



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Física

Título del Trabajo

“Desarrollo de nuevos hidrogeles ELR con injertos de péptidos de la laminina mediante la tecnología Click para su aplicación en regeneración tisular”

Autor:

José Ricardo Moran Cabezas

Tutor/es:

Prof. José Carlos Rodríguez Cabello

Dña. Diana Juanes Gusano

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por permitirme tan valiosa oportunidad de estudiar en tan prestigiosa Institución como es la Universidad de Valladolid y por permitirme crecer en el ámbito que me apasiona, agradezco a todos los maestros que aportaron con mi crecimiento personal a lo largo del Máster y al grupo de investigación BIOFORGE por su colaboración, asesoría y enseñanza a lo largo de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Medicina Regenerativa e Ingeniería de tejidos	1
1.2. Terapia Celular	1
1.3. Ingeniería Tisular	1
1.4. Biomateriales	1
1.5. Elastina y Polímeros tipo Elastina (ELRs)	2
1.6. Aplicaciones de los ELRs	3
1.6.1. Hidrogeles	3
1.6.2. Estructuras capa a capa de polímeros ELRs	4
1.6.3. Dosificación de fármacos en ELRs	4
1.7. Laminina	4
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y METODOS	6
3.1. Materiales	6
3.1.1. Reactivos Químicos	6
3.1.2. Medios de Cultivo.....	6
3.1.3. Polímeros	6
3.1.3.1. Polímero VKV	6
3.1.3.2. Polímero SKS.....	7
3.1.3.3. Péptido AASIKVAVSADR	7
3.1.3.4. Péptido PPFLMLLKGSTR.....	7
3.2. Métodos	7
3.2.1. Bioproducción de los ELRs	7
3.2.2. Modificación Química de ELRs	8
3.2.3. Formación del hidrogel ELR mediante la metodología click	8
3.2.4. Obtención de los péptidos de interés.....	8
3.2.4.1. Síntesis del péptido	9
3.2.4.2. Proceso de lavado.....	11
3.2.4.3. Proceso de liberación de péptido.....	11
3.2.4.4. Proceso de filtrado	12
3.2.5. Formación de Hidrogeles con los péptidos de interés	12

3.2.5.1. Optimización de la masa de VKV y SKS	12
3.2.5.2. Obtención de Hidrogeles con péptidos.	14
3.3. Caracterización físico-química de los nuevos hidrogeles SKS-VKV con péptidos.	16
3.3.1. Análisis Químico Elemental (AQE).....	16
3.3.2. Análisis de Aminoácidos (HPLC).....	16
3.3.3. Resonancia Magnética Nuclear de protón (H-RMN).....	17
3.3.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	17
3.3.5. Espectrometría de masas (MALDI-ToF)	18
3.4. Caracterización de la viscoelasticidad por Reología.....	19
3.4.1. Barrido de Strain (Strain sweep test)	20
3.4.2. Barrido de Frecuencia	20
3.5. Estudio de la actividad metabólica de células HaCat en los nuevos hidrogeles VKV-cc- péptido/SKS-N3.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Formación del hidrogel con péptidos injertados	21
4.2. Análisis elemental.....	22
4.3. Análisis de aminoácidos.....	23
4.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	23
4.5. MALDI-TOF	31
4.6. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	35
4.7. Reología.....	36
4.8. Células.....	38
5. CONCLUSIONES.....	39
6. BIBLIOGRAFIA.....	41
7. ANEXOS.....	44

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 REACTIVOS QUÍMICOS.....	6
TABLA 2 NOMENCLATURA A USARSE PARA LISINAS MODIFICADAS CON PÉPTIDOS	12
TABLA 3 LISTA DE LISINAS MODIFICADAS Y LISINAS DISPONIBLES.....	13
TABLA 4 MUESTRA DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS EN EL POLÍMERO VKV-CC- PÉPTIDO 1	23
TABLA 5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS EN EL POLÍMERO VKV-CC-PÉPTIDO 2	23
TABLA 6 MEDIDAS DE TAMAÑO DE PORO PARA LOS HIDROGELES VKV-CC-PEP/NH ₃	36
TABLA 7 MÓDULOS DE ALMACENAMIENTO DE LOS HIDROGELES ELR	37
TABLA 8 CANTIDADES DE POLÍMEROS Y PÉPTIDO USADAS EN LA CREACIÓN DE HIDROGELES A UNA CONCENTRACIÓN DE 25 MG/M _L A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PÉPTIDOS.....	44

ABREVIATURAS

Aminoácidos	
Nombre	Código en Letras
Alanina	A
Arginina	R
Ácido Aspártico	D
Fenilalanina	F
Glicina	G
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Valina	V
Ácido Glutámico	E

ELR: Elastin-like Recombinamer (Polímeros tipo elastina)

H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Protón.

MQ: Agua Mili-Q

TFA: Ácido Trifluoroacético

DCM: Dicloro Metano

SPPS: Síntesis en fase solida

MPPs: Metaloproteinasa de matriz extracelular

LG: Laminina Globular

AQE: Análisis Químico Elemental

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization

TOF: Time of Flight

CHCA: Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamico

SA: Ácido sinpínico

LVR: Región viscoelástica Lineal

rMSC: Células estromales mesenquimales de conejo

SEM: Scanning Electron Microscope

TCP: Tissue Culture Plate

RESUMEN

El presente trabajo de Fin de Máster se centra en la obtención de materiales inteligentes como son los hidrogeles formados con biopolímeros basados en recombinámeros tipo elastina (ELRs), con la inclusión de secuencias específicas de péptidos de la laminina, que brindan a los hidrogeles una capacidad instructiva que mejora sus características fisicoquímicas y biológicas para que estos puedan ser usados en posibles aplicaciones biomédicas.

Más concretamente, se explica el proceso de modificación química para la obtención del biopolímero VKV modificado con el grupo ciclooctino (VKV-cc) y el biopolímero SKS modificado con el grupo azida (SKS-N₃) y la formación de hidrogeles utilizando la metodología click.

Asimismo, se detalla el proceso de síntesis en fase sólida (SPPS) de la secuencia de los péptidos AASIKVAVSADR (péptido 1) y PPFLMLLKGSTR (péptido 2) usados posteriormente como nuevos dominios bioactivos injertados en hidrogeles formados por los recombinámeros VKV-cc y SKS-N₃. Además, se incluye la caracterización de la unión del polímero VKV-cc con un número creciente de péptidos (VKV-cc-péptido) por técnicas de H-RMN, MALDI-ToF, análisis de aminoácidos y análisis elemental, así como la formación de hidrogeles con los recombinámeros VKV-cc-péptidos - SKS-N₃ y el estudio reológico de las propiedades viscoelásticas de dichos hidrogeles. Por último, se realizó una evaluación de la biocompatibilidad de estos nuevos hidrogeles que incluyen péptidos de la laminina por medio de la actividad metabólica con un ensayo *in vitro* con queratinocitos inmortalizados humanos (HaCaT).

Gracias a los resultados de los distintos estudios realizados se pudo concluir que estos biomateriales inteligentes presentan una gran versatilidad y eficiencia y su gran potencial para ser desarrollados y aplicados en la medicina regenerativa.

ABSTRACT

This Master's Thesis focuses on obtaining intelligent materials such as hydrogels formed with biopolymers based on elastin-type recombinamers (ELRs), with the inclusion of specific sequences of laminin peptides, which provide hydrogels with a instructive that improves their physicochemical and biological characteristics so that they can be used in possible biomedical applications.

More specifically, the chemical modification process for obtaining the VKV biopolymer modified with the cyclooctyne group (VKV-cc) and the SKS biopolymer modified with the azide group (SKS-N₃) and the formation of hydrogels using the "click" methodology is explained.

Likewise, the solid phase synthesis process (SPPS) of the sequence of the peptides AASIKVAVSADR (peptide 1) and PPFLMLLKGSTR (peptide 2) used as new inclusions in hydrogels formed by the biopolymers VKV-cc and SKS-N₃ is detailed. In addition, the characterization of the biopolymers at three concentrations of the peptide (VKV-cc-peptide) and the SKS-N₃ biopolymer by H-NMR techniques, MALDI-ToF, amino acid analysis, elemental analysis, and rheological study of the Viscoelastic properties of VKV-cc-peptide/SKS-N₃ hydrogels. Finally, an evaluation of the biocompatibility of these new hydrogels that include laminin peptides was carried out with an in vitro assay with human immortalized keratinocytes ("HaCat") to verify the cellular metabolic activity on them.

Thanks to the results of the different studies carried out, it was possible to conclude that these intelligent biomaterials have great versatility and efficiency and their great potential to be developed and applied in regenerative medicine.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Medicina Regenerativa e Ingeniería de tejidos

La medicina regenerativa utiliza técnicas de terapia celular, regeneración tisular guiada y la ingeniería tisular para tratar un gran número de enfermedades de origen infeccioso, degenerativo, genéticas o causadas por accidentes. Estas alteraciones en células de un tejido u órganos pueden causar un funcionamiento anormal del organismo y dan paso al desarrollo de enfermedades. De este modo la medicina regenerativa busca restablecer las funciones normales de los tejidos u órganos y mejorar la calidad de vida de las personas. ^[1]

1.2. Terapia Celular

Es un tratamiento que utiliza células como agente terapéutico. Estas células pueden ser generadas a partir de células autogénicas del propio paciente por cultivo *ex vivo* (modelo que emplea técnicas *in vitro* para estudiar muestras obtenidas *in vivo*), o por donantes a partir de células alogénicas. Estas células o material celular se implantan en el tejido dañado para ayudar a reparar el mismo.

1.3. Ingeniería Tisular

Su objetivo es la construcción de tejidos *in vitro* de tipo autólogo (que se obtiene del mismo individuo que lo recibe) para su utilización terapéutica en tejidos afectados para recuperar su funcionalidad normal. Esto se realiza cultivando células en una matriz tridimensional enriquecida con factores de crecimiento en el cual las células pueden desarrollarse y posteriormente el tejido artificial desarrollado puede ser trasplantado a un órgano receptor. ^[2]

Los beneficios al momento de usar esta técnica es que reducimos significativamente el riesgo de provocar infecciones desde un donante hacia el receptor, también no habrá rechazo inmune al tejido implantado en caso del tejido autólogo ^[3]. De esta manera se da una mejor calidad de vida al paciente y se reduce el índice de mortalidad de la persona.

1.4. Biomateriales

Los biomateriales son aquellos materiales utilizados en la fabricación de sistemas biológicos y cuya aplicabilidad está inmersa en áreas de la medicina ^[4]. En ingeniería de tejidos son usados como andamios que interactúan con los sistemas biológicos y permiten la integración de un tejido tridimensional que sea similar a la estructura anatómica que se requiere regenerar. Estos biomateriales actúan de manera similar a la matriz extracelular nativa y permiten el alojamiento, crecimiento y reproducción de las células.

Estos biomateriales son biocompatibles y pueden ser de origen natural o sintético. Los biomateriales sintéticos son aquellos que son elaborados en laboratorios mediante procesos industriales como los metales, cerámicos, o materiales compuestos, y los materiales naturales son aquellos cuyo origen sea animal o vegetal o mineral como, por ejemplo, el colágeno, la fibrina, la agarosa, el quitosano, entre otras ^[5]. Poseen como característica principal su robustez y ligereza, y deben cumplir requerimientos básicos como no ser tóxicos al degradarse en el cuerpo humano, ser biocompatibles con el tejido del huésped, presentar ausencia

de potencial carcinogénico, ausencia de reacción inflamatoria y no perder sus propiedades físico-químicas al ser esterilizados [6].

1.5. Elastina y Polímeros tipo Elastina (ELRs)

La elastina es uno de los constituyentes más abundantes en la matriz extracelular, la cual es la encargada de aportar elasticidad y resiliencia a los tejidos y su reparación tisular. La composición polipeptídica de la elastina posee secuencias VPGVG, VPGG, APGVG, entre otras. El 90% de sus aminoácidos son de resto lateral apolar de los cuales destacan la prolina, alanina, leucina, isoleucina, valina y la glicina, su conformación les confiere cualidades físicas como la capacidad de deformarse y recuperar su estructura original sin romperse [7].

Los polímeros basados en recombinámeros tipo elastina (ELRs) son materiales diseñados genéticamente e inspirados en la elastina natural, los dominios intrínsecamente desordenados de la tropoelastina están compuesta de repeticiones de una secuencia hidrofóbica de aminoácidos (Val-Pro-Gly-X- Gly)_n, donde X es el residuo huésped, y puede ser cualquier aminoácido a excepción de la L-prolina- y *n* determina el número de repeticiones del pentapéptido [8].

