros para introducir el grupo azido y el ciclooctino que permitirán hacer los hidrogeles *click* sin catalizador. Se modificará con ciclooctino los biopolímeros: VKV, DRIR y GTAR. Se modificará con azida los polímeros VKV y RGD.

#### 4.4.3.1 MODIFICACIÓN DE ELR CON AZIDA

Una disolución de 2-azidoethyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) carbonate (0.6330 mmol, 16 eq) en dimetilformamida anhidro (DMF) se añadió a otra disolución del polímero en DMF anhidro (0,03956 mmol en 30 mL). La mezcla resultante se agitó durante 60 h a temperatura ambiente. Se añadió dietil éter (30 mL) a la mezcla de reacción para producir la precipitación del biopolímero y se centrifugó a 12500G, 10 min, 4°C. El sobrenadante se eliminó y el sólido se lavó con acetona (3 x 15 mL), eliminándola por centrifugación (12500G, 10 min, 4°C). El pellet se seca bajo presión reducida, se redisuelve en agua MQ fría (4°C) y se dializa con agua destilada (2 x 25 L) y MQ (1 x 25L). Se midió y ajustó el pH a 7. Se filtró y liofilizó para obtener el recombinámero blanco modificado con azida. EL esquema de la reacción se muestra en la figura 12.

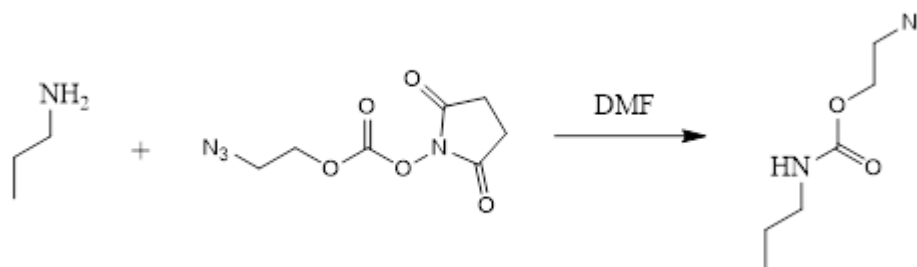


Figura 12 Esquema general de la reacción para modificar un ELR con azida.

#### 4.4.3.2 MODIFICACIÓN DE ELR CON CICLOOCTINO

Una disolución de (1R,8S,9S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl succinimidyl carbonate (0.2150 mmol, 13 eq) en dimetilformamida (DMF) se añade a otra disolución del polímero a modificar en DMF (0.01654mmol en 30 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. Se añadió dietil éter para producir la precipitación del biopolímero y se centrifugó a 12500G, 10 min, 4°C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado blanco se lavó con acetona (3 x 15 mL), eliminándola por centrifugación (12500G, 10 min, 4°C). El precipitado blanco se secó bajo presión reducida,

redisolviéndolo en agua MQ fría (4°C) y, posteriormente, dializándolo con agua destilada (2 x 25 L) y MQ (1 x 25L). Se midió y ajustó el pH a 7. Se filtró y liofilizó para obtener un recombinámero blanco modificado con ciclooctino. El esquema de la reacción se muestra en la figura 13.

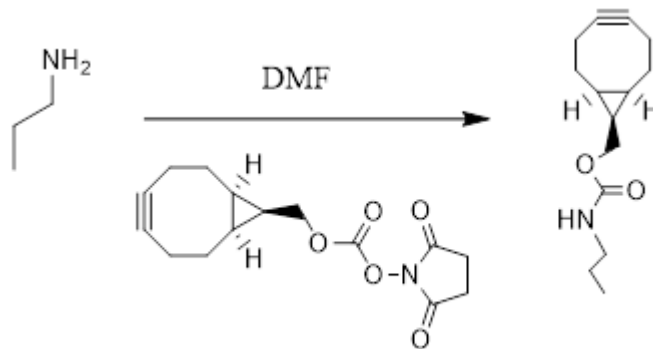


Figura 13 Esquema general de la reacción para modificar un ELR con ciclooctino.

#### 4.4.3.3 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE RGD-AZIDA CON LOS PÉPTIDOS QK E IK

Al polímero RGD con azida se le realizaron 2 modificaciones diferentes para añadir dos péptidos diferentes QK e IK (BACHEM), cuya secuencia se muestra en la Tabla 6, para obtener así RGD-QK-Azida y RGD-  
IK-Azida.

PÉPTIDO	SECUENCIA
IK	H-Cys[(3-succinimido-propionyl)-B-Ala-DBCO]-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-OH trifluoroacetate salt
QK	H-Cys[(3-succinimido-propionyl)-B-Ala-DBCO]-Lys-Leu-Thr-Trp-Gln-Glu-Leu-Tyr-Gln-Leu-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ile-OH trifluoroacetate salt

Tabla 6 Secuencia de los péptidos IK y QK comprados a BACHEM para la modificación química.

Los péptidos IK y QK poseen un dibenzociclooctino (DBCO) en el amino terminal que se unirá por reacción *click* al grupo azido del RGD-ELR modificado dando lugar a dos polímeros diferentemente modificados: RGD-  
IK-Azida y RGD-QK-Azida (ver figura 14). La estequiometría que usamos es



0.5:1 (péptido:ELR). Para elegir esta ratio nos basamos en el artículo escrito por Flora et al. [60]

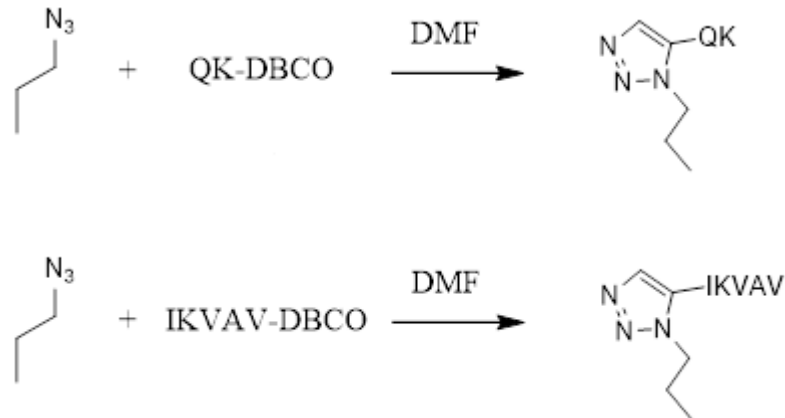


Figura 14 Esquema de la reacción para añadir los péptidos QK (arriba) e IK (abajo) al RGD-N3 obtenido anteriormente.

#### 4.4.3.4 OBTENCIÓN RGD-QK-AZIDA

Una disolución de H- Cys [(3- succinimido- propionyl)-  $\beta$ - Ala- DBCO]-Lys-Leu-Thr-Trp-Gln-Glu-Leu-Tyr-Gln-Leu-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ile-OH trifluoroacetate salt (0.01336 mmol, 1,2 eq) en DMF (0.5 mL) se añade a otra disolución de RGD-N3 en 15 DMF (0.01114 mmol, 15 mL). La mezcla se agitó durante 8 horas. Después se añadió dietiléter a la mezcla para producir un precipitado blanco. Se centrifugó (12500G, 10 min), retiró el sobrenadante y el sólido se lavó con acetona (3 x 35 mL) centrifugando (12500G, 10 min). Se secó en atmósfera reducida, redisolviendo en agua MQ fría (4°C), dializado con agua destilada (2 x 25 L) y MQ (1 x 25L). Se midió el pH y se ajustó a 7, se filtró y liofilizó para obtener en recombinámero blanco ELR-RGD-N3-QK

#### 4.4.3.5 OBTENCIÓN RGD-IK-AZIDA

Una disolución de H-Cys[(3-succinimido-propionyl)- $\beta$ -Ala-DBCO]-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-OH trifluoroacetate salt (0.02451 mmol, 2,2 eq) en DMF (0.5 mL) se añadió a otra disolución de RGD-N3 en DMF (0.01114 mmol, 20 mL). La mezcla resultante se agitó durante 8 horas. Se añadió dietil éter a la mezcla para obtener un precipitado blanco. Se centrifugó (12500G, 10 min), se retiró el sobrenadante y el sólido se lavó con acetona (3 x 35 mL) centrifugando (12500G, 10 min). Se secó con presión reducida, redisolviendo en agua MQ fría (4°C), dializando en agua destilada (2 x 25 L) y MQ (1 x 25L).

Se midió y ajustó el pH a 7. Se filtró y liofilizó para obtener el recombinámero blanco RGD-N3-IK

#### 4.4.3.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS MODIFICADOS

La caracterización de los polímeros modificados se realiza mediante espectroscopía infrarroja FTIR-ATR (figura 15), <sup>1</sup>H-NMR (figura 16), DSC (figura 17) y MALDI-TOF (figura 18).