Los ELRs están contruidos a partir de las secuencias de elastina natural y son capaces de presentar propiedades biocompatibles, de biodegradabilidad y de respuesta a estímulos físicos y químicos. Poseen una transición de fase reversible en respuesta a estímulos como la temperatura y gracias a su naturaleza peptídica es posible producir proteínas recombinantes en organismos genéticamente modificados, como son las bacterias (*Escherichia coli*).

La elastina experimenta una transición inversa con la temperatura en la que su estructura cambia con respecto a esa variación de temperatura. Esta variación en su estructura se observa en su capacidad de formar coacervados (que son sistemas formados por la unión de moléculas complejas como proteínas y los aminoácidos) en el cual el ordenamiento de sus cadenas incrementa cuando la temperatura aumenta.

Las cadenas de los polímeros son solubles en agua por debajo de la temperatura de transición (*T_t*), y por encima de esta, son insolubles. Las cadenas laterales hidrofóbicas de las secuencias VPGXG permanecen rodeadas por moléculas de agua tipo clatrato, ordenadas en estado de baja entropía, por encima de la temperatura de transición las cadenas se pliegan y se ensamblan de forma hidrófoba, incrementando su entropía y permitiendo así que las cadenas laterales no polares formen interacciones intra e intermoleculares con moléculas vecinas de los ELRs cercanas, precipitando [9].

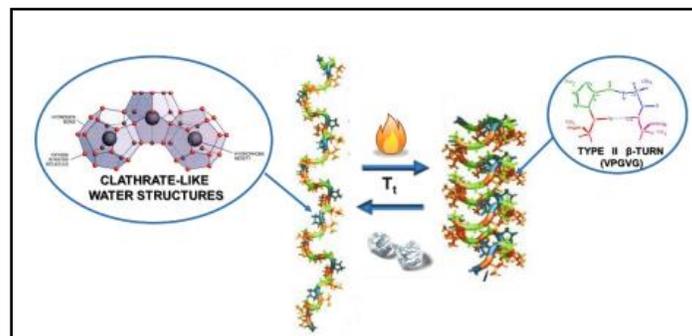


Ilustración 1 Transición térmica de ELRs de un estado extendido rodeado por clatratos de agua a un estado plegado (giro B tipo II en pentapéptidos VPGVG)

1.6. Aplicaciones de los ELRs

Los ELR son considerados como materiales inteligentes debido a que muestran cambios de conformación en respuesta a estímulos externos como la temperatura, por lo que han ganado un amplio interés en aplicaciones biomédicas. Debido a que los ELRs pueden ser muy versátiles se han encontrado grandes y diversas aplicaciones en el campo de la biomedicina que van desde la medicina regenerativa a la liberación controlada de fármacos. Estos recombinámeros pueden encontrarse con diferentes formas como capsulas, membranas, fibras, micelas, recubrimientos, nanopartículas o hidrogeles.

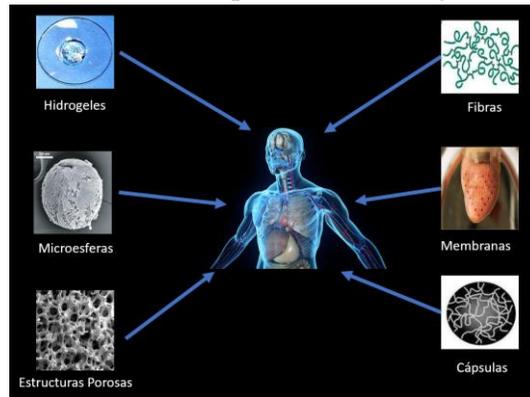


Ilustración 2: Aplicaciones de Los ELR en biomedicina

1.6.1. Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras hidrófilas, blandas, elásticas e insolubles en agua, poseen una red tridimensional conformada por cadenas flexibles de polímeros que tienen la capacidad de absorber y contener agua en su estructura gracias al balance entre las fuerzas osmóticas (el agua que entra en la red y las fuerzas que ejercen las cadenas poliméricas en oposición a esa expansión).^[10] Los hidrogeles deben ser fáciles de manipular y con condiciones mecánicas adecuadas, que les permitan cumplir su función de biocompatibilidad y biodegradabilidad ^[11].

Los parámetros que caracterizan la estructura de la red de un hidrogel determinan sus propiedades, como son el volumen, el peso molecular de la cadena polimérica, el grado de pureza del polímero, su concentración en solución acuosa y el tamaño de la red ^[12].

Además, pueden poseer cualidades asociadas a su carga, pudiendo existir hidrogeles neutros, catiónicos o aniónicos. Esta propiedad de carga de la red de los hidrogeles viene determinada por el pH del medio en el que se encuentran, un hidrogel adopta una carga negativa utilizando grupos carboxílicos y proporciona una carga positiva gracias a los grupos amino.

En aplicaciones biomédicas los hidrogeles deben servir como un soporte estructural a las células circundantes, también, deben tener la capacidad de imitar la topografía de la matriz extracelular de los tejidos, y mimetizar el entorno natural en el que las células se desarrollan. Esto es posible gracias a que en su red puede contener un gran volumen de agua, similar a numerosos tejidos de organismos vivos.

Se han empleado varios métodos para mejorar la capacidad de adhesión celular en los hidrogeles, como incorporar dominios específicos de adhesión celular, (RGD, secuencia derivada de fibronectina), o factores de crecimiento que ayuden a las células a adherirse a los hidrogeles y proliferar.

Los ELR, debido a sus propiedades mecánicas, han permitido que sean usados en regeneración de tejido musculoesquelético, debido a su capacidad para brindar un soporte estructural, elasticidad y biocompatibilidad. Por estas espectaculares características ya antes mencionadas se han preparado

hidrogeles a través de la extensión de la cadena oxidativa de los ELR telequelicos que endurecen la red de proteínas, dando materiales hidratados duros, además se añadieron dos péptidos RGD adhesivos de células fusionados genéticamente cerca de los extremos N y C del ELR para mejorar su capacidad regenerativa.

También otros estudios han demostrado que hidrogeles bioactivos por entrecruzamiento químico, basados en ELR para reparación osteocondral que contenían dos secuencias de adhesión celular (RGD y REDV) y un dominio objetivo elastasa VGVAPG. Se incluyeron células estromales mesenquimales de conejo (rMSC) en el hidrogel y se aplicaron a una lesión osteocondral creada y se observó regeneración después de cuatro meses sin producción de colágeno tipo I que indica ausencia de fibrocartilago^[13].

Todos los tejidos con propiedades elásticas poseen elastina y sus propiedades están determinadas por la secuencia de aminoácidos VPGVG^[13]. Ejemplos de estos hidrogeles son los creados con fibroína de seda y elastina para el tratamiento de quemaduras e hidrogeles en la liberación de fármacos, como agentes antibacterianos durante el proceso de curación. Materiales como las esponjas de elastina de seda para curación de heridas se han ensamblados con polipéptidos con cuatro bloques similares a la seda (GAGAGS) y bloques similares a la elastina (GVGVP). Al probarse la solución de seda-elastina sobre heridas en cerdos y ratones diabéticos, las pruebas en células mostraron un aumento en la regeneración celular respecto al grupo de control, lo que le confiere una cualidad favorable para la regeneración en piel^[13].

1.6.2. Estructuras capa a capa de polímeros ELRs

Los ELRs pueden ser usadas para formar estructuras capa a capa, en los cuales se alternan polímeros distintos, para uso de recubrimiento de implantes que mejoran su biocompatibilidad y biofuncionalidad.

La tecnología capa a capa aprovecha la interacción carga-carga entre sustrato y monocapas de polielectrolitos para crear nanoestructuras de múltiples capas unidas por fuerzas electrostáticas. Estos sistemas se forman gracias a interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals^[14].

Por medio de esta técnica se busca obtener biomateriales sensibles a estímulos en los cuales se puedan modificar las superficies del material facilitando las interacciones con las células. Es posible construir recubrimientos biomiméticos que responden a los estímulos utilizando polímeros tipo elastina ya que estos polímeros proporcionan la capacidad de introducir secuencias bioactivas específicas y de ajustar sus propiedades fisicoquímicas.

1.6.3. Dosificación de fármacos en ELRs

Los ELRs pueden usarse como portadores de fármacos solubles para el tratamiento de enfermedades que necesiten la liberación progresiva, dosificada o controlada de un medicamento. Estas cualidades derivan de la forma en la que los biopolímeros interactúan con las superficies y mucosas del cuerpo humano, de su polaridad y de la forma en que estos ingresen al cuerpo ya que pueden presentarse como nanopartículas, microsferas, micelas, etc.^[15].

1.7. Laminina

La laminina es la glicoproteína estructural más abundante en la membrana basal, está constituida por tres subunidades polipeptídicas α , β , γ y también está asociada a otras proteínas como el colágeno, entactina, proteoglicanos y fibronectinas.

Su función principal es anclar las células epiteliales a la lámina densa de la membrana basal pues tiene sitios de unión para moléculas de integrinas de la membrana celular de la base celular.

Existen distintas cadenas de laminina que son $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \gamma 1, \gamma 2$, con 7 ensamblajes

- Lamina 1 ($\alpha 1, \beta 1, \gamma 1$) se expresa ubicuamente en epitelio y endotelio ^[19]
- Lamina 2 ($\alpha 2, \beta 1, \gamma 1$) se halla en musculo estriado y nervio periférico ^[19]
- Lamina 3 ($\alpha 1, \beta 2, \gamma 1$) se encuentra en sinapsis y glomérulo renal ^[19]
- Lamina 4 ($\alpha 2, \beta 2, \gamma 1$) en la unión miotendinosa y trofoblasto ^[19]
- Lamina 5 ($\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$) se encuentra en la zona de la lámina basal de epitelios especializados con funciones secretorias o protectoras, como la piel y las membranas mucosas ^[19]
- Lamina 6 ($\alpha 3, \beta 1, \gamma 1$) y la Lamina 7 ($\alpha 3, \beta 2, \gamma 1$), son las únicas isoformas de laminina caracterizadas hasta la fecha que se encuentran en los epitelios urinario y nasal y en la membrana basal del tracto gastrointestinal superior ^[20].

Las proteínas fabricadas en el interior de las células se forman con uno o más polipéptidos, los cuales son la unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces amida, estos enlaces amida son el resultado de la reacción del grupo carboxilo de un aminoácido más el grupo amino de otro aminoácido.

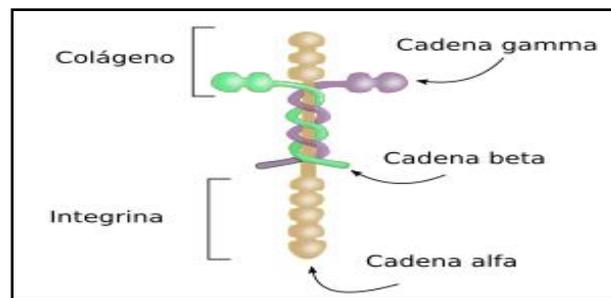


Ilustración 3 Esquema de una molécula de laminina. Formado por tres cadenas de aminoácidos unidas

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFM es la creación de nuevos hidrogeles inteligentes con polímeros ELR, mediante la inclusión de péptidos sintetizados en el laboratorio, característicos de los dominios de la laminina presente en la matriz extracelular (AASIKVAVSADR y PPFLMLLKGSTR), y que se injertan al hidrogel por el mecanismo “click”, para mejorar las propiedades de adhesión y proliferación celular.

Para lograr este objetivo nos hemos planteamos el siguiente plan de trabajo:

- Obtener polímeros VKV y SKS modificados químicamente con el grupo ciclooctino y el grupo azida, respectivamente, para ser usados en la creación de hidrogeles a través de la metodología Click.
- Sintetizar péptidos de secuencias AASIKVAVSADR (péptido 1) y PPFLMLLKGSTR (péptido 2) mediante la técnica SPPS para ser usados como nuevas inclusiones en hidrogeles ELR.
- Caracterizar el polímero VKV-cc modificado con péptidos, mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear de protón (H-RMN), espectrometría de masas (MALDI-ToF), microscopia electrónica de barrido (SEM), análisis de aminoácidos y análisis elemental para verificar la unión covalente de los péptidos a los polímeros ELR.
- Analizar las propiedades viscoelásticas de los nuevos hidrogeles (VKV-cc-pep/SKS-N₃) a partir de un análisis reológico, para observar cómo cambia su comportamiento ante estímulos de estrés mecánico.

- Estudiar la actividad metabólica de queratinocitos inmortalizados (HaCaT) en los nuevos hidrogeles VKV-cc-péptido-1/SKS-N₃ y VKV-cc-péptido-2/SKS-N₃, a través de un estudio *in vitro* para observar cómo las células evolucionan en un lapso de 14 días en hidrogeles con injertos peptídicos en comparación con hidrogeles que no los tienen.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos Químicos

Todos los reactivos usados en este trabajo se enumeran la Tabla 1.