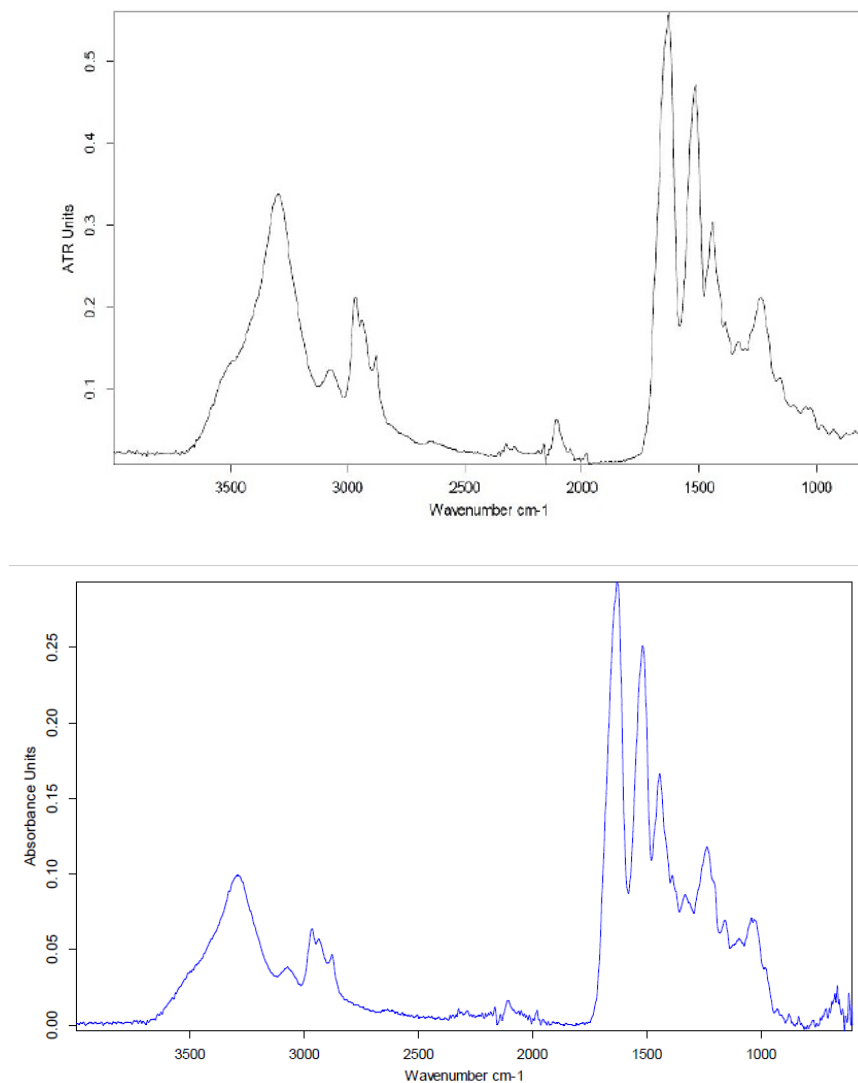


Figura 15 Espectro FTIR-ATR de RGD-N3-QK (arriba) y RGD-N3-IK (abajo).



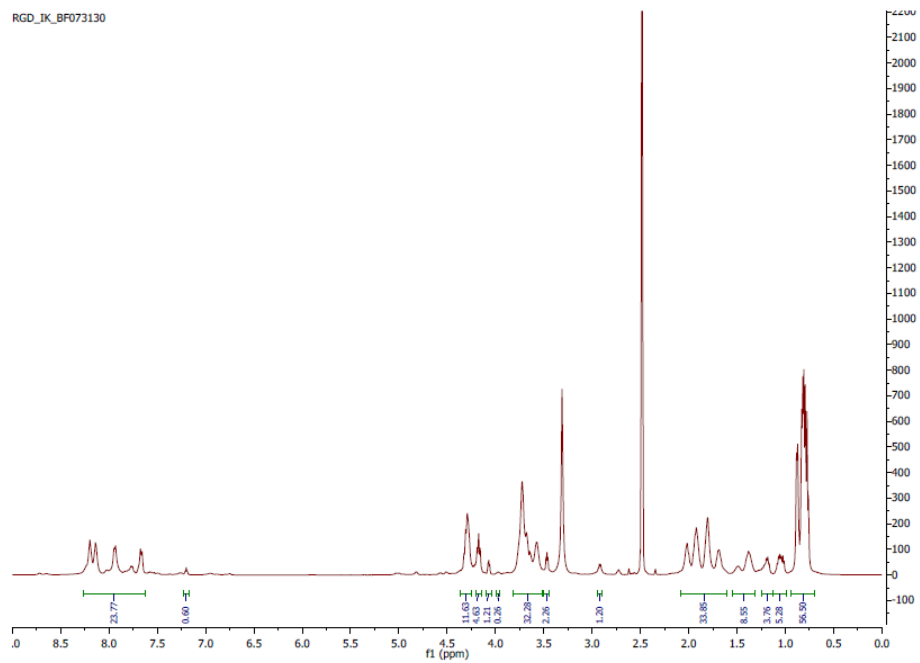
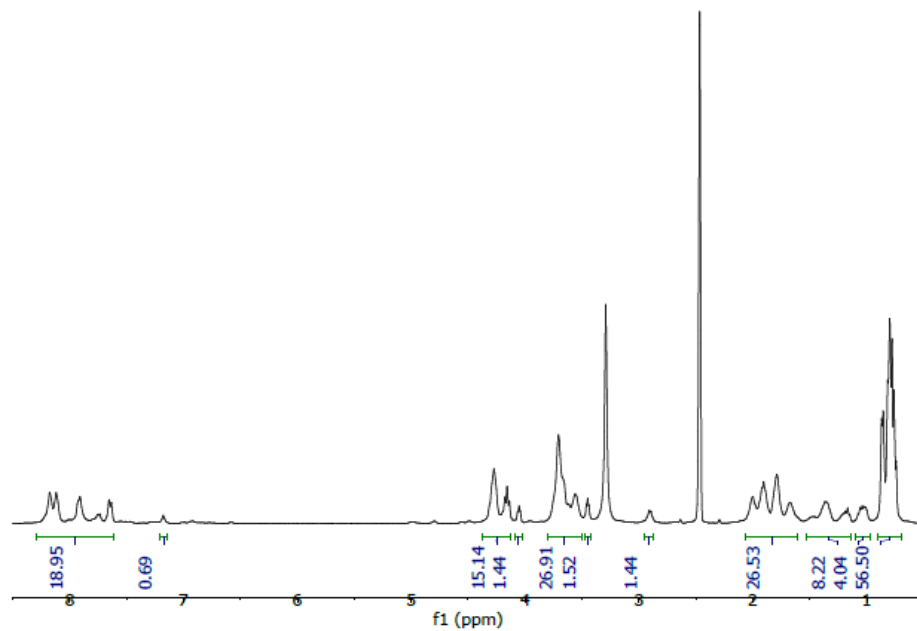


Figura 16 Espectro de 1H-NMR de RGD-N3-QK (arriba) y RGD-N3-IK (abajo).



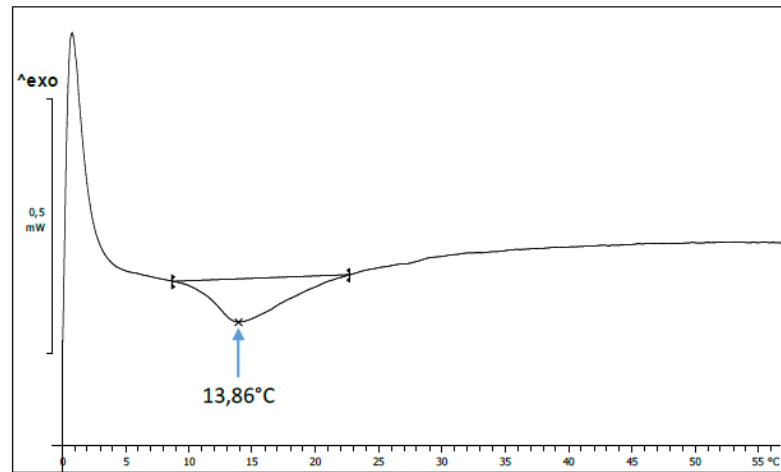


Figura 17 DSC del polímero RGD-N3-QK

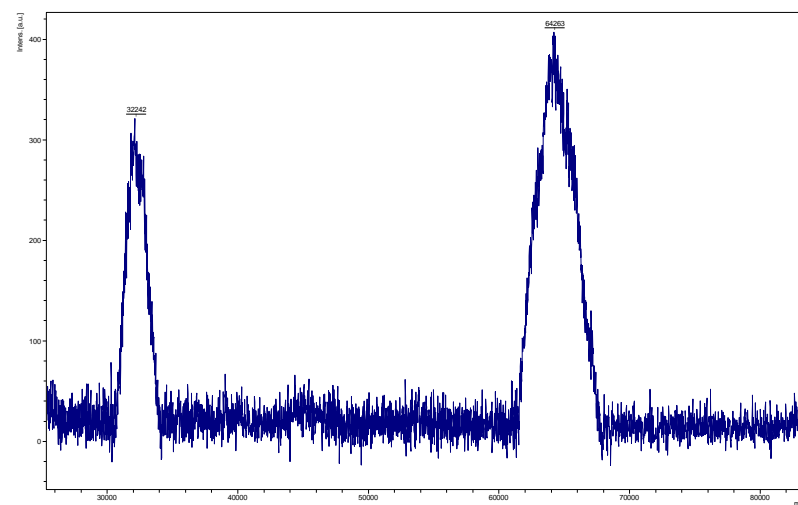
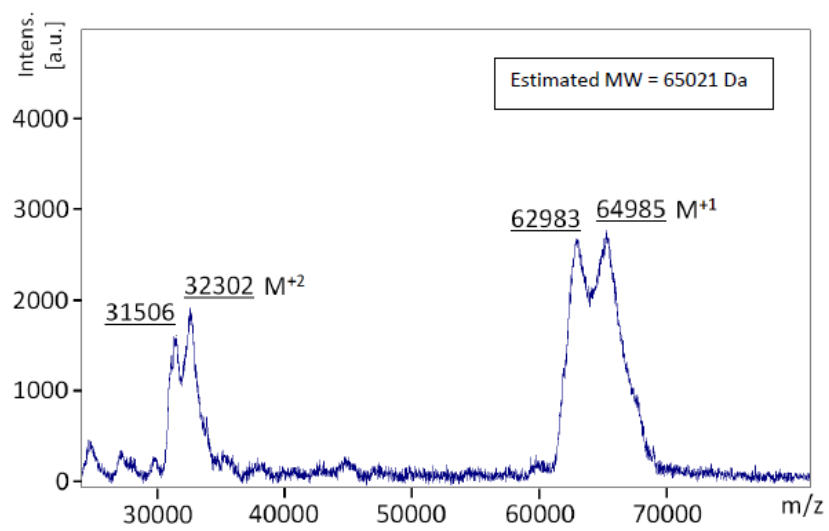


Figura 18 MALDI-TOF del polímero RGD-N3-QK (arriba) y RGD-N3-1K (abajo).

#### 4.4.4 FORMACIÓN DE LOS HIDROGELES

La formación de los hidrogeles se realiza disolviendo por separado cada polímero en PBS estéril (x1, pH 7.2), a una concentración de 50 mg/mL cada uno, e incubándolos a 4°C toda la noche. Posteriormente, se mezclan los polímeros a una ratio de 1:1 en volumen; la mezcla se incubó durante 2 minutos a 4°C y se añadió 20 µL a los pocillos de un portaobjetos (Millicel EZ slice 8-well, Thermo Scientific), dando lugar a los siguientes geles VV, UR, GR, GQ, GI (ver tabla 7). Los geles se dejaron incubando toda la noche a 4°C.

HIDROGEL	POLÍMERO 1	POLÍMERO 2
VV	VKV - ciclo	VKV - N3
UR	DRIR - ciclo	RGD - N3
GR	GTAR - ciclo	RGD - N3
GQ	GTAR - ciclo	RGD - QK - N3
GI	GTAR - ciclo	RGD - IK - N3

Tabla 7 Lista de los polímeros que se mezclan para crear los diferentes hidrogeles.

#### 4.4.5 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Las células utilizadas son células gliales de rata (C6; ATCC® CCL-107™), cultivadas en medio F-12K (ATCC, Catalog No. 30-2004) suplementado con 2.5% de suero fetal bovino (FBS, Lonza) y 15 % de suero de caballo (ref 16050-130, Gibco).

Las células se incubaron a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera húmeda. Se cambió el medio 3 veces a la semana y se hicieron pases de células de 2 a 3 para los experimentos siguientes, siguiendo las recomendaciones de la ATCC. En todos los experimentos realizados se usaron 5x10<sup>4</sup> células por muestra.

#### 4.4.6 ENSAYO DE ADHESIÓN TEMPRANA

Añadimos a los hidrogeles un pequeño volumen de medio y los metimos en el incubador a 37°C para que se atemperara. Primero realizamos una prueba con un gel GI para decidir el tiempo de experimentación,

realizando un time-lapse con el CytoSMART Lux2 que permite decidir que el tiempo de experimentación sería 24, 48 y 72 horas en función de la morfología. Por tanto, añadimos en cada pocillo  $5 \times 10^4$  células y dejamos incubar 24, 48 y 72 horas.

#### 4.4.7 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez pasado el tiempo de incubación (24, 48 o 72 horas según el grupo al que perteneciese la muestra), se fijó con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente (r.t.) durante toda la noche. Para realizar las tinciones, realizamos lavados con PBS 1X y permeabilizamos con 0,1% Triton™ X-100 (Sigma Aldrich).

Incubamos 1 hora con BSA y volvemos a lavar con PBS y tritón. Añadimos el anticuerpo primario Anti-beta III tubulin (ab18207, Abcam) e incubamos toda la noche a 4°C. Lavamos con PBS y tritón, incubamos con el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit IgG H&L AlexaFluor®488(ab150077, Abcam) 2 horas a temperatura ambiente. Volvemos a lavar con PBS y tritón e incubamos 30 minutos con Rhodamine-Phalloidin (R415, Invitrogen) y lavamos con PBS solo. Usamos un medio de montaje que contiene DAPI (ab104139, Abcam).

#### 4.4.8 ESTUDIO DE LA LONGITUD AXONAL

El experimento se realizó por triplicado, tomando fotos de la fluorescencia de áreas aleatorias con un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E epifluorescence acoplado a una cámara DS-2MBWc. Se utiliza el software NIS-Elements AR (Nikon Corporation). Asimismo, se tomaron fotos con el microscopio confocal Leica TCS SP8 LIGHTNING (Leica Microsystems). En la inmunofluorescencia podremos observar en azul los núcleos (DAPI), en verde los microtúbulos (Alexa Fluor® 488) y en rojo los filamentos de actina (TRITC). La longitud de la neurita se midió usando ImageJ.

#### 4.4.9 ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, utilizando como prueba post-hoc la comparación de Tukey. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado ( $n \geq 3$ ). Los resultados se muestran como media  $\pm$  desviación estándar, aceptando las diferencias significativas si el p-value  $< 0.05$  (\*). Para el análisis estadístico se usó Minitab v19.1 y para la representación gráfica Origin Pro.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 PRODUCCION Y PURIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO

#### 5.1.1 SCREENING

La producción de los polímeros GTAR-ELR, DRIR-ELR, RGD-ELR y VKV-ELR, que ya habían sido descritos anteriormente [48, 58] y cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 5, fue realizada mediante fermentación en un biorreactor de 15 L. Se realizó la producción de todos los polímeros usados, pero sólo se explicará la producción de RGD-ELR.

Aunque se realizaron todas las bioproducciones, se va a explicar detenidamente la correspondiente a la obtención de RGD-ELR, biopolímero que modificaremos químicamente en etapas posteriores hasta la obtención de sus correspondientes hidrogeles.

En primer lugar, realizamos un *screening* en el que seleccionaremos varias colonias aisladas y las pondremos a incubar en las mismas condiciones. Mediante una electroforesis en gel de acrilamida podremos ver las diferentes bandas que corresponden a diversas proteínas. Cuanto más abajo se encuentren en el gel, más pequeñas son.

Utilizando en uno de los carriles un marcador, que contiene diferentes bandas cuyo peso molecular se conoce, podremos relacionar el tamaño de las proteínas que contienen nuestras muestras. Lo importante aquí es que elegimos aquella colonia que produzca una banda de nuestro polímero mucho más grande (indica mayor cantidad) teniendo en cuenta que no sobreexpresen ninguna otra proteína que pueda dificultarnos la posterior purificación. El gel obtenido en el screening se observa en la Figura 19.

La colonia que elegimos fue la 8, ya que presenta una banda más intensa y gruesa de nuestro polímero en relación al resto de colonias. Además, no expresa otras proteínas como ocurre con las colonias 1 y 3, lo que puede complicar la purificación.



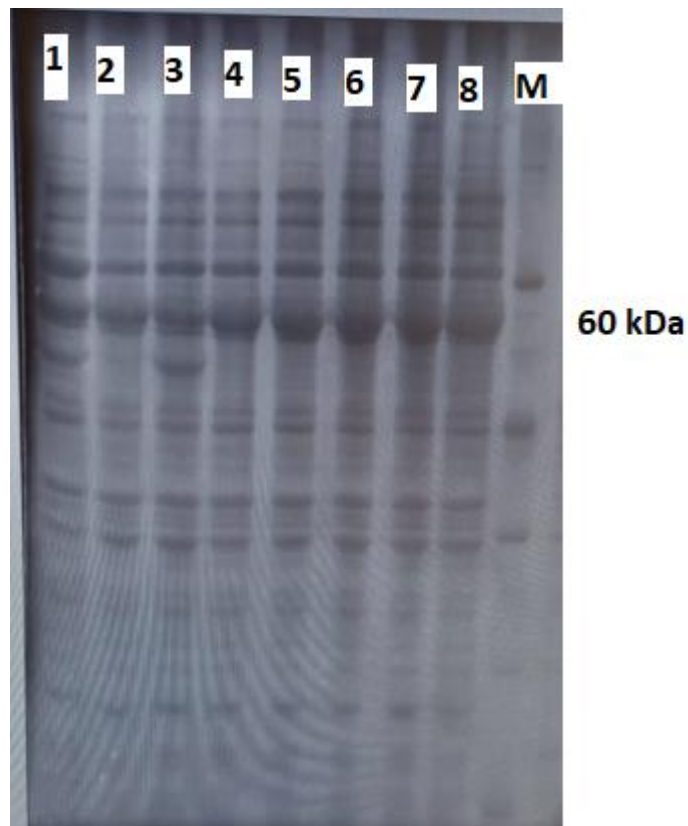


Figura 19 Screening de RGD-ELR. Las calles numeradas corresponden a colonias aisladas diferentes. M es el marcador de peso molecular.

### 5.1.2 PRODUCCIÓN EN BIORREACTOR

Una vez elegida la colonia (número 8), se usará como inóculo para realizar la fermentación en el biorreactor, bajo condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano (pH 7, 37°C). A las 20 horas de incubación tomamos muestras cada 30 minutos para determinar su absorbancia. Para ello se alicuotó el mismo volumen de muestra (tomado del fermentador) en eppendorfs, que se centrifugaron. En uno de los eppendorf nos quedamos con el sobrenadante (blanco), y con el otro resuspendemos el precipitado en agua, para así poder medir la absorbancia de manera más precisa, ya que el propio medio también puede absorber y hay que restar su absorbancia. Una vez que decidimos sacar la producción del reactor, repartimos el volumen en botes de centrifuga.

Mediante centrifugaciones, las bacterias precipitarán y el medio será el sobrenadante, que eliminaremos. Para eliminar posibles impurezas que pudiera haber, se usará un tampón de lavado en el que diluiremos el pellet obtenido. Se volverá a centrifugar y retirar el sobrenadante otras dos veces.



### 5.1.3 LISIS CELULAR

La producción del polímero de interés es intracelular, por lo que hay que romper las membranas para así liberar todas las proteínas intracelulares. Para ello en el último lavado se utiliza un tampón de sonicación, al que añadimos inhibidores de proteasas para evitar la degradación de nuestro polímero. Mediante un disruptor podremos romper las membranas por presión diferencial.

### 5.1.4 PURIFICACIÓN

El protocolo de purificación polimérica depende de las características del polímero a purificar. Todas las purificaciones comparten una serie de pasos, que son los ciclos de centrifugaciones por encima y por debajo de la temperatura de transición (ITC). Por encima de esa temperatura  $T_t$ , el polímero precipitará, y por debajo el polímero será soluble.

El uso de diferentes sales permite disminuir la temperatura de transición de los polímeros, de manera que se favorece su precipitación a temperaturas más bajas. En aquellos polímeros que poseen aminoácidos portadores de grupos ácidos o básicos, la modificación del pH de manera adecuada permite que el polímero precipite a temperaturas más bajas para la forma más apolar que hace que la polaridad media del polímero disminuya. A través del protocolo creado para cada polímero se podrán ir eliminando las proteínas que no son la de interés. Para ir controlando este proceso se realizará una electroforesis SDS-PAGE (ver figura 20).

El polímero RGD pesa unos 60kDa, y corresponde a la banda más ancha que se ve. Las calles 1 y 2 corresponden al precipitado y sobrenadante respectivamente obtenidos tras la lisis celular que se centrifugó en frío. Con ese sobrenadante se realizó una centrifugación a 40 °C, con lo que se obtuvo un sobrenadante (calle 3) y un precipitado (calle 4) donde se encuentra nuestro polímero.