Tabla 1 Reactivos químicos.

Reactivo	Símbolo Químico
Acetona	C ₃ H ₆ O
Piperidina	C ₅ H ₁₁ N
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Diétil Éter	(C ₂ H ₅) ₂ O
Etanol	EtOH
Dimetil Formamida	(DMF) C ₃ H ₇ NO
N -butanol	(BuOH)
Diclorometano	DMC
Ácido Tricloroacético	TFA

3.1.2. Medios de Cultivo

El medio utilizado para las células HaCat es el DMEM con 15% FBS y 1% Penicilina/Estreptomicina

3.1.3. Polímeros

3.1.3.1. Polímero VKV

El polímero VKV es un bioproducto resultante de la fermentación con el uso de la bacteria *Escherichia coli* modificada genéticamente con un peso molecular teórico de 60462 Da. Posee 24 lisinas en su estructura y su composición aminoacídica es: MESLLLP VP[(VPGVG)₅ VPGKG]₂₄. En esta cadena existen dominios elastómeros formado por la secuencia VPGVG y el dominio de entrecruzamiento formado por la secuencia VPGKG. Sus características fisicoquímicas dependen de la temperatura de transición (T_t) y su carga, que a su vez dependen del pH, en donde a un pH neutro y un pH ácido se protona el grupo amino libre de las lisinas y en pH básico el carboxilato se encuentra cargado negativamente ^[21].

3.1.3.2. Polímero SKS

El polímero SKS es un biopolímero que posee 24 lisinas y una cadena peptídica de secuencia (serina-lisina-serina) con un peso molecular teórico de 82487 Da. Posee la siguiente composición aminoacídica: MESLLP [(VPGVG VPGSG VPGVG VPGKG VPGVG VPGSG VPGVG)₂ VAVTGRGDSPASSGGGGSGGGGSGGGGS (VPGVG VPGSG VPGVG VPGKG VPGVG VPGSGVPGV-G)₂]₆-V.

3.1.3.3. Péptido AASIKVAVSADR

El oligopéptido AASIKVAVSADR es una secuencia peptídica que se encuentra en la membrana basal tipo laminina-1 que posee un peso molecular de 1358 mg/mmol. Recientemente se descubrió en muchos estudios que el péptido que contiene Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) forma fibrillas de tipo amiloide (AASIKVAVSADR, cadena α 1 de laminina de ratón 2097-2108).

La formación de fibrillas es fundamental para las actividades biológicas, como son la promoción de la adhesión celular y el crecimiento de neuritas. Esta construcción tiene potencial para servir como bioadhesivo y para la regeneración e ingeniería de tejidos.

También se ha demostrado que los péptidos sintéticos derivados de la cadena α 1 de laminina-1, AASIKVAVSADR (LAM-1) estimulan la secreción de una metaloproteinasa de matriz extracelular (MMPs) la cual es una enzima que regula las vías de señalización que controlan el crecimiento celular, la inflamación y la angiogénesis ^[22].

3.1.3.4. Péptido PPFLMLLKGSTR

El péptido PPFLMLLKGSTR es un oligopéptido cuyo peso molecular es de 1530 mg/mmol, se usa para la adhesión de queratinocitos a la membrana basal y es crucial en el dominio de la cadena globular de la laminina α 3 (LG3), para funciones de adhesión celular, propagación y unión de la integrina α 3 β 1. Estas integrinas formadas por polipéptidos son los receptores de membrana que conectan la superficie de las células con células cercanas, ayudan a conectar la proteína VCAM-1 la cual es la proteína de adhesión celular vascular con la matriz extracelular ^[23].

La adhesión de queratinocitos inducida por la proteína LG3 (segmento bisagra, formada mayoritariamente por dos cadenas peptídicas largas e iguales y dos cadenas peptídicas cortas e iguales, conectadas entre ellas por puentes disulfuro), y el péptido PPFLMLLKGSTR desencadena la señalización celular a través de la fosforilación de quinasa de adhesión focal (FAK) en los residuos de tirosina, siendo capaz de apoyar la adhesión y propagación celular dependiente de la integrina α 3 β 1 ^[24].

3.2. Métodos

3.2.1. Bioproducción de los ELRs

Los recombinaremos (ELRs) utilizados fueron el SKS y el VKV que fueron previamente sintetizados en el laboratorio del grupo de investigación BIOFORGE utilizando la tecnología de ADN recombinante y su posterior expresión en bacterias *Escherichia coli*. Por último, los polímeros se purifican mediante ciclos de segregación reversible termodependiente, se liofilizan y se conservan en frío hasta su uso.

3.2.2. Modificación Química de ELRs

En la actualidad la modificación química de polímeros ELR se dan gracias a reacciones sin catalizadores a través de la metodología click, las cuales son usadas para entrecruzar químicamente cadenas de ELRs. Para que sea posible un entrecruzamiento químico entre cadenas ELR, se deben introducir funcionalidades en las cadenas laterales de las lisinas que actúen como agentes de entrecruzamiento, el grupo SKS posee 24 lisinas y para que podamos garantizar que existirá una relación molar 1:1 entre el grupo azida y el grupo alquino se modifica el 75% de éstas, por lo cual 18 de sus lisinas son modificadas con el grupo azida (N_3). El polímero VKV posee 24 lisinas, de las cuales se modifica el 60 % de éstas, por lo cual 14 lisinas serán modificadas con el grupo ciclooctino.

La modificación química de los polímeros ELR se realizó en una campana de extracción de gases, usando dos balones de 250 ml en los cuales se introdujo los polímeros y una atmosfera de nitrógeno (N_2) para purgar el aire.

El SKS modificado se sintetizó añadiendo una solución de azida [2-azidoetilo(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato] en DMSO a una solución de SKS en DMSO, la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 h.

Así también para el VKV se preparó una disolución de ciclooctino [(1R, 8S,9S)- biciclo [6.1.0] non-4-in-9-ilmetil Nsuccinimidil carbonato] en DMF y se añadió, mediante una jeringa, a la disolución del polímero en DMF a temperatura ambiente.

La mezcla total se agita durante 48 horas a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo, se reparte el contenido de los matraces en 2 falcons bien etiquetados, llenándolos hasta un máximo de 1/4 de su capacidad, posteriormente añadimos éter dietílico en cada uno de ellos precipitando de este modo el polímero. Para verificar la correcta modificación de los polímeros con los grupos azida y ciclooctino se realizan pruebas mediante técnicas MALDI-TOF, FTIR, DSC y 1H-RMN.

3.2.3. Formación del hidrogel ELR mediante la metodología click

Las reacciones de tipo “click”, son reacciones sin catalizador, controladas y de alto rendimiento, que no generan subproductos nocivos. Además, pueden ser realizadas en una gran cantidad de disolventes orgánicos e inorgánicos^[17].

Para que se produzca la reacción tipo “click”, se requiere de un grupo azida que reaccione con un grupo alquinos como son los derivados de ciclooctino^[18].

Para la preparación de los hidrogeles VKV-cc-pep1/SKS- N_3 se prepararon soluciones de ELR-ciclooctino y ELR- azida en agua Mili-Q a bajas temperaturas (4 °C), a una concentración de 25 mg/mL y cumpliendo una relación molar 1:1 entre el grupo azida y el grupo alquino. Los Hidrogeles VKV-cc/SKS- N_3 , se obtuvieron mezclando estas dos soluciones a bajas temperaturas dentro de un molde de dimensiones adecuadas. Al cabo de 24 horas los geles se formaron completamente y pudieron ser retirados del molde.

3.2.4. Obtención de los péptidos de interés

Los péptidos se obtienen mediante un proceso conocido como síntesis peptídica en fase sólida (SPSS). Esta técnica permite sintetizar péptidos naturales difíciles de expresar en bacterias, incorporar aminoácidos no proteicos, modificar el esqueleto de péptidos y proteínas y sintetizar proteínas a partir del D-aminoácidos. La SPSS se diferencia de la síntesis en fase líquida en que evita la necesidad del aislamiento y purificación de los intermedios sintéticos, ya que se lleva a cabo por lavados exhaustivos del soporte sólido (TG) al que están anclados los intermediarios^[27]. Mediante esta técnica SPSS es posible eliminar el reactante excedente

y productos secundarios, también los reactivos pueden utilizarse en exceso sin problemas de separación posterior, por tanto, las reacciones pueden completarse, teniendo, por lo tanto, muchas ventajas frente a la síntesis en fase líquida.

Brevemente, pequeñas bolas sólidas, porosas pero insolubles, son tratadas con agentes de acoplamiento sobre las que se construyen las cadenas peptídicas. El péptido permanece unido covalentemente a la bola hasta que es desanclado por reactivos como el ácido trifluoroacético (TFA). El péptido queda así inmovilizado en la fase sólida y permanece retenido durante el proceso de filtrado, mientras que los reactivos de la fase líquida y los subproductos de la síntesis son eliminados. La SPPS sigue una pauta general de ciclos repetitivos de acoplamiento-lavado-desprotección-lavado. El extremo libre amino terminal de un péptido unido en una fase sólida se acopla a una única unidad aminoacídica N protegida. Esta unidad es entonces desprotegida, mostrando así un nuevo extremo amino al cual puede unirse otro aminoácido. Al contrario que en la síntesis proteica llevada a cabo por los ribosomas, la síntesis peptídica en fase sólida progresa desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal. Los N-terminos de los monómeros aminoacídicos son protegidos por grupos Fmoc y añadidos a una cadena aminoacídica desprotegida. Este método utiliza una base, normalmente la piperidina 20% en DMF para la eliminación del grupo Fmoc y que el grupo amino alfa quede expuesto y listo para reaccionar con un nuevo aminoácido activo.

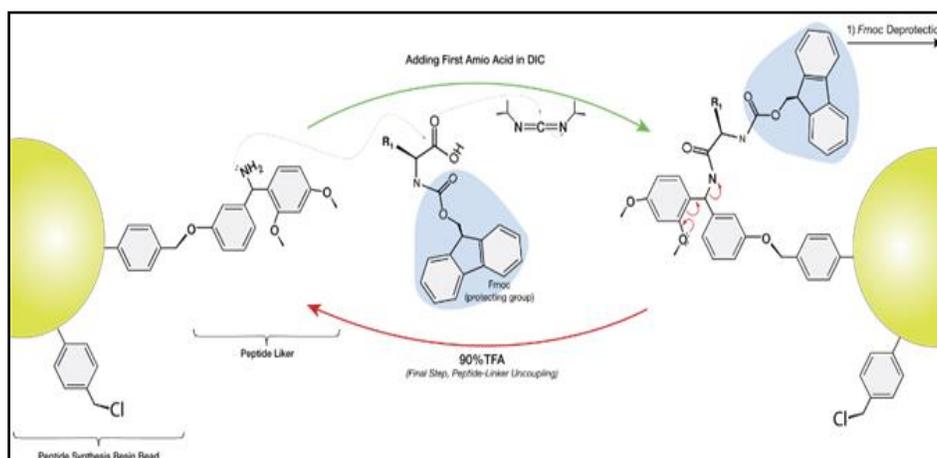


Ilustración 4 Síntesis de péptido en fase sólida

Las secuencias de péptidos que se ha elegido para este trabajo de investigación son la AASIKVAVSADR a la cual llamaremos péptido 1 y la secuencia PPFLMLLKGSTR a la cual llamaremos péptido 2. En la síntesis de estos dos péptidos al final de la cadena peptídica se introdujo el aminoácido lisina (K) el cual no afecta a la funcionalidad del péptido y gracias a que posee un grupo azida se produce la inserción del péptido al polímero modificado VKV-cc mediante la reacción click entre el grupo ciclooctino y el grupo azida que aporta K en la secuencia peptídica.

3.2.4.1. Síntesis del péptido

El orden de síntesis en el péptido va desde el último aminoácido de la cadena hasta el primero, ya que la resina tiene grupos NH₂ y para formar el enlace amida necesita el grupo C terminal. Se pesan 400 mg de C₃₂H₂₉NO₇ (TG) cuya masa molecular es 539.58 g/mol en una jeringa etiquetada correctamente con la secuencia del péptido. Se añaden 5 mL de DMF y se deja reaccionar durante 30 minutos en un agitador

orbital en la cual la solución de TG estará en contacto con el DMF. Durante este tiempo la resina empieza a aumentar su volumen llegando a duplicarlo de 1 ml a los 2.2 ml.