Con el precipitado se centrifugó en frío y obtuvimos su precipitado (calle 5) y su sobrenadante (calle 6). En esta última calle se observa que hay alguna banda adicional a la de interés, por lo que se repitió el ciclo de centrifugación en caliente y en frío varias veces para eliminar las proteínas adicionales. Las calles 7 y 8 son el precipitado y sobrenadante del segundo ciclo de centrifugaciones. Lo que pudimos observar en la purificación del polímero RGD era que en todos los pasos siempre se perdía polímero en la fracción que no debería haber, por ello tuvimos que repetir los pasos para recuperar lo máximo que pudiéramos.



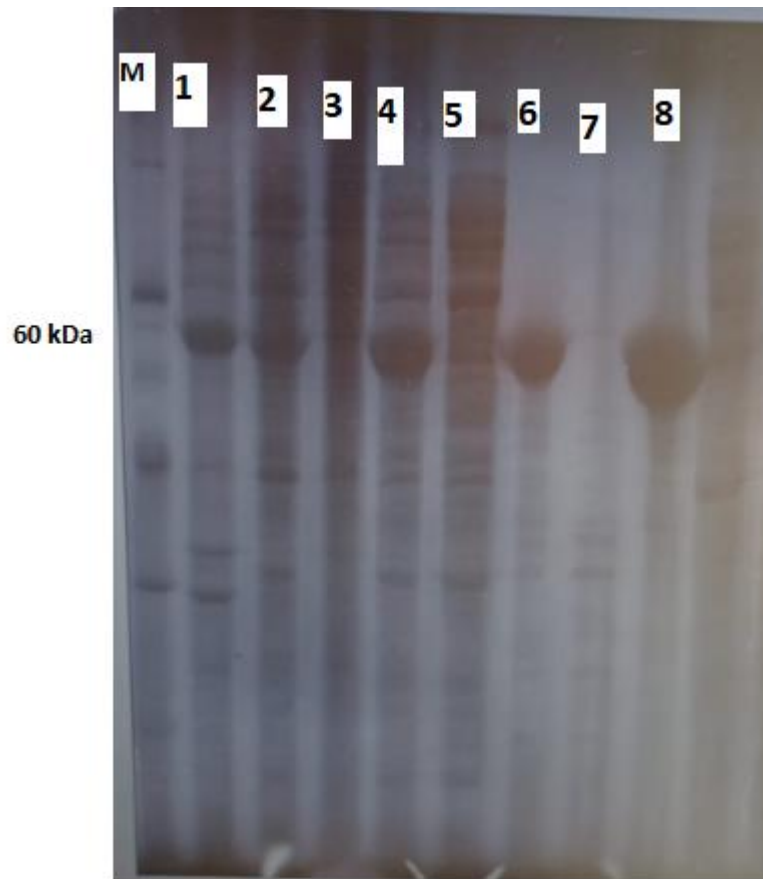


Figura 20 Electroforesis de las muestras tomadas en cada paso de la purificación, en el que se observa la desaparición de bandas correspondientes a proteínas que no son de interés.

Para eliminar todas las sales añadidas, hay que realizar varias diálisis consecutivas. El uso de membranas de diálisis permite que los solutos de pequeño tamaño (sales, iones) pasen de la disolución de mayor a menor concentración, purificando el polímero.

Estos polímeros van a ser usados en experimentos in vitro/in vivo por lo que hay que esterilizarlos. Para ello, se realizará el filtrado de la disolución acuosa del polímero con un filtro especial para esterilizar, con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  que retiene los microorganismos.

Liofilizando conseguiremos eliminar el agua y obtendremos un algodoncillo blanco que es nuestro polímero. Se obtuvo un total de 5.2 gramos del polímero RGD. La producción se realizó en 15 L de medio, por lo que el rendimiento alcanzado fue de 346 mg/L.

### 5.1.5 USO DEL POLÍMERO

El polímero ya está puro y estéril. Para utilizarlo es necesario trabajar en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación de microorganismos. Cualquier contaminación que exista puede afectar negativamente a cualquier experimento in vitro/in vivo.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN

Los polímeros producidos y modificados hay que caracterizarlos, para comprobar que efectivamente se ha conseguido el polímero deseado. Todos los polímeros utilizados han sido descritos anteriormente [43, 59], excepto el RGD-N3-IK, que mostraremos su caracterización.

En el espectro de infrarrojos (ver figura 21) no se observa nada diferente entre el polímero modificado RGD-N3 y RGD-N3-IK; esto se debe a que el péptido IK no introduce ningún grupo funcional diferente en el polímero, ya que son aminoácidos ya presentes en el propio polímero. Solo se vería una nueva señal en 2100  $\text{cm}^{-1}$  si se introduce un grupo azido.

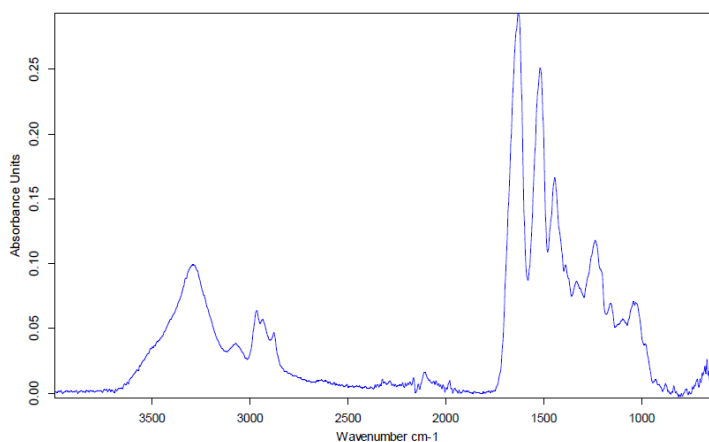


Figura 21 Espectro FTIR del polímero RGD-N3-IK.

En el espectro de NMR (ver Figura 22), mediante la integración de las señales podemos conocer el grado de modificación de las lisinas, ya que las modificaciones con azida y ciclo introducen 3 señales nuevas localizadas a 3, 4 y 7 ppm. La señal a 3 ppm corresponde a los hidrógenos del grupo metileno adyacente al grupo amino de la cadena lateral de la lisina modifica. La señal a 4 ppm corresponde a los H del ciclooctino. La última señal a 7 ppm corresponde al H del carbamato formado. Integrando esa señal podemos saber el número de lisinas modificadas. Esto solo sirve para caracterizar los polímeros modificados con azida y ciclo, ya que a la modificación con IK le ocurre lo mismo que con el FTIR, no se introduce nada que produzca otra señal característica.

Usando la integral de la señal que aparece a 7.2 ppm podemos saber el número de lisinas modificadas. El valor de la integral hay que multiplicarlo por 24, esta relación se obtiene calculando el número de protones de CH<sub>3</sub> que posee nuestra molécula (1356), con el valor obtenido en la integral correspondiente a los CH<sub>3</sub> (56.5). Obteniéndose 15.2 lisinas modificadas. También se puede calcular mediante MALDI-TOF

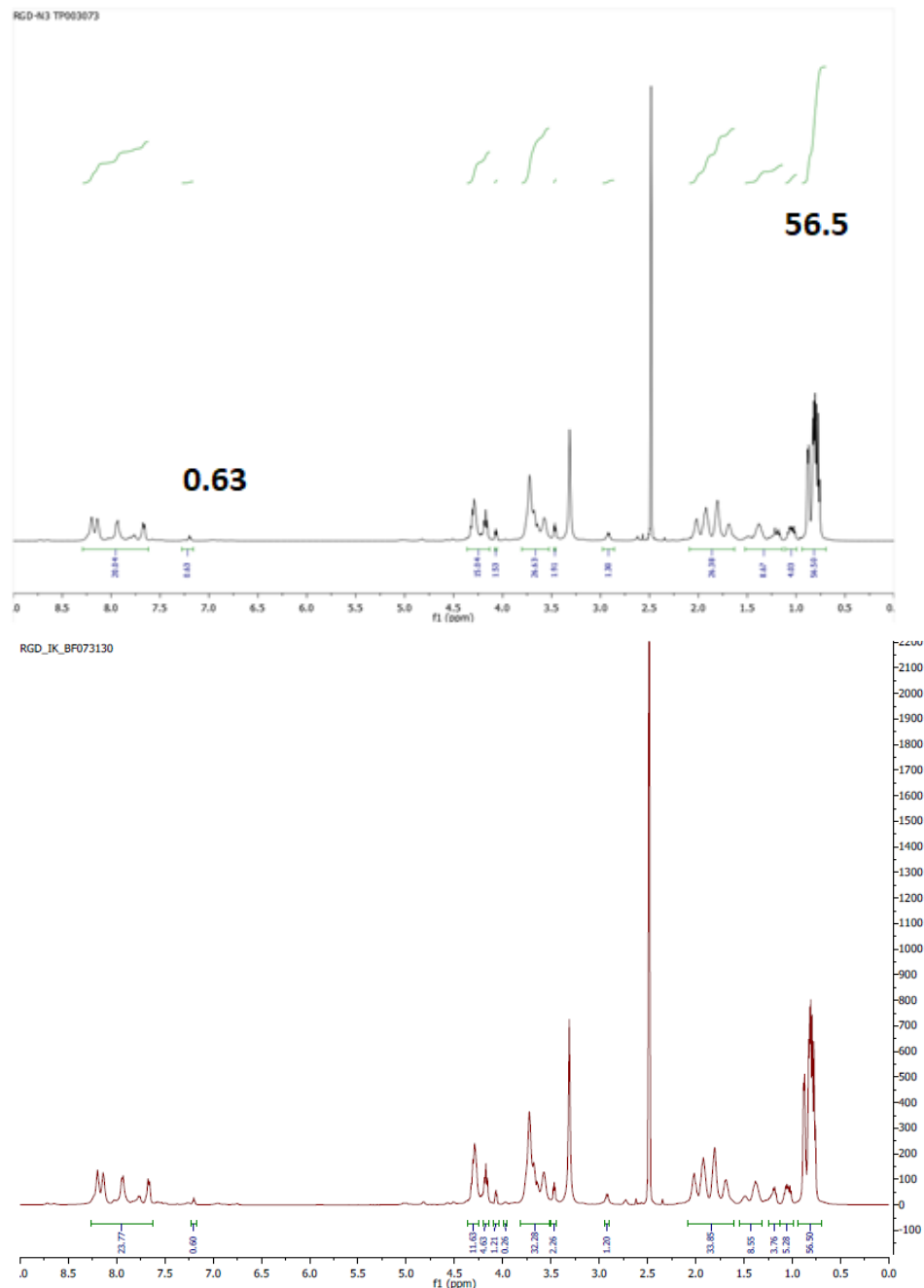


Figura 22 Espectro de H-NMR de RGD-N3 (arriba) y RGD-N3-IK (abajo).

Mediante MALDI-TOF (ver Figura 23) podemos saber el peso molecular del polímero. Según el número de lisinas modificadas, su peso aumentará en 113 g/mol por azida y 176 g/mol por ciclo. Con esta técnica podemos comprobar que el polímero ha sido modificado con el IK, ya que su peso aumentará en 1416.6 g/mol. Para calcular el número de lisinas modificadas se resta el peso molecular del polímero modificado menos el del polímero sin modificar. A este resultado se le divide por el peso molecular del grupo que queremos introducir. El valor final obtenido es el número de grupos introducidos, es decir, el número de lisinas modificadas. En la modificación con Ik se introdujo solamente 1 péptido IK.

$$n^{\circ} \text{ grupos modificados} = (Pm \text{ modificado} - Pm \text{ polímero}) / (Pm \text{ grupo})$$

$$n^{\circ} \text{ péptido IK} = (64255 - 62301) / 1416.6 = 1$$

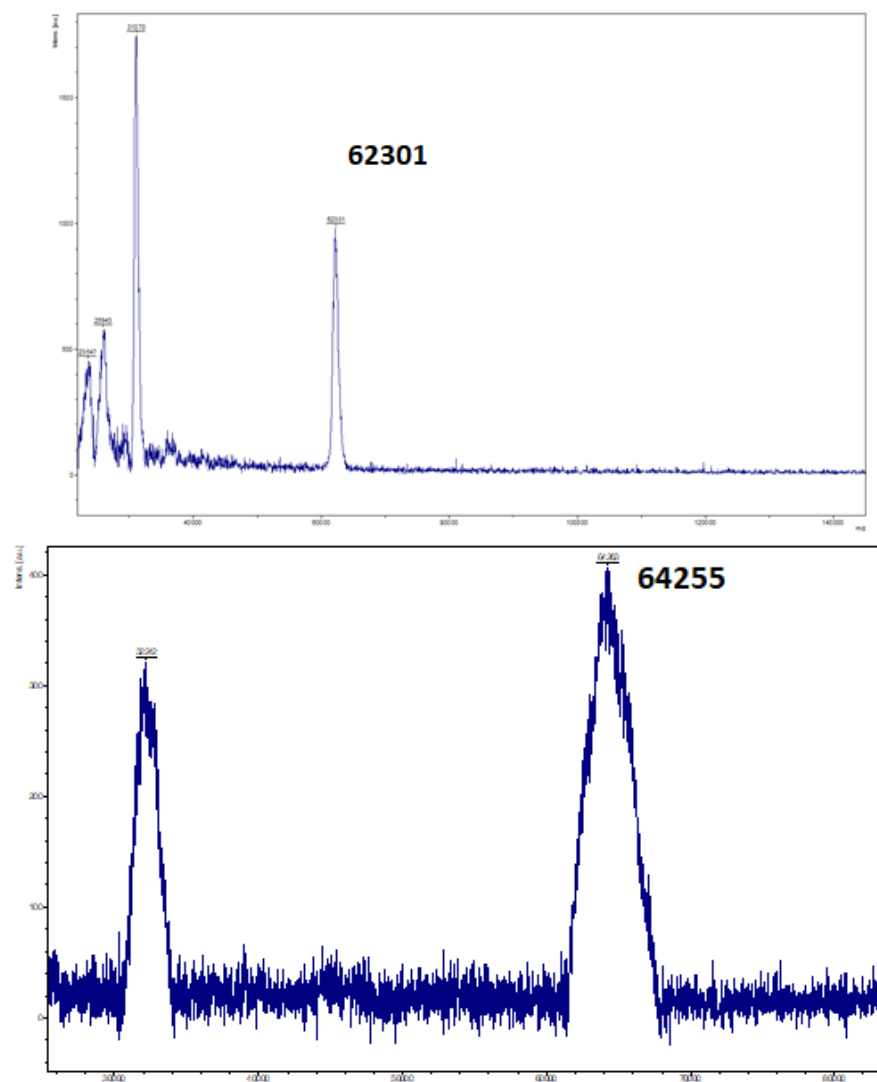


Figura 23 Espectro MALDI-TOF de RGD-N3 (arriba) y RGD-N3-IK (abajo).

### 5.3 FORMACIÓN DE HIDROGELES

Se realizaron 5 hidrogeles diferentes mezclando un polímero modificado con ciclooctino con otro polímero modificado con azida. Por entrecruzamiento vía química *click*, mediante una cicloadición de Huisgen de los grupos azido y ciclooctinilo introducidos en los polímeros mediante modificación química, se forma un anillo de 1,2,3-triazol que enlaza ambos polímeros (ver figura 24). Esta reacción es interesante ya que permite la formación de hidrogeles sin el uso de catalizadores como el  $\text{Cu}^+$ , que pudieran resultar tóxicos e impedir la viabilidad celular. Por tanto, tras la preparación del hidrogel no hay que realizar ningún proceso extra para eliminar el catalizador.

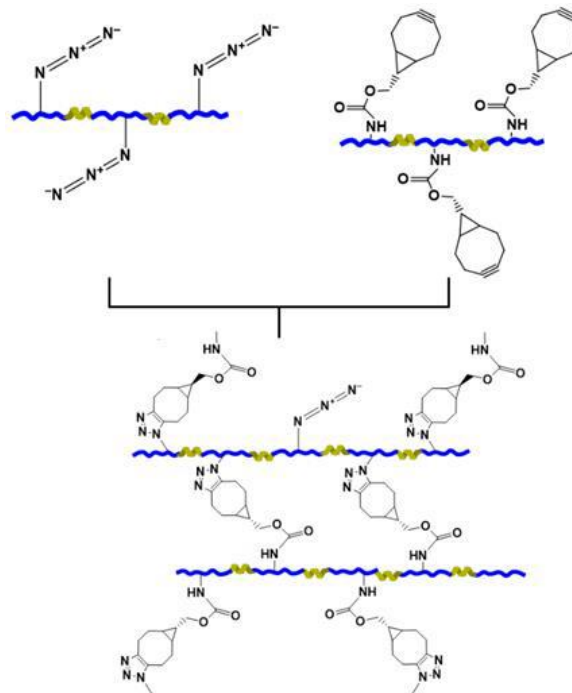


Figura 24 Representación de la formación del hidrogel por entrecruzamiento de los polímeros modificados con ciclooctino y con azida, mediante química click.

#### 5.3.1 PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES

Cada polímero lo disolvemos por separado en PBS para obtener una concentración de 50 mg/mL, siempre en condiciones de esterilidad. Los polímeros disueltos se mezclan en una relación 1:1 de volúmenes y se depositan 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla a los pocillos del portaobjetos.

Los hidrogeles que se forman son algo translúcidos. Como realizaremos tinciones sobre ellos, nos interesa que no se formen geles con

mucho espesor. Al usar menor cantidad, los geles obtenidos son más transparentes. Por ello se añade poco volumen, que incluso se podría reducir un poco más.

Los portaobjetos con el hidrogel se incubaron toda la noche a 4°C y antes de usarlos se introdujeron en el incubador a 37°C con el medio que se va a usar en el cultivo celular, para que al introducir las células no haya un cambio brusco de medio que dificulte su adaptación.

### 5.3.2 DOMINIO DE LOS HIDROGELES

Cada polímero está diseñado con unas secuencias específicas o dominios que le otorgan ciertas propiedades/funcionalidades. Por tanto, el hidrogel compartirá las mismas funcionalidades que los polímeros que lo forman.

Mientras que el biopolímero VKV no presenta ninguna secuencia bioactiva específica, el biopolímero DRIR tiene secuencias de degradación lenta, el biopolímero GTAR presenta secuencia de degradación rápida y el polímero RGD tiene una secuencia de adhesión celular.

Por otro lado, debemos apuntar que los péptidos que se han utilizado para la segunda modificación del polímero RGD previamente modificado con grupos azido también presentan dominios bioactivos, de manera que el péptido QK presenta una secuencia que promueve la angiogénesis y el péptido IK presenta una secuencia de adhesión a células neuronales, regulando el crecimiento y extensión de neuritas.

## 5.4 ENSAYOS IN VITRO

### 5.4.1 ENSAYO DE ADHESIÓN PRELIMINAR

Una vez preparados los distintos tipos de hidrogeles, el primer experimento realizado consistió en observar cómo se comportaban las células gliales de rata C6, una vez depositadas en la superficie, en lo referente a su adhesión y adaptación al hidrogel a lo largo del tiempo. Para ello, realizamos fotos de una misma área del hidrogel a diferentes tiempos con un CytoSmart Lux2. El hidrogel que utilizamos fue el GI que presenta secuencias de adhesión neuronales.

Inicialmente (tiempo 0) las células se encuentran no adheridas, presentando una morfología redondeada. Tras 24 horas de incubación se observa que la población de células apenas ha variado en número, si bien un tercio aproximadamente de ellas comienzan a expandirse, adoptando una forma alargada.





A las 48 horas de incubación se ha producido la adhesión total de las células, como muestra su morfología alargada, y comienza su proliferación ya que se triplica la población. Así mismo, a este tiempo, se observa que las células empiezan a interactuar entre ellas porque se observa que se van estirando hacia otras células cercanas y van adquiriendo una morfología fusiforme, característica de las células C6. A las 72 horas de incubación las células continúan con el mismo comportamiento, pero debido a la proliferación, se encuentran recubriendo casi toda la superficie del hidrogel (ver Figura 25).