A continuación, se pesa el linker (Fmoc-RINK-Linker -Amida) el cual tendrá una concentración cuatro veces mayor a la de la resina y servirá como puente entre la resina y la secuencia de aminoácidos que formaran el péptido. El linker se disuelve en 2 ml de DMF.

El linker, así como los aminoácidos que utilizamos poseen un grupo protector Fmoc para evitar que los aminoácidos reaccionen por la parte N-terminal. Se utilizan los activadores, HBTU y de DIPEA, para que pueda darse la reacción de coupling activando el grupo carboxilo. Se añade 2 ml de HBTU (mw = 379.247 g/moles) preparado previamente y 139 μ m de DIPEA, la disolución se agita hasta que se disuelva en el agitador orbital. Esta disolución del linker o aminoácido se aspira a la jeringa que contiene la resina y se deja durante 30 minutos. Pasado este tiempo se retira la solución de la jeringa en un recipiente de desechos y se repite el proceso por segunda vez.

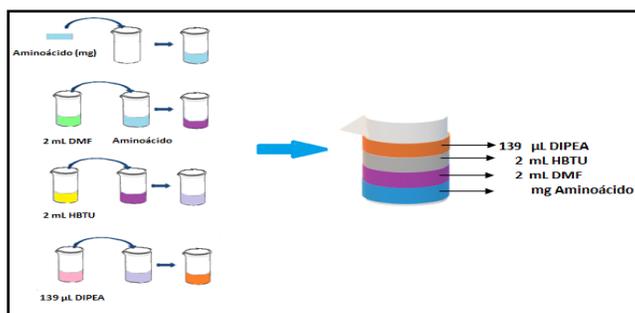


Ilustración 5 Orden de reacción para disolución de aminoácidos

Se toman 6 ml de DMF y se realiza un lavado agitando fuertemente y desechando los residuos en el recipiente de desechos (Este proceso se realizó 3 veces). Tanto en el linker como en los aminoácidos que utilizamos contienen el grupo protector Fmoc, que requiere de una desprotección para su posterior uso, para ello se utiliza una solución altamente alcalina de piperidina al 20% disuelta en DMF, durante periodo de 5 minutos. Se toman 4 ml de piperidina al 20% con la jeringuilla y se deja agitar durante 5 minutos (este proceso lo realizamos dos veces). A continuación, se realizan tres lavados con 4 ml de DMF para eliminar los restos de piperidina.

Este proceso descrito se repite de manera mecánica para cada aminoácido de la cadena peptídica. La concentración de aminoácidos utilizada es cuatro veces mayor a la de la resina, y el proceso de coupling se realiza dos veces para así asegurarnos de que unimos la secuencia correcta de aminoácidos y que no nos falte ninguno aumentando el rendimiento de la reacción.

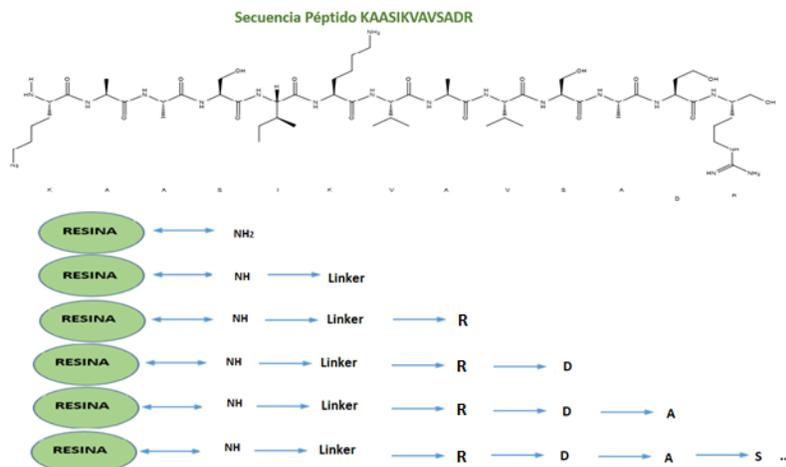


Ilustración 6 Esquema de síntesis de péptido. El linker (R-linker) se une a los aminoácidos empezando desde el último aminoácido hasta el primero.

Cuando terminamos la síntesis del péptido, este adquiere una tonalidad amarillenta y puede ser almacenado en un congelador hasta su liberación.

3.2.4.2. Proceso de lavado

El péptido tras ser desprotegido del último grupo Fmoc requiere de un proceso de lavado. Se utilizan 6 ml de DMC para eliminar los restos del DMF, luego se utilizan 6 ml de metanol para eliminar los restos de DMC y, por último, se usan 6 ml de diétil-éter para eliminar los restos de metanol y se dejan en el desecador toda la noche.

3.2.4.3. Proceso de liberación de péptido

El péptido está soportado en la resina, por lo tanto, se debe liberar para poder ser usado. Para este proceso de liberación se usa una solución de TFA (Ácido Trifluoroacético) al 95%. En un matraz de pera de 150 mL, se añade 1 ml de TFA para equilibrarlo, luego se añaden 4 ml de la solución al 95% de TFA y con mucho cuidado se añaden 200 mg de péptido con resina. Se espera durante un tiempo de 3 horas, para que el ácido ataque a la resina y se realice la liberación del péptido formándose dos fases diferenciadas.

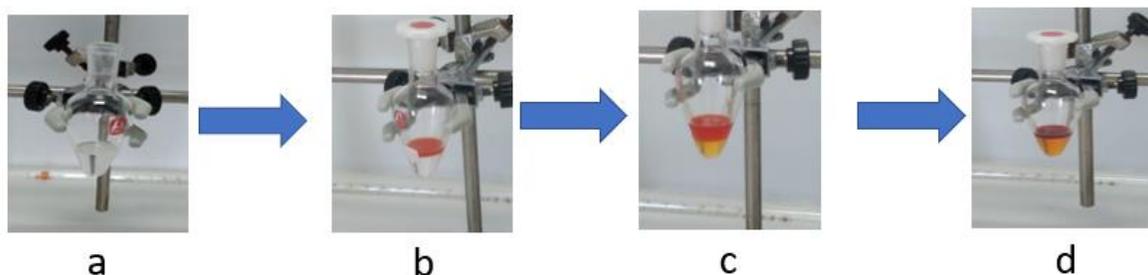


Ilustración 7 Proceso de liberación del Péptido. a) Equilibramos el matraz de pera con 1 mL de TFA y añadimos 4 mL de la solución de TFA al 95% b) Añadimos la cantidad de péptido con la resina c) El TFA

ataca la resina llevándolo a una tonalidad rojiza d) separación del péptido de la resina al cabo de 3 horas formándose dos fases.

3.2.4.4. Proceso de filtrado

El péptido terminado se obtuvo eliminando el soporte sólido utilizado para soportar la reacción, mediante un proceso de filtrado final, en el cual se prepara una pipeta Pasteur de vidrio la cual se rellena con lana de vidrio en su interior para que retenga la resina desprendida del péptido y un Falcon con 12 ml de Éter frío en el que el péptido filtrado precipite.

El péptido precipitado en el Falcon se centrifuga durante 10 minutos, a 10000 rpm y a 4 °C. Se retira el sobrenadante y el pellet se lava con acetona tres veces para asegurarnos de quitar los restos de TFA. Finalmente, el péptido liberado se seca en el desecador toda la noche.

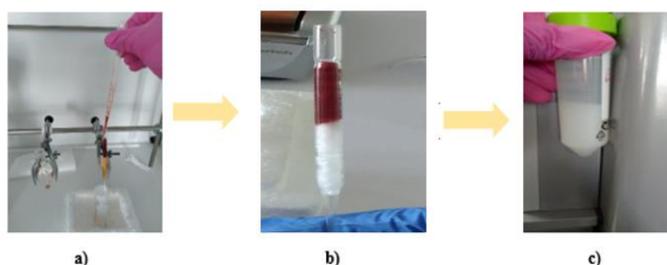


Ilustración 8 Filtrado del Péptido. a) Filtrado de la resina en la pipeta Pasteur con lana de vidrio, b) Resina retenida por la fibra de vidrio, c) Péptido Precipitado en Éter.

3.2.5. Formación de Hidrogeles con los péptidos de interés

3.2.5.1. Optimización de la masa de VKV y SKS

El polímero VKV posee 24 lisinas, de las cuales se han modificado 12 lisinas (50%) con el ciclooctino. Estos ciclooctinos van a usarse para dos uniones: por un lado, se utilizarán para introducir los péptidos sintetizado (que incluyen en su parte final un grupo azida) y, por otro lado, se necesitan para la formación de hidrogeles al reaccionar con el polímero SKS- N₃ (VKV-cc-péptido/SKS-N₃). En este caso en particular, se van a introducir cantidades crecientes de péptidos (2, 4 y 6 péptidos) para obtener diferentes hidrogeles con diferentes concentraciones de péptidos.

Tabla 2 Nomenclatura a usarse para lisinas modificadas con péptidos

Número de lisinas Modificadas (*) en VKV por péptido.	Nomenclatura
2 lisinas modificadas	Pepx2
4 lisinas modificadas	Pepx4
6 lisinas modificadas	Pepx6

Para la formación de estos nuevos hidrogeles se tiene en cuenta el número de ciclooctinos usados para la introducción de los péptidos, ya que el número de ciclooctinos debe estar en una proporción 1:1 con el número azidas para que se produzca el entrecruzamiento mediante la reacción click. Por lo tanto, hay que reajustar la masa de cada polímero VKV-cc y SKS-N₃, para conseguir esta condición 1:1.

Se modificó el 50 % de las lisinas del polímero VKV con el grupo ciclooctino y el 60% de las lisinas del SKS con el grupo azida. En el polímero VKV para las 12 lisinas modificadas con el grupo ciclooctino, 2 de éstos son usados para unirse el péptido, el cual tiene como aminoácido terminal una lisina con un grupo azida, necesario para realizar la reacción click con el grupo ciclooctino del VKV-cc y unirse covalentemente a él.

En la tabla 3 se presenta una lista de las lisinas disponibles y las lisinas modificadas (*) de los polímeros ELR, necesarias para la reacción click.

Tabla 3 Lista de lisinas Modificadas y Lisinas disponibles.

Lista de lisinas* disponibles para reacción click			
Polímero	Sin Modificar	Modificadas (disponibles)	Usadas por el péptido
VKV	24 lisinas	--	--
VKV-cc	12 lisinas	12 <i>lisinas*</i> (ciclooctino)	--
SKS	24 lisinas	--	--
SKS-N ₃	7 lisinas	17 <i>lisinas*</i> (azidas)	--
VKV-cc-pep 1x2	12 <i>lisinas*</i>	10 <i>lisinas*</i> (ciclooctino)	2 <i>lisinas*</i>
VKV-cc- pep1x4	12 <i>lisinas*</i>	8 <i>lisinas*</i> (ciclooctino)	4 <i>lisinas*</i>
VKV-cc-pep 1x6	12 <i>lisinas*</i>	6 <i>lisinas*</i> (ciclooctino)	6 <i>lisinas*</i>
VKV-cc-pep 2x2	7 <i>lisinas*</i>	15 <i>lisinas*</i> (ciclooctino)	2 <i>lisinas*</i>
VKV-cc- pep 2x4	7 <i>lisinas*</i>	13 <i>lisinas*</i> (ciclooctino)	4 <i>lisinas*</i>
VKV-cc- pep 2x6	7 <i>lisinas*</i>	11 <i>lisinas*</i> (ciclooctino)	6 <i>lisinas*</i>

Se calcula la masa del polímero disponible para realizar la reacción “click” entre los ciclooctinos del VKV-cc-péptido y las azidas del SKS-N₃, utilizando un sistema de ecuaciones simple donde “m” es la masa del polímero VKV-cc-péptido disponible para reaccionar con el grupo azida del polímero SKS-N₃.

Se obtiene la masa del polímero VKV-cc -pepx2, mediante un sistema de ecuaciones, siendo el mismo mecanismo para el polímero VKV-cc-pepx4 y el VKV-cc-pepx6.