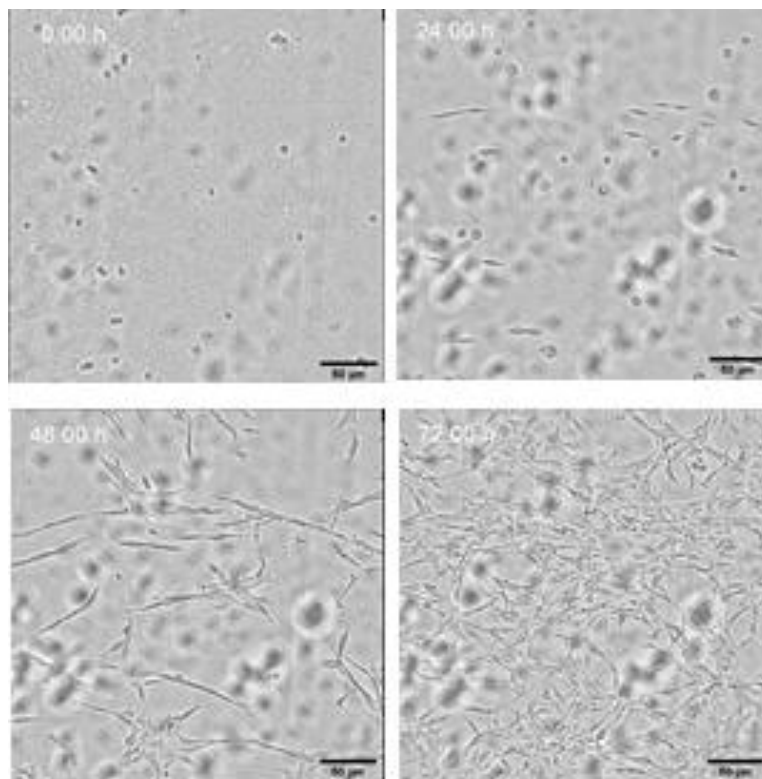


Figura 25 Fotos tomadas con el CytoSmart Lux2 a tiempos 0h, 24 h, 48 h y 72 h.

Se ha comparado el comportamiento que mostraron las células gliales con las que mostraron células endoteliales en un estudio similar [59]. Se observa que las células epiteliales a las 6 horas ya se habían adherido mientras que nuestras células gliales necesitaban 48 horas. Una célula que no está adherida presenta una morfología redonda. Cuando se adhiere a una superficie, la morfología empieza a cambiar hasta adoptar su forma característica, en el caso de las células gliales adoptaban forma de huso. Las células gliales presentaban una adhesión mucho menor al principio, un simple pipeteo para cambiar el medio hacía que perdiéramos bastantes células adheridas a la superficie.



Los resultados obtenidos en este ensayo nos permitieron determinar los tiempos de incubación de los experimentos posteriores, que llevaríamos a cabo a 24, 48 y 72 horas, debido a los cambios sustanciales observados previamente.

La reducida adhesión temprana puede deberse al tipo celular (células gliales C6), ya que en su cultivo y expansión en flask de cultivo celular presentaron el mismo comportamiento llegando a tardar 24 h en adherirse y empezar a proliferar.

## 5.4.2 ENSAYO DE CRECIMIENTO AXONAL

Una vez comprobado el tiempo necesario para la adhesión de las células gliales a la superficie del hidrogel, adaptamos los tiempos de los experimentos para que las células pudiesen estar adheridas a la superficie del hidrogel, condición exigida para poder medir la longitud axonal.

El ensayo se realiza con los 5 hidrogeles diferentes preparados por metodología *click* VV, UR, GR, GQ, GI, y se analizarán a 3 tiempos de incubación: 24, 48 y 72 horas.

### 5.4.2.1 TINCIÓN INMUNOFLUORESCENTE

Como queremos medir la longitud axónica necesitamos localizar con precisión varias estructuras celulares para poder realizar la medición. Tenemos que identificar el núcleo, que sería el lugar desde el que parte el axón, y la terminación del axón. La distancia entre estos dos puntos es la longitud del axón.

Para determinar por dónde existe axón recurrimos a 2 componentes del citoesqueleto que se encuentran en el axón: los microtúbulos y los filamentos de actina. Realizando una tinción con anticuerpos específicos para cada molécula, que están ligados a fluoróforos, a través de un microscopio de epifluorescencia o confocal podemos localizar cada estructura.

Para teñir los microtúbulos, elegimos usar un anticuerpo específico para la  $\beta$ -3 tubulina, que es específica de las células neuronales y es un indicador positivo de la normal actividad neuronal, presentando roles específicos en neurogénesis, guía y mantenimiento del axón, que emite en la región del verde. Para los filamentos de actina, elegimos un anticuerpo selectivo de la f-actina que emite en la región del rojo. Para teñir los núcleos, usamos un medio de montaje que contenía DAPI, que emite en la región del azul.

Mediante la toma de imágenes a través de estos microscopios, usando programas informáticos se puede medir la longitud axónica (ver Figura 26).



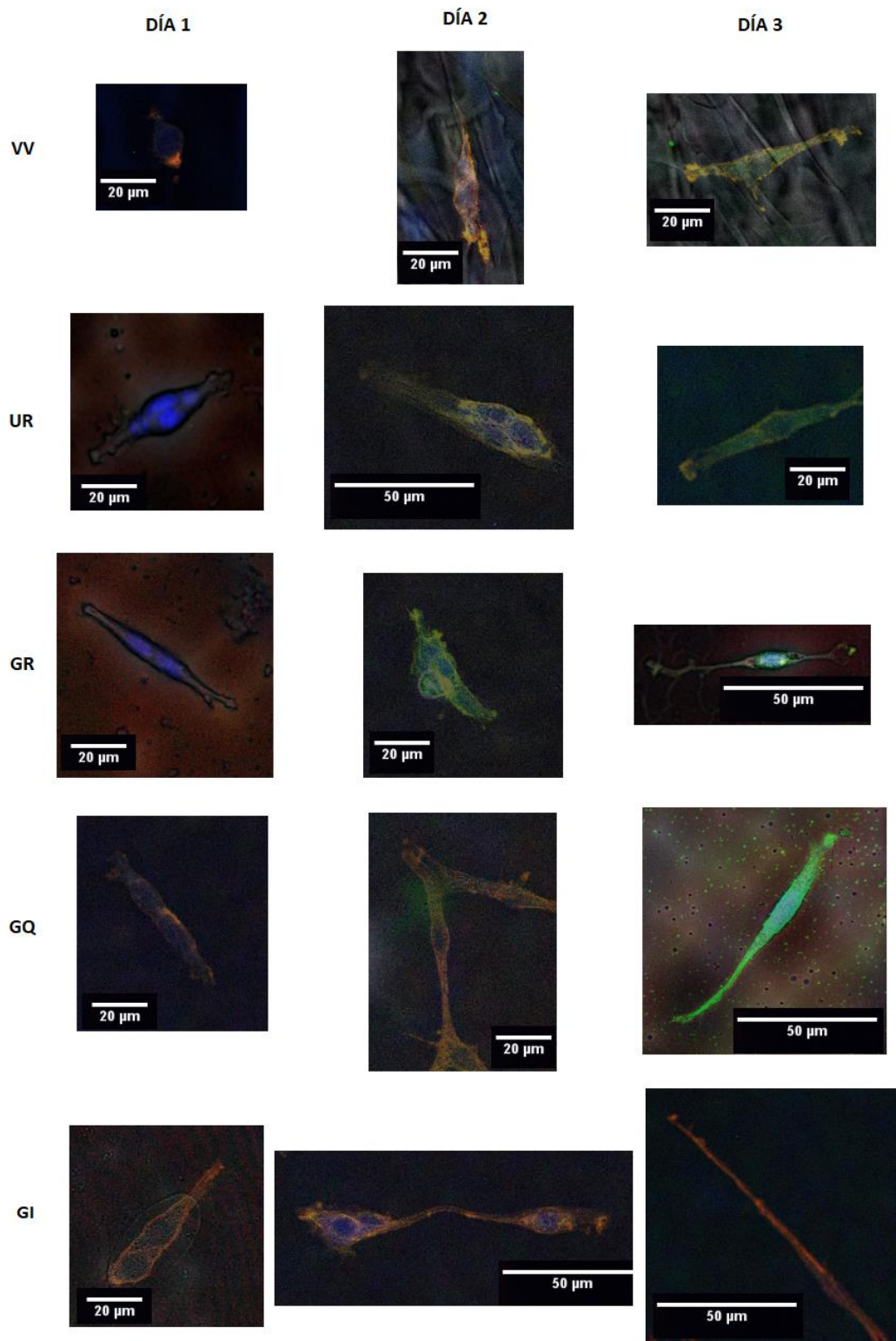


Figura 26 Fotos representativas de las células en cada tipo de hidrogel (VV, UR, GR, GQ, GI) a los diferentes tiempos (1,2 y 3 días). En azul están los núcleos, en verde la  $\beta$ -III tubulina, en rojo los filamentos de actina. En naranja donde localizan el verde y el rojo.

TIEMPO (DÍAS)	GEL	MEDIA	DESV. ESTANDAR
1	VV	15,131	13,486
1	UR	15,76	15,09
1	GR	22,17	20,27
1	GQ	11,44	11,43
1	GI	14,19	13,78
2	VV	14,84	5,86
2	UR	37,88	4,79
2	GR	38,84	11,39
2	GQ	38,2	12,49
2	GI	53,02	12,5
3	VV	26,94	10,16
3	UR	48,81	10,82
3	GR	72,38	11,61
3	GQ	69,62	10,54
3	GI	102,12	20,68

Tabla 8 Media y desviación estándar de las medidas tomadas a los axones de las células C6.

Los resultados que obtuvimos se encuentran registrados en la Tabla 8 (ver figura 27). Los axones el primer día son muy cortos porque las células no se adhieren bien el primer día, no superando los 20  $\mu\text{m}$ . En el segundo día en el gel VV los axones son similares, pero en el resto de hidrogeles se observa un crecimiento significativo superando los 35  $\mu\text{m}$  en todos los geles.

El gel GI, que tiene las secuencias de adhesión neuronal tiene una longitud de axón superior a los 50  $\mu\text{m}$ , diferenciándose de los otros geles. En el tercer día, la longitud de los axones aumenta en todos los geles, encontrándose 4 diferentes grupos. En el hidrogel VV ha sido donde menos crecimiento hubo a lo largo del experimento, y donde menor longitud tienen los axones. El UR presenta también un crecimiento a lo largo de los dos días, pero no llega a superar a los del grupo formado por GR y GQ. El grupo GI es el que presenta tanto mayor longitud como mayor crecimiento a lo largo del experimento. Esto se debe a que las secuencias de adhesión neuronal

favorecen que los axones puedan extenderse por la superficie mucho más fácil. Que era lo que esperábamos.

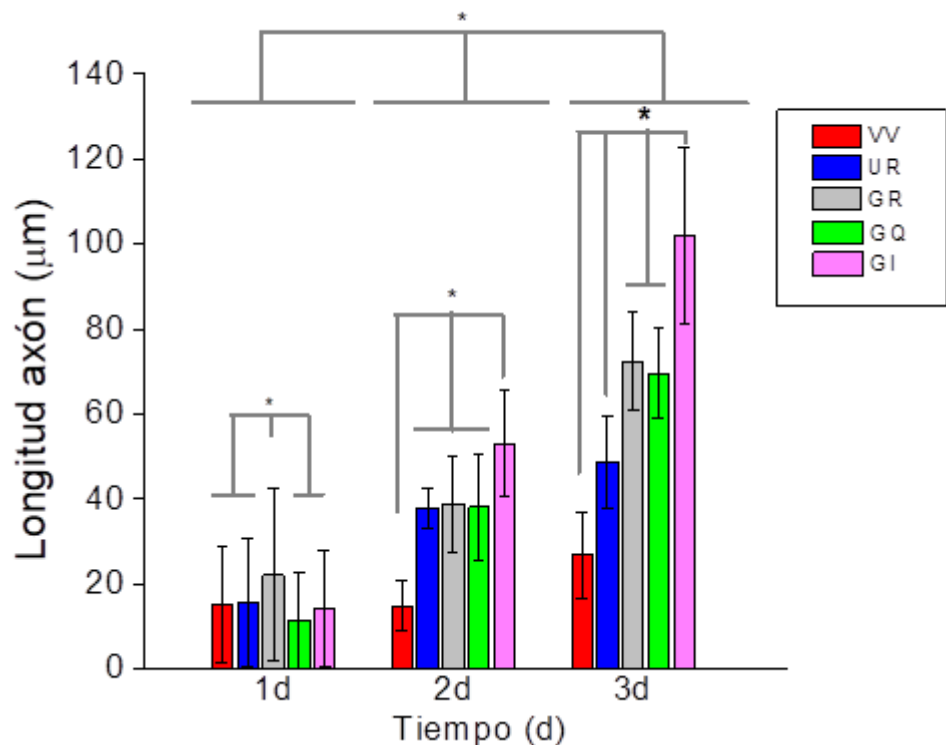


Figura 27 Longitud de los axones por tipo de hidrogel según el tiempo. En el eje de las X se encuentra el tiempo en días, y en el eje de la Y la longitud del axón en micrómetros. Para simplificar no se muestra que no hay diferencias significativas entre los geles.

La longitud de los axones medidos en otro estudio con las células C6 se corresponden a los obtenidos en este experimento [61].

Cuanto mayor sea la longitud del axón, más estiradas están las células, indicando que hay una mayor actividad neuronal, proliferación celular y existe un funcionamiento celular normal. Dando lugar a una población densa y alineada de células con morfología más organizada en vez de la aparición de células multipolares que poseen un solo axón y muchas dendritas.

En un futuro experimento se repetirá la tinción de  $\beta$ -III tubulina para estudiar y cuantificar la expresión de la  $\beta$ -III tubulina que indica funciones específicas en la neurogénesis, la guía de los axones y el mantenimiento.

Los buenos resultados obtenidos permiten organizar un nuevo experimento en el que se sujetan las células a unos beads y se introducen en

los hidrogeles. Las células irían degradando el gel e irían estirando sus axones dirigiéndolos hacia otras células cercanas. Lo que prevemos es que los hidrogeles con secuencias de adhesión neuronales favorezcan el crecimiento de los axones, por tanto, la distancia entre los axones será mucho menor comparados con la del resto de hidrogeles.

#### 5.4.2.2 PROBLEMAS EN LA EJECUCIÓN

Durante la toma de fotos con los microscopios hubo varios contratiempos. El primero de ellos es que la topografía del hidrogel no era uniforme, por lo que cada vez que movías el campo de visión del microscopio tenías que volver a enfocar, esto se debe a que el gel no forma una capa totalmente lisa en la superficie y a que el microscopio confocal va provisto de un pinole que permite diferenciar "z" muy pequeños evitando la señal de "z" por encima y por debajo.

El siguiente problema y el más importante de todos es que los propios geles son autofluorescentes, que en algunos casos enmascaraban las tinciones ya que el gen emite luz a las frecuencias de observación de los fluorocromos usados, principalmente el azul y el verde, haciendo que el color rojo, que se encuentra a longitudes de onda más largas, fuera el que mejor se veía. Por estos motivos usamos los filamentos de actina (rojo) para medir la longitud axónica ya que el verde era más difícil de diferenciar.

#### 5.4.3 PRÓXIMOS TRABAJOS

Con los datos obtenidos con estos experimentos, podemos ver que los diferentes geles permiten que las células gliales crezcan diferentes. Por tanto, se podrían diseñar estructuras con estos hidrogeles que permita el crecimiento direccionado de las células. Así se favorecería la regeneración en caso de daño y muerte celular.

Lo ideal sería que esto se pudiera trasladar a las neuronas, que son otro tipo de células neuronales, que tienen un crecimiento y una regeneración mucho menor. Si se consiguiera, se podrían utilizar para tratar enfermedades causadas por el daño o destrucción neuronal.



## 5.5 OTROS ESTUDIOS SIMILARES

Los polímeros producidos en biorreactores, a los que se les hace una modificación química para la formación de hidrogeles, mediante la misma reacción que la utilizada en este trabajo presentan una gran amplitud de usos.

Uno de ellos es la regeneración de tejido cardíaco tras un infarto de miocardio. Cuando ocurre un infarto, las células del tejido cardíaco afectado por la falta de oxígeno se mueren. El cuerpo intenta regenerar las células perdidas, pero se forma un tejido cicatricial fibrótico. Este tejido no tiene las funciones que poseen las células cardíacas y no se puede recuperar, por lo tanto, la zona regenerada habrá perdido su función original, y la persona afectada podrá volver a sufrir otro infarto.

Este estudio usó polímeros producidos en el mismo laboratorio y de la misma manera que los usados en este trabajo para la formación de unos hidrogeles que se inyectan en el área afectada. Este gel evita que crezca el tejido fibroso y favorece la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) y el acercamiento de células sanas que irán creciendo sobre el gel. El gel tiene secuencias de degradación, por lo que mientras las células van creciendo, se va degradando el gel, reparando el tejido sin la aparición del tejido fibroso.

Por el momento, el estudio se ha realizado en ovejas, pero parece bastante prometedor para su aplicación en clínica, que es lo que buscamos con este trabajo, pero para las células neuronales [62].



## 6. CONCLUSIONES

- ✓ Se han producido los polímeros tipo elastina VKV, DRIR, GTAR y RGD que han sido modificados para la creación de hidrogeles vía química *click* a través de los grupos azida y ciclo.
  
- ✓ A pesar de la adhesión tardía, las células gliales se adhieren al hidrogel y empiezan a proliferar una vez adheridas, permitiendo el recubrimiento de la superficie en poco tiempo.
  
- ✓ Los diferentes dominios bioactivos que poseen los hidrogeles permiten que el crecimiento de los axones sea diferente, observándose un mayor crecimiento en el hidrogel que posee secuencias de adhesión específicas de células neuronales (GI). También se observa un buen comportamiento en aquellos hidrogeles que poseen dominios de adhesión celulares generales.
  
- ✓ Los resultados demuestran que los hidrogeles de elastina con el péptido derivado de laminina IK impulsan el crecimiento de células neuronales y la extensión de neuritas, pudiéndose usar dichos scaffolds en medicina regenerativa para el tratamiento de diferentes enfermedades del sistema nervioso.







## 7. AGRADECIMIENTOS

En este apartado quisiera agradecer la colaboración, dedicación, y ayuda que he recibido de tantas personas dentro y fuera del laboratorio.

En primer lugar, a Rocío y Leticia, por enseñarme todo lo que saben de la producción de polímeros, sin ellas este trabajo no se habría podido realizar.

Quería agradecer a mis compañeras del Máster Ariadna y Lucía por toda la ayuda que me han ofrecido en el laboratorio. A Diana por confiar en mí y permitirme ayudarla con sus experimentos.

También a mis amigas Mónica, Clara, Elena, Anaïs por hacer más ameno este año tan complicado.

Quiero agradecer especialmente a Fernando que sin su ayuda todo este trabajo no hubiera sido posible.

Por su puesto, a mi tutora Merche, por su tutela, ayuda y orientación en la elaboración de este TFM y por encontrar un sitio en su ajetreada agenda para dar un último repaso antes de la entrega.

A todos aquellos, que durante este proceso me han animado a seguir y conseguir el objetivo y que no están reseñados, por expreso deseo de ellos. Mi agradecimiento.





## 8. BILIOGRAFÍA

1. Cantile, C., & Youssef, S. (2016). Nervous System. In Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Sixth Edition (Vol. 1, pp. 250–406). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5317-7.00004-7>
2. Ghosh, S. K. (2020). Camillo Golgi (1843–1926): Scientist Extraordinaire and Pioneer Figure of Modern Neurology. *Anatomy and Cell Biology*, 53(4), 385–392. <https://doi.org/10.5115/acb.20.196>
3. Swanson, L. W., Grant, G., Hökfelt, T., Jones, E. G., & Morrison, J. H. (2007). A century of neuroscience discovery: Reflecting on the Nobel Prize awarded to Golgi and Cajal in 1906. In *Brain Research Reviews* (Vol. 55, Issue 2 SPEC. ISS., pp. 191–192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.001>
4. Scheuerlein, H., Henschke, F., & Köckerling, F. (2017). Wilhelm von Waldeyer-Hartz—A Great Forefather: His Contributions to Anatomy with Particular Attention to “His” Fascia. In *Frontiers in Surgery* (Vol. 4, p. 1). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2017.00074>
5. Pérez-Cerdá, F., Sánchez-Gómez, M. V., & Matute, C. (2015). Pío del Río horteaga and the discovery of the oligodendrocytes. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 9, Issue July). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00092>
6. Steven Telleen, Human Physiology. OpenStax CNX. 15 dic 2016 <http://cnx.org/contents/1cdae0d3-abd0-4750-aed6-f0f2bdb70fdb@2.8>.
7. Martínez-Gómez, A. (2014). Comunicación entre células gliales y neuronas I. Astrocitos, células de Schwann que no forman mielina y células de Schwann perisinápticas. *Medicina e Investigación*, 2(2), 75–84. [https://doi.org/10.1016/s2214-3106\(15\)30002-9](https://doi.org/10.1016/s2214-3106(15)30002-9)
8. Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. In *Neuron* (Vol. 82, Issue 1, pp. 24–45). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
9. Monje, M. (2018). Myelin plasticity and nervous system function. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 41, pp. 61–76). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061853>
10. Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. In *GLIA* (Vol. 62, Issue 9, pp. 1377–1391). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>
11. Reyes-Haro, Daniel & Bulavina, Larissa & Pivneva, Tatyana. (2014). La glía, el pegamento de las ideas. *Ciencia*. 12-18.