VKV-cc-pepx2 → Disponible 10 lisinas* (m)
 SKS - N₃ → Disponibles 17 lisinas* (100-m)

$$VKV \rightarrow \left(\frac{m}{60438 \frac{mg}{mmol}} \right) * 10 \text{ lisinas}^* = x \text{ lisinas cc}$$

$$SKS \rightarrow \left(\frac{100 - m}{82486 \frac{mg}{mmol}} \right) * 17 \text{ lisinas}^* = x \text{ lisinas } N_3$$

$$x \text{ lisinas cc} = x \text{ lisinas } N_3$$

$$\left(\frac{m}{60438 \frac{mg}{mmol}} \right) * 10 \text{ lisinas} = \left(\frac{100 - m}{82486 \frac{mg}{mmol}} \right) * 17 \text{ lisinas}$$

$$10m = \left(\frac{17 * 60438 \frac{mg}{mmol}}{82486 \frac{mg}{mmol}} \right) (100 - m)$$

$$22.45m = 1245$$

$$m = 55.45 \text{ mg VKV - cc - 2pep}$$

$$(100 - m) = 44.55 \text{ mg SKS-N}_3$$

Comprobamos la relación 1:1 de los Polimeros VKV-cc y SKS- N₃

VKV-cc → Disponible 12 lisinas*

SKS - N₃ → Disponibles 17 lisinas*

$$\text{Para Hidrogeles de 100 mg} \begin{cases} 50 \text{ mg VKV - cc} \rightarrow \frac{50 \text{ mg}}{60438 \frac{mg}{mmol}} = 8.27 \times 10^{-4} \text{ mmol} * 12 \text{ lisinas}^* \\ 50 \text{ mg SKS - N}_3 \rightarrow \frac{50 \text{ mg}}{82486 \frac{mg}{mmol}} = 6.06 \times 10^{-4} \text{ mmol} * 17 \text{ lisinas}^* \end{cases}$$

$$50 \text{ mg VKV - cc} \rightarrow 9.93 \times 10^{-3} \text{ mmol cc}$$

$$50 \text{ mg SKS - N}_3 \rightarrow 10.3 \times 10^{-3} \text{ mmol } N_3$$

$$\frac{9.93 \times 10^{-3} \text{ mmol cc}}{10.3 \times 10^{-3} \text{ mmol } N_3} = 0.97 \approx 1$$

3.2.5.2. Obtención de Hidrogeles con péptidos.

Se realizan 7 hidrogeles con el péptido 1 y el péptido 2, respectivamente, para primero, comprobar si se forma el nuevo hidrogel y después, usar en pruebas de caracterización y pruebas *in vitro*, con un volumen de 200 μL cada gel y a una concentración de 25 $\frac{mg}{ml}$. En la sección Anexos (a) se muestra una la tabla con la masa de polímero VKV-cc, péptido 1 y péptido 2 y el volumen ocupado para la creación de 7 hidrogeles de 200 μL .

VKV-cc-Pep1x2

Calculamos la masa de péptido 1 a utilizar para la modificación de las lisinas del polímero VKV-cc para los 7 hidrogeles.

$$7 * 100 \mu L = 700 \mu L$$

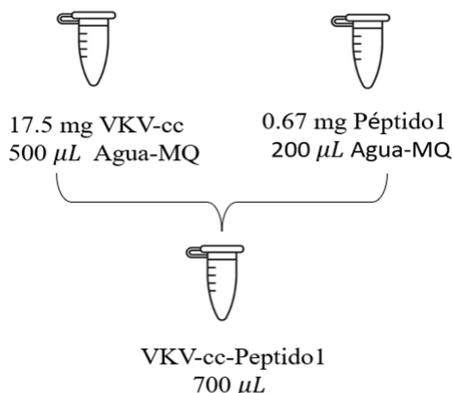
$$25 \frac{mg}{ml} * 0.7 ml = 17.5 mg VKV - cc$$

$$17.5 mg VKV - cc \left(\frac{1 mmol}{60463 \frac{mg}{mmol}} \right) = 2.48^{-4} mmol VKV - cc$$

$$2.48^{-4} mmol VKV - cc * 2 equiv péptido = 4.96^{-4} mmol VKV - cc$$

$$4.96^{-4} mmol VKV - cc * 1358 \frac{mg}{mmol} = 0.67 mg Péptido1$$

Se usa 500 μL de agua Mili-Q para disolver los 17.5 mg del polímero VKV-cc y 200 μL de agua Mili-Q para disolver 0,67 mg del péptido 1 y se dejan reaccionar durante una noche. El polímero VKV-cc-péptido 2 se disuelve en DMF debido a su imposible disolución en agua Mili-Q.



Como ya tenemos el VKV-cc-péptido en disolución hay que calcular el volumen que se necesita para realizar la reacción click con el polímero SKS- N_3 en una relación 1:1 entre los ciclooctinos del VKV y las azidas del SKS. Para ello primero tenemos que conocer su relación en masa.

En este caso particular de VKV-cc-Pep1x2:

$$\frac{55.45 mg}{44.55 mg} = 1.24 veces$$

Es decir, se añade 1.24 veces más de VKV-cc que de SKS- N_3 .

En hidrogeles con una concentración de 25 $\frac{mg}{ml}$, sabemos que en 1 ml hay 25 mg de polímero.

$$25 \frac{mg}{ml} \left\{ \begin{array}{l} 25mg ml * 1.242.24ml = 13.84 mg VKV-cc-péptido \\ 25mg ml * 1.24ml = 11.16 mg SKS-N3 \end{array} \right.$$

Para hidrogeles de 200 μL , como el volumen es 5 veces menor, la masa requerida para cada hidrogel también es 5 veces menor

$$5mg \left\{ \begin{array}{l} \frac{13.84}{5} = 2.77 mg VKV - cc - péptido \\ \frac{11.16}{5} = 2.23 mg SKS - N_3 \end{array} \right.$$

Por lo tanto, el volumen se calcula de la siguiente manera:

VKV-cc-peptidox2

$$V * C = 2.77 \text{ mg}$$

$$V * 25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 2.77 \text{ mg}$$

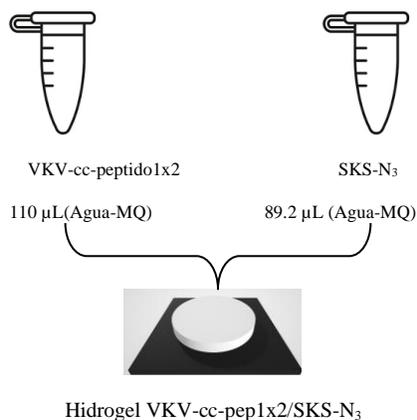
$$V = 0.110 \text{ mL}$$

SKS-N₃

$$V * C = 2.23 \text{ mg}$$

$$V * 25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 2.23 \text{ mg}$$

$$V = 0.89 \text{ mL}$$



3.3. Caracterización físico-química de los nuevos hidrogeles SKS-VKV con péptidos.

3.3.1. Análisis Químico Elemental (AQE)

El análisis elemental es una técnica de caracterización, en la cual se analiza el contenido total de átomos que forman un compuesto orgánico de forma rápida y simultánea. Entre los más comunes que podemos encontrar en esta técnica tenemos al carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, halógenos (cloro, bromo, yodo, flúor) y el fósforo. Gracias a esta técnica de caracterización se puede determinar la composición química y confirmar la fórmula empírica de un compuesto orgánico. A través del análisis elemental podemos evaluar la pureza y la composición química de los compuestos y puede usarse en muestras de tipo sólidas, líquidas, volátiles y viscosas. Es ampliamente usada tanto en investigación, como en control de calidad químico en la industria.

Brevemente, este método de análisis consiste en la combustión de las muestras con oxígeno puro a una temperatura de 1000 °C. Los diferentes productos de combustión, H₂O, N₂ y CO₂, se miden mediante cromatografía de gases. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla ^[30].

3.3.2. Análisis de Aminoácidos (HPLC)

El análisis de Aminoácidos es una técnica de caracterización que es utilizada para calcular la concentración de proteínas, determinar el coeficiente de extinción, calcular los aminoácidos totales incluyendo (cisteína, triptófano e hidroxiprolina) y aminoácidos libres (asparagina y glutamina).

Esto es posible gracias un sistema de cromatografía iónica de fase estacionaria con una columna de intercambio catiónico, que retiene las moléculas cargadas positivamente. La fase acuosa está compuesta por un tampón acuoso de ácido con un pH que aumenta gradualmente a lo largo del análisis, en el cual, al iniciar el análisis, todos los aminoácidos tienen carga positiva debido a la protonación del grupo amino y son retenidos por la columna de intercambio catiónico, a medida que aumenta el pH, los aminoácidos alcanzan una carga neutra o punto isoeléctrico a distintos pH^[31].

Por último, se lleva a cabo una derivatización postcolumna (bomba con control de temperatura y soporte para los recipientes) a 135°C con el uso de reactivos los cuales pueden reaccionar selectivamente con los aminoácidos dando lugar a compuestos que pueden ser detectados a longitudes de onda específicas, dando espectros característicos de cada aminoácido en la cual el área del pico cromatográfico es proporcional a su concentración.

Se utilizó 1 mg de la masa del polímero modificado VKV-cc-pep1 a diferentes concentraciones del péptido (pep1x2, pep1x4 y pep1 x6), así como también se utilizó 1 mg del polímero VKV-cc-pep2 a diferentes concentraciones del péptido (pep2x2, pep2x4, pep2x6).

Se hidrolizaron las muestras VKV-cc-pep/SKS/N₃ con un microondas en medio ácido (HCl 6N) y atmósfera inerte, se eliminó el medio ácido con corriente de N₂ llevado a sequedad. Posteriormente se re-disolvió en HCl (0.1N) y se filtró a través de una membrana de nylon de 0.22µm.

Se utilizó un detector Ultravioleta, con una columna Zorbax Eclipse AAA C18 de dimensiones 1.6 x150 mm, se usó como diluyentes 40mM de NaH₂PO₄ a un pH de 7,8 y AcN:MetOH:milliQ (45:45:10), con un flujo de 2ml/min.

3.3.3. Resonancia Magnética Nuclear de protón (H-RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una potente herramienta para estudios estructurales, mediante la cual podemos analizar los núcleos de cualquier átomo con número atómico o masa atómica impar, ya que estos átomos son magnéticamente activos (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F y ³¹P).

En este caso en particular, se utiliza RMN de protón. Un protón en el átomo de estas especies químicas gira con carga positiva respecto a su eje y genera un momento magnético, comportándose como un imán. Si se aplica un campo magnético externo el protón empieza a precesar en resonancia con la frecuencia del campo externo disponiéndose de forma paralela o antiparalela al campo.

Cuando se detiene el campo magnético externo, los vectores regresan a su estado de relajación liberando energía la cual es captada por los detectores^[32].

La prueba de RMN se realizó con 2 mg del polímero liofilizado VKV-cc que previamente reaccionó con el Péptido 1 a las concentraciones pepx2, pepx4 y pepx6. El polímero fue disuelto en 600 µL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) en un equipo de 400 MHz Agilent Technologies del laboratorio de Técnicas Instrumentales del Parque Tecnológico de la Universidad de Valladolid.

Una vez obtenido el espectro de señales de los protones se integran por bloques utilizando el programa MestReNova. De esta manera se confirma la estructura de los péptidos y el polímero modificado tanto con el ciclooctino o la azida como con las diferentes concentraciones de péptidos.

3.3.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido es una técnica que utiliza un haz de electrones para formar una imagen de alta resolución de la superficie de una muestra a través de las interacciones electrón-materia.

Los electrones son acelerados en una columna electrónica al vacío, desde 50 hasta 30000 voltios. Los estudios a voltajes pequeños son usados preferentemente para estudios de muestras biológicas debido a que

la irradiación con los electrones puede causar daños en la muestra. Los altos voltajes están asociados a resoluciones más nítidas y son usados para muestras metalizadas ya que no sufren daño al ser irradiadas con los electrones y se aprovecha la menor longitud de onda para una mejor resolución ^[33].

Los electrones acelerados se enfocan mediante lentes objetivos que enfocan el haz de electrones para así mejorar la resolución de las imágenes. Estos electrones al interactuar con la materia producen electrones secundarios (electrones que son desviados de su trayectoria inicial por colisiones inelásticas y dispersiones de electrones incidentes con electrones de la muestra, con energías menores a 50 eV), otros sufren efectos de frenado por la materia liberando fotones de frenado, también se van a producir electrones Auger, etc. Los detectores del SEM en su mayoría detectan los electrones secundarios, aunque también reciben información de los fotones de frenado ^[33].

Las condiciones para poder realizar un análisis de SEM son que el tubo electrónico debe estar en un alto vacío a presiones de al menos 5×10^{-5} Torr, un filamento de tungsteno (ya que este metal soporta altas temperaturas sin fundirse), las partículas de aire y polvo dentro de la columna pueden interferir con la trayectoria de los electrones y alterar la imagen por lo tanto para lograr que el vacío de la columna garantice la ausencia de estas partículas se instala un sistema de vacío que ayuda al equipo a generar condiciones óptimas ^[34].

La muestra que se usa en el análisis debe estar seca y ser conductora, para esto se usa el método de criofijación, la cual es una técnica de enfriamiento ultrarrápido de pequeñas muestras a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C), estas muestras se sumergen en nitrógeno líquido para que se congelen rápidamente y así evitar se formen cristales de hielo en la estructura de la muestra y mantener intacta la estructura del hidrogel. Después la muestra es metalizada con un material que lo haga conductor para poder ser vista en el microscopio.