12. Martínez-Gómez, A. (2014). Comunicación entre células gliales y neuronas II. Células gliales que forman mielina. *Medicina e Investigación*, 2(2), 85–93. [https://doi.org/10.1016/s2214-3106\(15\)30003-0](https://doi.org/10.1016/s2214-3106(15)30003-0)
13. Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. In *Veterinary Pathology* (Vol. 35, Issue 6, pp. 461–478). American College of Veterinary Pathologists Inc. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
14. van den Heuvel, S. (2005). Cell-cycle regulation. In *WormBook: the online review of C. elegans biology* (pp. 1–16). WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.28.1>
15. Del, M., Lagunas Cruz, C., Mendiola, A. V., & Soto Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de Regulación (Vol. 17, Issue 2). <https://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2014/vre142e.pdf>
16. Bizzarri, M., Giuliani, A., Minini, M., Monti, N., & Cucina, A. (2020). Constraints Shape Cell Function and Morphology by Canalizing the Developmental Path along the Waddington's Landscape. *BioEssays*, 42(4). <https://doi.org/10.1002/bies.201900108>
17. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Issue 2, pp. 115–130). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
18. Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. In *Journal of Pathology* (Vol. 226, Issue 2, pp. 352–364). J Pathol. <https://doi.org/10.1002/path.3022>
19. Frade, J. M., & Ovejero-Benito, M. C. (2015). Neuronal cell cycle: The neuron itself and its circumstances. In *Cell Cycle* (Vol. 14, Issue 5, pp. 712–720). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1004937>
20. MM, S., A, S., & JS, M. (1987). Neural regeneration. *Progress in Brain Research*, 71, 1–498. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_302](https://doi.org/10.1007/82_2012_302)
21. Lenfest, S. M., Vaduva-Nemes, A., & Okun, M. S. (2011). Dr. Henry Head and lessons learned from his self-experiment on radial nerve transection: Historical vignette. In *Journal of Neurosurgery* (Vol. 114, Issue 2, pp. 529–533). J Neurosurg. <https://doi.org/10.3171/2010.8.JNS10400>
22. Curcio, M., & Bradke, F. (2018). Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 34, pp. 495–521). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062508>

23. Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Kuhn, H. G., Jessberger, S., Frankland, P. W., Cameron, H. A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D. N., Toni, N., Schinder, A. F., Zhao, X., Lucassen, P. J., & Frisén, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. In *Cell Stem Cell* (Vol. 23, Issue 1, pp. 25–30). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>
24. Datta, L. P., Manchineella, S., & Govindaraju, T. (2020). Biomolecules-derived biomaterials. In *Biomaterials* (Vol. 230). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119633>
25. Oliveira, I., Carvalho, A. L., Radhouani, H., Gonçalves, C., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2018). Promising biomolecules. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1059, pp. 189–205). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76735-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76735-2_8)
26. Forbes, J., & Krishnamurthy, K. (2020). Biochemistry, Peptide. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32965931>
27. Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2005). Elastin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 437–461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9)
28. Gonzalez de Torre, I., Alonso, M., & Rodriguez-Cabello, J. C. (2020). Elastin-Based Materials: Promising Candidates for Cardiac Tissue Regeneration. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00657>
29. Ibáñez-Fonseca, A., Flora, T., Acosta, S., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2019). Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials. In *Matrix Biology* (Vol. 84, pp. 111–126). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.003>
30. Yeo, J., Huang, W., Tarakanova, A., Zhang, Y. W., Kaplan, D. L., & Buehler, M. J. (2018). Unraveling the molecular mechanisms of thermo-responsive properties of silk-elastin-like proteins by integrating multiscale modeling and experiment. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(22), 3727–3734. <https://doi.org/10.1039/c8tb00819a>
31. Rodríguez-Cabello, J. C., Arias, F. J., Rodrigo, M. A., & Girotti, A. (2016). Elastin-like polypeptides in drug delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 97, pp. 85–100). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.007>
32. Ibáñez-Fonseca, A., Ramos, T. L., González de Torre, I., Sánchez-Abarca, L. I., Muntión, S., Arias, F. J., del Cañizo, M. C., Alonso, M., Sánchez-Guijo, F., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2018). Biocompatibility of two model elastin-like recombinamer-based hydrogels formed through physical or chemical cross-linking for various applications in tissue

- engineering and regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(3), e1450–e1460. <https://doi.org/10.1002/term.2562>
33. Ahmad, M., Jung, L. T., & Bhuiyan, A. A. (2017). From DNA to protein: Why genetic code context of nucleotides for DNA signal processing? A review. In *Biomedical Signal Processing and Control* (Vol. 34, pp. 44–63). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2017.01.004>
  34. González, Andrés & Fillat, María. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica*. 37. 14-27.
  35. Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. In *eLife* (Vol. 4). Elife. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
  36. Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 3–32. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_303](https://doi.org/10.1007/82_2012_303)
  37. Tafurt Y, Marin MA. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud* 2014; 13(2): 95-110.
  38. Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. <https://doi.org/10.18597/rcog.468>
  39. Rodríguez-Cabello, J. C., De Torre, I. G., Acosta, S., Salinas, S., & Herrero, M. (2018). Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling. In *Self-Assembling Biomaterials: Molecular Design, Characterization and Application in Biology and Medicine* (pp. 49–78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102015-9.00004-6>
  40. D.T. McPherson, J. Xu, D.W. Urry, Product Purification by Reversible Phase Transition
  41. Following *Escherichia coli* Expression of Genes Encoding up to 251 Repeats of the
  42. Elastomeric Pentapeptide GVGVP, *Protein Expr. Purif.* 7 (1996) 51–57.
  43. Waseeq Ur Rehman, Asim, M., Hussain, S., Khan, S. A., & Khan, S. B. (2020). Hydrogel: A Promising Material in Pharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Design*, 26(45), 5892–5908. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201118095523>
  44. Gradinaru, V., Treweek, J., Overton, K., & Deisseroth, K. (2018). Hydrogel-Tissue Chemistry: Principles and Applications. In *Annual*
- 

- Review of Biophysics (Vol. 47, pp. 355–376). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-032905>
45. Stoica, A. E., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2020). Hydrogel dressings for the treatment of burn wounds: An up-to-date overview. In *Materials* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma13122853>
  46. Francesko, A., Petkova, P., & Tzanov, T. (2019). Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *Current Medicinal Chemistry*, 25(41), 5782–5797. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920161246>
  47. Moore, A. N., Lopez Silva, T. L., Carrejo, N. C., Origel Marmolejo, C. A., Li, I. C., & Hartgerink, J. D. (2018). Nanofibrous peptide hydrogel elicits angiogenesis and neurogenesis without drugs, proteins, or cells. *Biomaterials*, 161, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.033>
  48. González De Torre, I., Santos, M., Quintanilla, L., Testera, A., Alonso, M., & Rodríguez Cabello, J. C. (2014). Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2495–2505. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.006>
  49. Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, 6(5), 1068–1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
  50. Hatiboruah, D., Devi, D. Y., Namsa, N. D., & Nath, P. (2020). Turbidimetric analysis of growth kinetics of bacteria in the laboratory environment using smartphone. *Journal of Biophotonics*, 13(4). <https://doi.org/10.1002/jbio.201960159>
  51. Sharma, P., Lam, V. K., Raub, C. B., & Chung, B. M. (2020). Tracking single cells motility on different substrates. *Methods and Protocols*, 3(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/mps3030056>
  52. Hicks, J. M. (1984). Fluorescence immunoassay. *Human Pathology*, 15(2), 112–116. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(84\)80049-0](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(84)80049-0)
  53. Laiko, V.V., M.A. Baldwin, and A.L. Burlingame, Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2000. 72(4): p. 652-657.
  54. Huleihel, M., Pavlov, V., & Erukhimovitch, V. (2009). The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.03.009>



55. Anguebes, F., Pat, L., Ali, B., Guerrero, A., Córdova, A. V., Abatal, M., & Garduza, J. P. (2016). Application of multivariable analysis and FTIR-ATR spectroscopy to the prediction of properties in campeche honey. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5427526>
56. Keeler, J. (2011). *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons.
57. Background and Theory Page of Nuclear Magnetic Resonance Facility. Mark Wainwright Analytical Centre. University of Southern Wales Sydney., 2011.
58. Girotti, A., Reguera, J., Rodríguez-Cabello, J. C., Arias, F. J., Alonso, M., & Testera, A. M. (2004). Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(4), 479–484. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000021124.58688.7a>
59. González-Pérez, F., Ibáñez-Fonseca, A., Alonso, M., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2021). Combining tunable proteolytic sequences and a VEGF-mimetic peptide for the spatiotemporal control of angiogenesis within Elastin-Like Recombinamer scaffolds. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.06.005>
60. Flora, T., de Torre, I. G., Alonso, M., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2019). Tethering QK peptide to enhance angiogenesis in elastin-like recombinamer (ELR) hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(2). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6232-z>
61. Jain, R., & Roy, S. (2020). Controlling Neuronal Cell Growth through Composite Laminin Supramolecular Hydrogels. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(5), 2832–2846. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b01998>
62. Contessotto, P., Orbančić, D., da Costa, M., Jin, C., Owens, P., Chantepie, S., Chinello, C., Newell, J., Magni, F., Papy-Garcia, D., Karlsson, N. G., Kilcoyne, M., Dockery, P., Rodríguez-Cabello, J. C., & Pandit, A. (2021). Elastin-like recombinamers-based hydrogel modulates post-ischemic remodeling in a non-transmural myocardial infarction in sheep. *Science Translational Medicine*, 13(581). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz5380>