En nuestro estudio se utilizó un equipo SEM QUANTA 200 FEG, que posee un cañón de emisión de campo con filamento Schottky de Wolframio, con voltajes desde 0.2 a 30 kV y con el medio de alto vacío ($< 6 \times 10^{-4}$ Pa [4×10^{-6} Torr]), con detectores de electrones retrodispersados BSED. Para la metalización de la muestra se usó un equipo EMITECH K575X con un target de oro que gracias a una diferencia de potencial desprenderán los átomos que recubrirán a la muestra en 5 ciclos de 15 segundos, aplicando un total de 4 nm de oro.

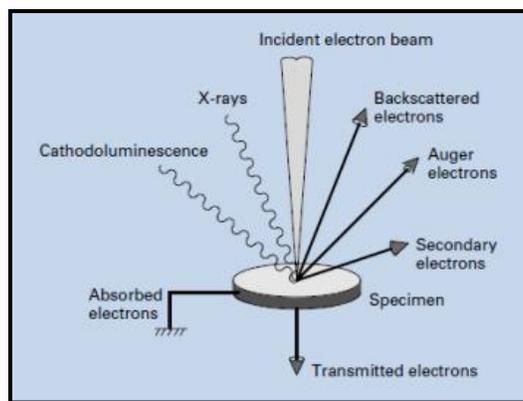


Ilustración 9 Emisión de varios electrones y ondas electromagnéticas desde un analito.

3.3.5. Espectrometría de masas (MALDI-ToF)

La espectrometría de masas (MALDI-ToF) es una técnica usada para la identificación de microorganismos, bacterias, y moléculas como proteínas, péptidos, entre otros. En moléculas tan grandes como péptidos se

utiliza una tecnología de ionización suave llamada MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) y TOF (Time of Flight) el cual es un analizador que se acopla al MALDI, para determinar la masa en una región de alto vacío.

Es una tecnología asistida por matriz por lo cual nuestra muestra debe encontrarse en ella, el péptido debe ser co-cristalizado en la matriz la cual está compuesta por moléculas π conjugadas como el CHCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico) y el DHV (ácido géntísico) o SA (ácido sinpínico), las cuales absorben longitudes de onda en el espectro UV ^[35].

Durante la realización de esta técnica se usa una placa metálica con una matriz y la muestra de por medio, esta será irradiada con un láser con una longitud de onda de 337 nm, lo que provoca que el analito se expulse con parte de la matriz pasando de un estado sólido a un estado gaseoso (desorción), la matriz juega un papel importante ya que aporta con protones a la muestra que la ionizan. Estas partículas están cargadas y pueden ser conducidas y aceleradas a través de una guía que ejerce un campo magnético fuerte que desvía los iones con carga, la fuerza de desviación dependerá de la masa de la partícula, lo que nos da un espectro que registra los isotopos en cada punto, y dependiente de la velocidad y la posición en que la partícula incida en el detector nos dará un espectro característico.

El equipo que se usó fue el Bruker Autoflex, PE biosystems Voyager-DE Instrument equipado con lases de nitrógeno de 337 nm en el laboratorio de Técnicas Instrumentales del Parque Tecnológico de la Universidad de Valladolid.

Se determina el peso molecular del polímero por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization). Así, como la modificación del polímero SKS con azidas y el polímero VKV, tanto con el ciclooctino, como con las diferentes concentraciones de péptidos. Las muestras fueron preparadas a 1 mg/ml en DMSO. El porcentaje de sustitución se calculó por diferencia de pesos moleculares entre los espectros de los polímeros puros y sus modificaciones.

3.4. Caracterización de la viscoelasticidad por Reología

La reología estudia como los materiales fluyen y se deforman cuando están sujetos a fuerzas externas y gracias a este estudio podemos determinar por qué un material no fluye, su capacidad de adherencia, su velocidad de gelificación, su capacidad de sedimentarse y la fragilidad del material.

El estudio se realiza con un reómetro el cual es un equipo que permite someter a un material a diferentes tipos de deformaciones controladas (strain) y medir los esfuerzos del material.

El equipo de reológica realiza pruebas de oscilación que aportan información sobre las propiedades viscoelásticas de los materiales, estas propiedades viscoelásticas son el módulo elástico G' , módulo Viscoso G'' y la tangente del ángulo de fase (δ), respecto a las variables de tiempo, frecuencia, temperatura y deformación del material ^[24].

El módulo elástico (G') nos da información sobre la componente elástica de los materiales y nos muestra que tan propenso es un material para recuperar su forma original bajo tensiones. Su unidad de medida viene en pascales (Pa).

El módulo viscoso (G'') nos indica la capacidad que posee un material para disipar la energía. Estas pérdidas de energía se observan como calor por la vibración de las moléculas. De igual manera el ángulo de fase (δ), nos aporta información sobre el amortiguamiento de un material ($\tan\delta = \frac{G''}{G'}$).

Si el ángulo de fase es 0° tendremos una respuesta puramente elástica, si es de 90° tendremos una respuesta de un material puramente viscoso y si el ángulo de fase se encuentra entre $0^\circ < \delta < 90^\circ$, tendremos un material con respuesta viscoelástica ^[25].

3.4.1. Barrido de Strain (Strain sweep test)

La medida de barrido de deformación (strain) se realiza para identificar la región lineal viscoelástica del material, esta medida a una frecuencia y temperatura constante. Este ensayo sirve para medir el rango de deformación en el que se puede definir la región viscoelástica lineal (LVR) de un material.

La región LVR muestra las posiciones en las que el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida se mantienen constantes, indicando su independencia de la amplitud de deformación a la que la muestra es sometida. La prueba de strain sweep test mantiene G' y G'' a una frecuencia constante mientras aumenta el porcentaje de tensión.

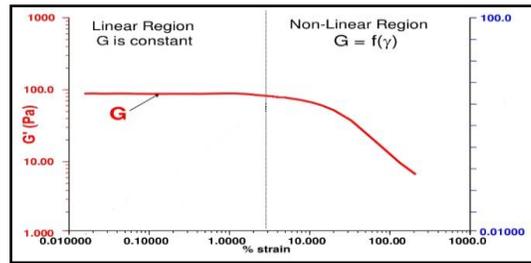


Ilustración 10 Ejemplo de Medida de Barrido Strain

Los parámetros de la prueba de Strain sweep step se establecieron en una amplitud de deformación entre 0.01 -1000% con aumento logarítmico, una frecuencia de 1 Hz y una temperatura de 37 °C.

3.4.2. Barrido de Frecuencia

El barrido de frecuencia nos permite definir el comportamiento viscoelástico del material, la elasticidad, la fuerza del gel y las propiedades del módulo a altas y bajas frecuencias.

En este estudio la frecuencia no se mantiene constante, pero si su temperatura y su amplitud la cual la escogemos previamente del estudio Strain sweep step dentro del rango lineal del LVR.

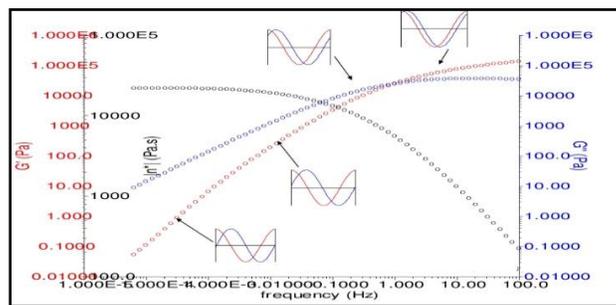


Ilustración 11 Ejemplo de Medida de Barrido de Frecuencia

El rango de Frecuencia que se usa es de 0.1 rad/s a 100 rad/s y para soluciones de baja viscosidad de 0.1 rad/s a 10 rad/s pero los datos podrían no verse bien, es importante seleccionar un % strain el cual lo obtenemos del barrido de deformación (strain sweep).

El instrumento que se utilizó para las pruebas reológicas fue un Reómetro TA Instruments, modelo ARES-G2, con una geometría de 12 mm y una fuerza normal positiva de 0.001 N. Además, los espectros resultantes fueron obtenidos con ayuda del software “Rheology ADVANTAGE SOFTWARE versión ≤ 4.1”.

El propósito de estudiar reología de geles químicos es determinar las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles VKV-cc-peptido/SKS-N₃ a una concentración de 25 mg/ml y una temperatura de 37 °C para observar la variación en las propiedades mecánicas en función de la inclusión de los péptidos en su estructura.

3.5. Estudio de la actividad metabólica de células HaCat en los nuevos hidrogeles VKV-cc-peptido/SKS-N₃

Se quiere estudiar cómo es la proliferación y la actividad metabólica de las células sobre estos nuevos hidrogeles. Las células utilizadas para este ensayo son queratinocitos inmortalizados humanos (HaCaT). Sobre cada hidrogel se siembran 5000 células y se añade medio DMEN con 15% FBS y 1% Penicilina/Estreptomicina. Estas células son incubadas a 37°C con 10% de CO₂ en atmósfera húmeda y los tiempos de experimento son 1,3,7 y 14 días. El medio se cambia cada dos días.

Para determinar esta proliferación y la actividad metabólica se utiliza Alamar Blue que es una solución permeable a las células, no tóxico y de un color azul basada en resazurina. Es utilizado como indicador de viabilidad celular que detecta células metabólicamente activas y se utiliza para el análisis cuantitativo de la proliferación celular, en donde la resazurina es reducida por las células para dar resorufina, el cual es un compuesto de color rojo altamente fluorescente. La viabilidad celular se obtiene a través de un lector de placas basado en fluorescencia usando una excitación a 560 nm y una emisión a 590 nm. Se añaden 150 µl de la solución de alamar blue a cada pocillo con hidrogel y se incuba durante 4 horas en oscuridad. Posteriormente, se coge una alícuota de 50µl a una placa opaca y se mide la fluorescencia en el lector de placa. Al ser un método no destructivo, las células se pueden lavar con DPBS y se continúa la proliferación con el medio DMEN hasta el tiempo final de experimentación.

Para las pruebas in vitro se utilizó los hidrogeles VKV-cc-peptido1/SKS-N₃ y VKV-cc-peptido2/SKS-N₃ a una concentración de 25 mg/mL. Así como, hidrogeles VKV-cc /SKS-N₃ como controles con la misma concentración.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Formación del hidrogel con péptidos injertados

Gracias a los cálculos realizados en el apartado 3.2.11. se han obtenido hidrogeles del polímero VKV-cc-peptido/SKS-N₃, utilizando la metodología click entre los grupos ciclooctinos del polímero VKV y las azidas de los péptidos. Podemos comprobar visualmente la formación de estos hidrogeles como se muestran en la ilustración 12.

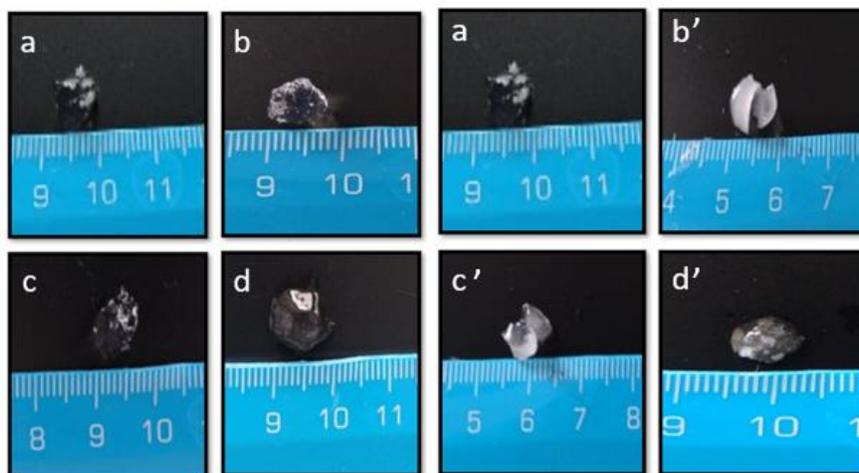


Ilustración 12 Imagen de prueba de gelificación de hidrogeles con una concentración de 25 mg/mL, (a) Hidrogel de control VKV-cc/SKS-N₃; Hidrogeles VKV-cc-pep1/SKS-N₃, (b) Péptido1 x2 (c) Péptido1 x4 (d) Péptido1 x6; Hidrogeles VKV-cc-pep2/SKS-N₃, (b') Péptido2 x2 (c') Péptido2 x4 (d') Péptido2 x6.

Gracias a la manipulación y a la observación fue posible catalogar la naturaleza semisólida que poseían los hidrogeles VKV-cc-pep1/SKS-N₃, a medida que aumenta el número de péptidos injertados en el polímero ELR éste aumenta su viscosidad, pero aún conserva sus propiedades estructurales como forma, maleabilidad y dureza, similares al gel de control (VKV-cc/SKS-N₃) de la ilustración 12 (a). Los polímeros ELR empleados en la reacción con el péptido 1 en los hidrogeles (b), (c), (d) fueron disueltos en agua-MQ obteniendo hidrogeles transparentes.

Así mismo, para los hidrogeles (b'), (c'), (d') fue posible evidenciar sus cualidades físicas mediante la observación y manipulación de los hidrogeles, mostrando que poseen un mayor grado de firmeza al momento de ser manipulados en relación con el gel de control (a). A medida que aumenta el número de péptidos injertados en el polímero ELR este aumenta su viscosidad, pero aún conserva sus propiedades estructurales como forma, maleabilidad y dureza. En este caso el hidrogel de control (VKV-cc/SKS-N₃) posee una consistencia más viscosa en relación a los hidrogeles (b'), (c'), (d').

Los polímeros ELR usados en la reacción click con el péptido 2 fueron disueltos en el disolvente orgánico DMF, lo que visualmente se reflejó en una tonalidad blanquecina opaca en contraste con los hidrogeles transparentes cuando se disuelven en agua Milli-Q.

Se observó que los hidrogeles que poseían péptidos injertados tenían una mejor capacidad de retención de agua, evidenciándose en que éstos se deshidrataban en un período de tiempo mayor que el hidrogel de control (a).

4.2. Análisis elemental

De los resultados del análisis elemental mostrados en el Anexo (e) realizados al péptido 1 y al péptido 2, podemos concluir que el peso molecular del péptido 1 es 1314 mg/mmol lo que coincide con su fórmula empírica C₅₆H₁₀₂N₁₈O₁₈, con una composición de C=50.25%, H=7.68%, N=18.84% y O=21.52% y para el péptido 2 la masa de la cadena peptídica es 1486 mg/mmol, del estudio se pudo establecer su fórmula empírica C₆₉H₁₁₈N₁₈O₁₆S₁, con una abundancia de C=55.66%, H=8.06% , N=16.93% O=17.19% y S= 2.15%.

4.3. Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos nos da la composición aminoacídica experimental de los péptidos sintetizados, valores que pueden ser comparados con la composición aminoacídica teórica para comprobar si la síntesis del péptido, así como su integración al polímero VKV se ha producido de manera efectiva. La tabla completa se visualiza en el Anexo b) y a continuación expresamos solo algunos de los aminoácidos específicos de los péptidos sintetizados para comprobar cómo se produce la inserción de las diferentes concentraciones de péptidos injertados en el polímero VKV-cc. Para el péptido 1 de secuencia aminoacídica AASIKVAVSADR tomamos como valores de referencia los aminoácidos característicos: Ácido Aspártico (D), Serina (S), Arginina (R), Isoleucina (I).

Tabla 4 Resultados del análisis de aminoácidos en el polímero VKV-cc-péptido 1

Péptido 1								
Nombre de la Muestra	Aminoácido D		Aminoácido S		Aminoácido R		Aminoácido I	
	Calculado	Teórico	Calculado	Teórico	Calculado	Teórico	Calculado	Teórico
Péptido 1 x2	3.24	2	5.86	5	2.53	2	1.76	2
Péptido 1 x4	4.17	4	7.19	9	3.71	4	2.75	4
Péptido 1 x6	6.14	6	9.47	13	5.11	6	3.70	6

A la vista de los resultados podemos concluir que los péptidos han entrado que en polimer VKV de secuencia aminoacídica

Del análisis de aminoácidos para el péptido 2 de secuencia aminoacídica PPFLMLLKGSTR tomamos como valores de referencia los aminoácidos característicos: Treonina (T), Serina (S), Fenilalanina (F), Arginina (R).

Tabla 5 Resultados del Análisis de aminoácidos en el polímero VKV-cc-péptido 2

Péptido 2								
Nombre de la Muestra	Aminoácido T		Aminoácido S		Aminoácido F		Aminoácido R	
	Calculado	Teórico	Calculado	Teórico	Calculado	Teórico	Calculado	Teórico
Péptido 2 x2	2.03	2	2.98	3	0.32	2	0.93	2
Péptido 2 x4	3.90	4	4.41	5	2.40	4	4.49	4
Péptido 2 x6	5.18	6	5.25	7	3.65	6	5.98	6

4.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Gracias a la técnica de resonancia magnética nuclear se ha podido comprobar que las modificaciones químicas de los polímeros SKS y VKV con las azidas y ciclooctinos, respectivamente, se han producido correctamente, pudiendo conocer de manera exacta el número de lisinas modificadas. Además, también se

puede comprobar cómo se produce la inserción de los distintos números de péptidos injertados en el polímero VKV-cc

Las señales aparecen distribuidas a lo largo de una escala de desplazamiento químico, la cual se mide en ppm. El análisis del espectro se toma como referencia la banda del DMSO que aparece en 2.5 ppm y se normaliza en función de los protones del CH₃ que aparecen a un desplazamiento cercano a 1 ppm, aquí comparamos los resultados del número de protones teórico y con el número de protones del valor experimental.

En la Ilustración 13 (a) se identifica el espectro de RMN del polímero VKV antes de la modificación química. El espectro de RMN (b) nos muestra los picos característicos que aparecen nuevos del ciclooctino tras la modificación química de 10 lisinas en el rango de 6.5 a 7 ppm.

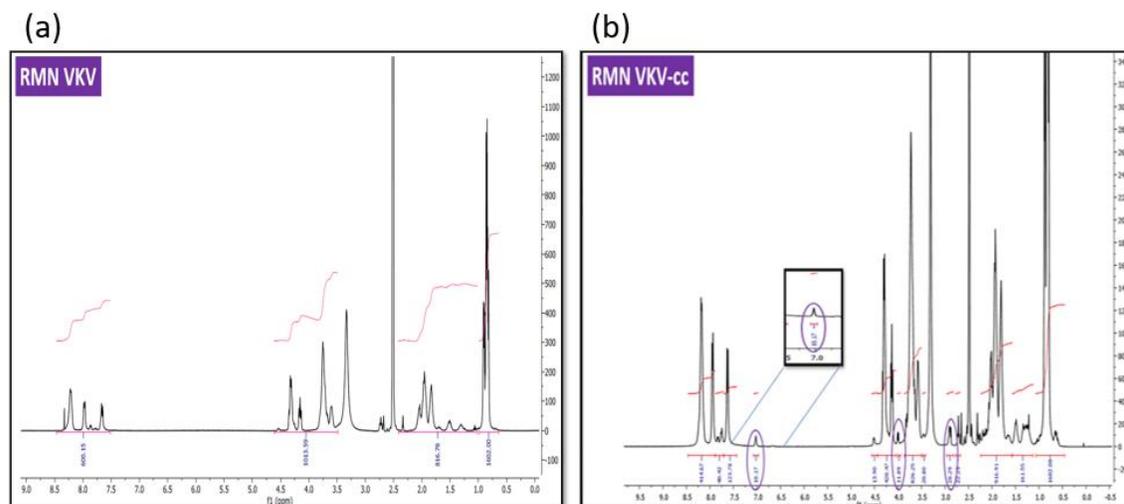


Ilustración 13 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del VKV y VKV-cc

En la Ilustración 14 (a) se identifica el espectro de RMN del polímero SKS antes de la modificación química. El espectro de RMN (b) nos muestra los picos característicos de los grupos azidas que aparecen nuevos tras la modificación química de 16 lisinas en el rango de 6.5 a 7 ppm.

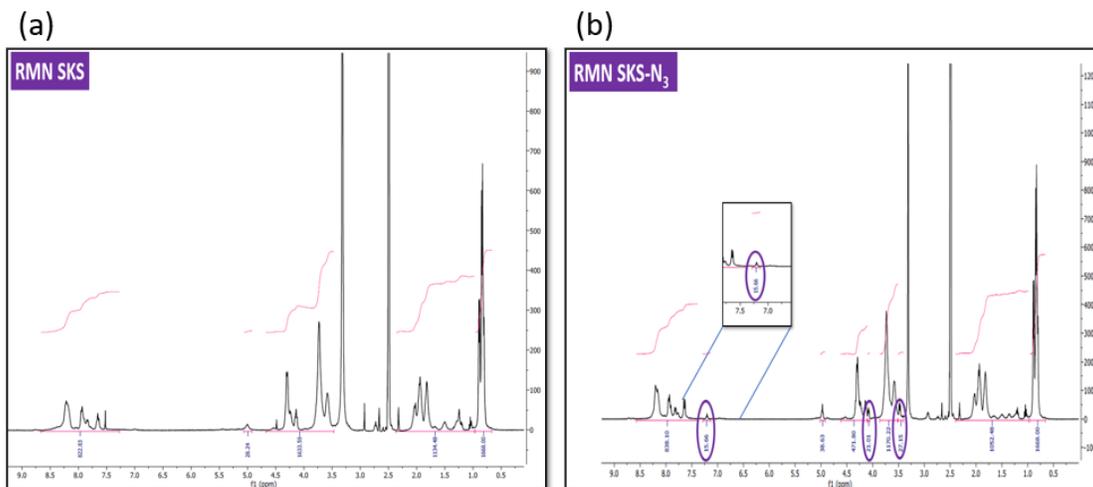


Ilustración 14 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del SKS y SKS-N₃

Para poder determinar el grado de modificación de VKV-cc con las diferentes concentraciones de péptidos hay que elegir una señal característica del péptido, para analizarla a lo largo de todos los espectros. En el péptido 1 nos fijamos en el aminoácido Arginina (R) y en el péptido 2 nos fijamos en el aminoácido Fenilalanina (F).

En la Ilustración 15 se muestra el espectro de RMN del péptido AASIKVAVSADR (péptido 1) y se muestran varias señales correspondientes a cada aminoácido de la cadena peptídica, la señal es producida por el núcleo del átomo del hidrógeno, que produce una absorción de radiación electromagnética que registra el equipo de RMN.

El desplazamiento al que aparece cada señal depende del entorno que tenga cada hidrogeno, en nuestro caso para el péptido 1 nos fijamos en el aminoácido R que nos aporta a la señal 3 hidrógenos desapantallados característicos en torno a 7.5-6.5 ppm. (Esto sucede cuando un átomo altamente electronegativo alejará los electrones de sus vecinos y el hidrógeno se verá desprotegido o “desapantallado”, necesitando un campo menor para alcanzar la resonancia).

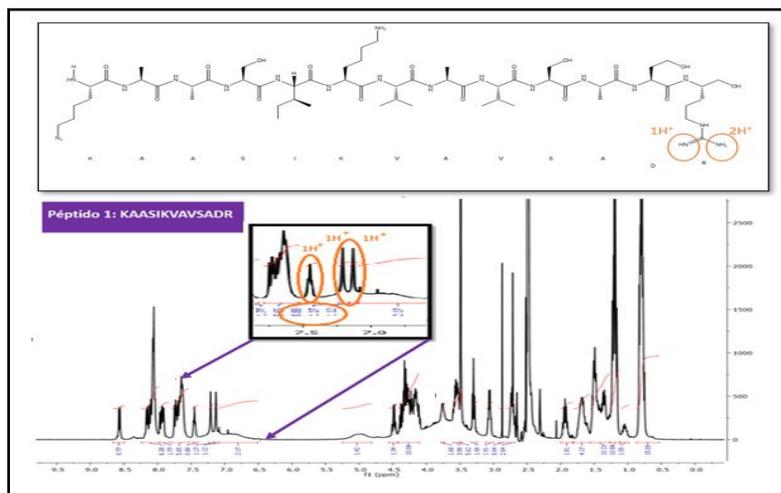


Ilustración 15 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Péptido KAASIKVAVSADR

A continuación, observamos los espectros de RMN para los polímeros VKV-cc-pep1 con diferente número de péptidos, así mismo buscaremos en la misma escala de desplazamiento las señales características del aminoácido R que identificamos en la ilustración 15, entre 6.5 ppm y 7.5 ppm.

En la ilustración 16, en el polímero VKV-cc-pep1x2 no es posible observar con claridad los protones de los hidrógenos desapantallados, debido a que al ajustar la línea base, ésta presenta mucho ruido el cual enmascara la señal pero debería aparecer una señal de 6 protones correspondientes al ingreso de 2 péptidos $((\text{NH}; \text{NH}_2) * 2 \text{ péptidos} = (1\text{H}^+) * 2\text{H}^+ + (2\text{H}^+) * (2\text{H}^+) = 6 \text{H}^+)$.

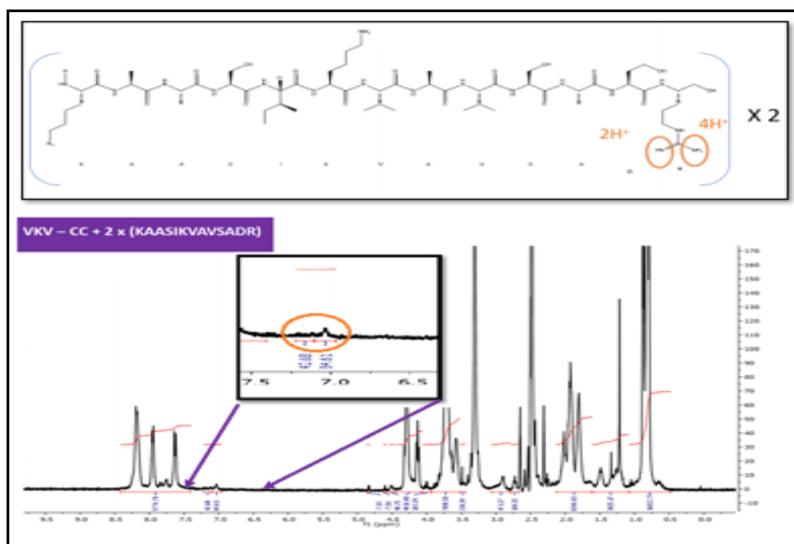


Ilustración 16 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Polímero VKV-cc-Pep1x2.

En la ilustración 17 se visualiza el espectro de RMN del polímero VKV-cc-pep1x4 en la cual buscamos una señal de 12 protones correspondientes al ingreso de 4 péptidos $((\text{NH}; \text{NH}_2) * 4 \text{ péptidos} = (1\text{H}^+) * (4\text{H}^+) + (2\text{H}^+) * (4\text{H}^+) = 12\text{H}^+)$. Se comprueba que esa señal si se observa en el espectro dividida en dos señales una de 4 protones (NH) y otra de 8 protones (NH₂).

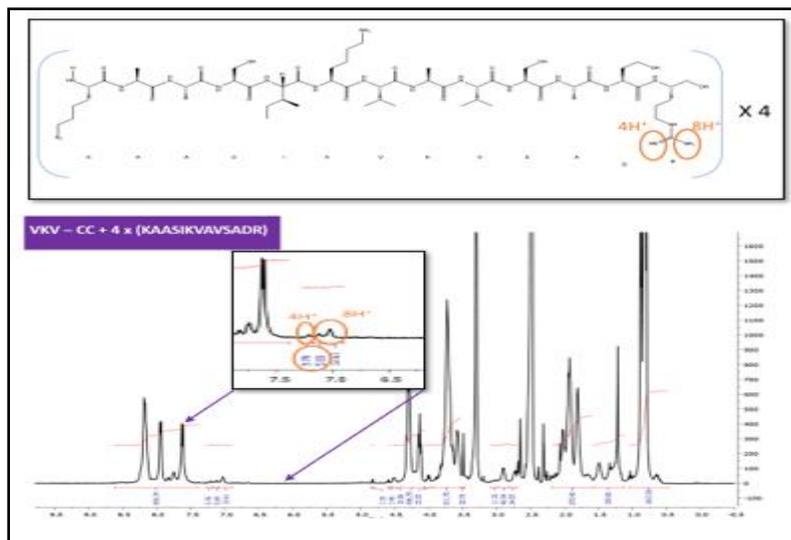


Ilustración 17 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Polímero VKV-cc-Pep1x4.

La ilustración 18 es el espectro de RMN del polímero VKV-cc-pep1x6 en el cual buscamos una señal de 18 protones correspondientes al ingreso de 6 péptidos $((\text{NH}; \text{NH}_2) * 6 \text{ péptidos} = (1\text{H}^+) * (6\text{H}^+) + (2\text{H}^+) * (6\text{H}^+) = 18\text{H}^+)$. Se comprueba que esa señal si se observa en el espectro dividida en tres señales de 6 protones cada una. De esta manera, junto con el estudio del resto de técnicas fisicoquímicas, podemos comprobar si los péptidos se han injertado correctamente en el polímero VKV-cc.

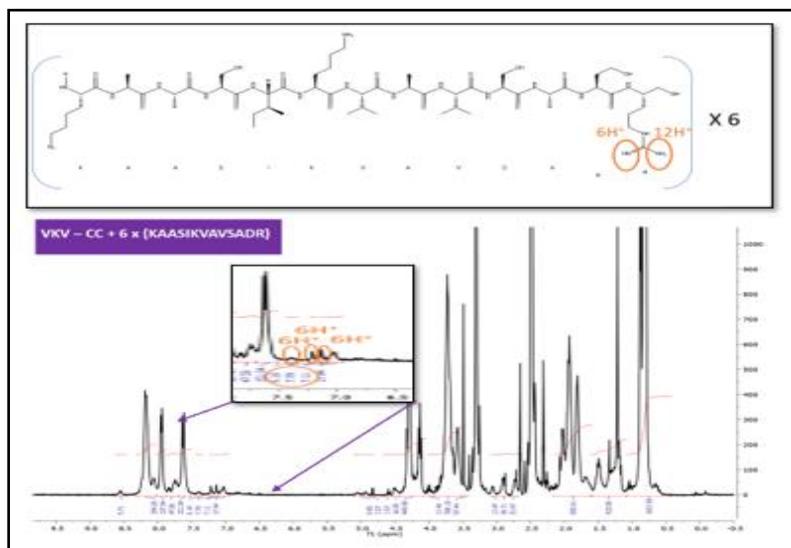


Ilustración 18 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Polímero VKV-cc-Pep1x6.

En la ilustración 19 observamos los espectros de RMN para la secuencia aminoacídica PPFLMLLKGSTR (péptido 2), en donde buscamos la señal característica de la Fenilalanina (aminoácido F) que se encuentra en torno a 6.5-7.5 ppm de desplazamiento químico, y el cual es característico de los compuestos aromáticos. De esta señal podemos deducir una señal de 5 protones (2 de estos protones están fuertemente ligados a la cadena carbonada).

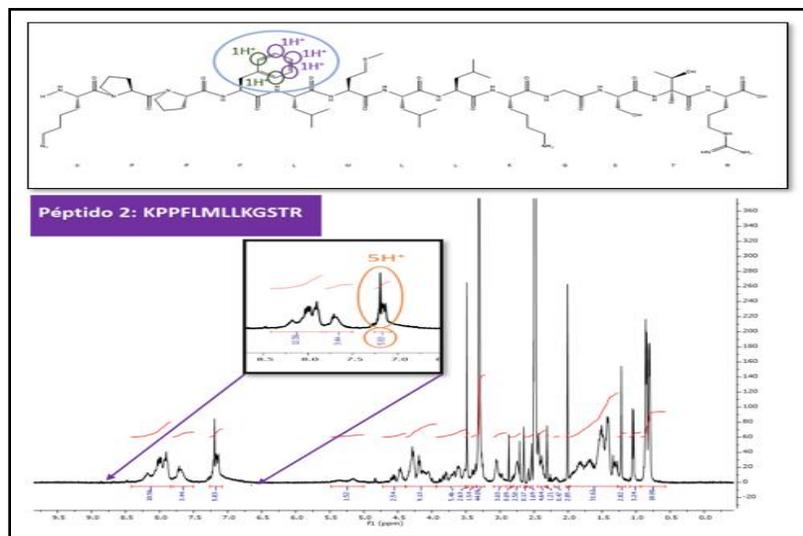


Ilustración 19 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Péptido PPFLMLLKSTR

A continuación observamos los espectros de RMN para los polímeros VKV-cc-pep2 con diferentes números de péptidos, en dónde buscaremos en la misma escala de desplazamiento químico al aminoácido F que identificamos entre 6.5 ppm y 7.5 ppm.

En la ilustración 20 incluimos 2 péptidos del péptido 2, y verificamos la señal de los protones del aminoácido F que se pueden dividir en dos tipos de señales: dos protones que estarán más cerca de la cadena carbonatada y tres protones que están más alejados y tienen menos influencia de ella. La primera señal es equivalente a los dos protones más cerca de la cadena carbonatada multiplicada por los 2 péptidos que se introducen en este caso, dándonos una primera señal que integra por 4 H (en verde en la ilustración 20). Para entender la segunda señal que corresponde a los tres protones más alejados de la cadena carbonatada hay que mirar el espectro de RMN del VKV modificado y se comprueba que en esa zona (en torno a 7 ppm) aparecen los 10 H de las lisinas modificadas con ciclooctino (es decir, ciclooctinos que se han introducido en la cadena). De esos 10 ciclooctinos vamos a utilizar dos para que reaccionen con las azidas de los péptidos e incluir 2 péptidos en la estructura VKV-cc, por lo tanto, de los 10 H de las lisinas modificadas totales (que aparecen en torno a 7.5 ppm) le restamos los 2 H usadas en la reacción de inserción de péptidos, teniendo como resultado 8 protones. Por lo tanto, a esta señal que ya nos aparece en el espectro del VKV-cc hay que añadirle los 3 protones característicos del péptido que estamos introduciendo en la modificación. Estos 3 protones de los átomos externos del compuesto aromático multiplicados por la inserción de 2 péptidos nos dan un valor de 6 H. Por lo tanto, si sumamos la señal de VKV-cc (8H) a la nueva señal del péptido (6H) nos da un total de 14 H⁺ (en morado en la ilustración 20) como se refleja en la señal a 7 ppm.

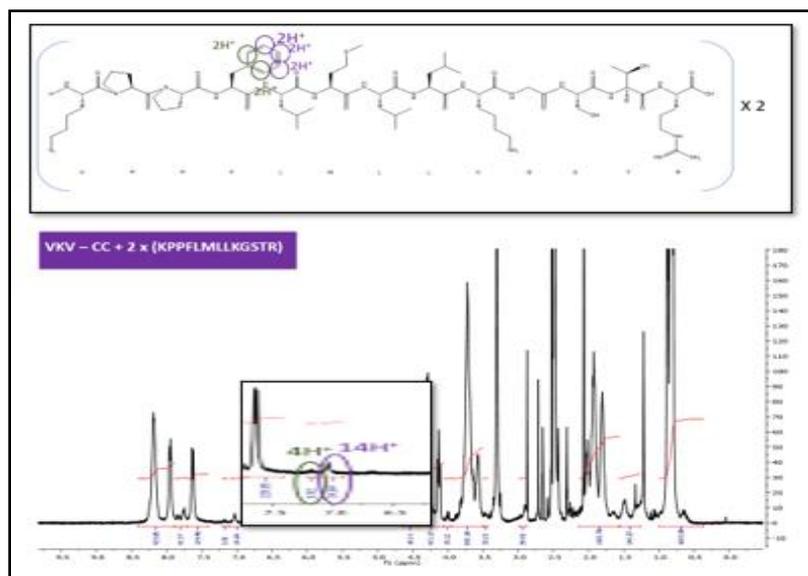


Ilustración 20 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Polímero VKV-cc-Pep2x2

En la ilustración 21, incluimos 4 péptidos del péptido 2, y verificamos la señal de los protones del aminoácido F, los cuales se pueden dividir en dos tipos de señales: dos protones que estarán más cerca de la cadena carbonatada y tres protones que están más alejados y tienen menos influencia de ella. La primera señal es equivalente a los dos protones más cercanos a la cadena carbonatada multiplicados por los 4 péptidos que se introducen en este caso, dándonos una señal que integra por $8H^+$ (en verde en la ilustración 21). Para entender la segunda señal correspondiente a los 18 protones más alejados de la cadena carbonatada miramos el espectro de RMN del VKV modificado y se comprueba que en esta zona (en torno a 7 ppm) aparecen $10 H^+$ de las lisinas modificadas con ciclooctino (ciclooctinos que se han introducido en la cadena). De esos 10 ciclooctinos usamos cuatro para la reacción con las azidas de los péptidos e incluir 4 péptidos en la estructura VKV-cc, por lo tanto, de los 10 H de las lisinas modificadas totales (que aparecen en torno a 7.5 ppm) le restamos 4 H usados en la reacción de péptidos, teniendo como resultado 6 protones. A esta señal le añadimos los 3 protones característicos del péptido que estamos introduciendo en la modificación. Estos 3 protones de los átomos externos del compuesto aromático multiplicados por la inserción de 4 péptidos nos dan un valor de 12 H. Por lo tanto, si sumamos la señal de VKV-cc (6H) a la nueva señal del péptido (12H), nos da un total de 18 H (en morado en la ilustración 21 como se observa en torno a los 7 ppm).

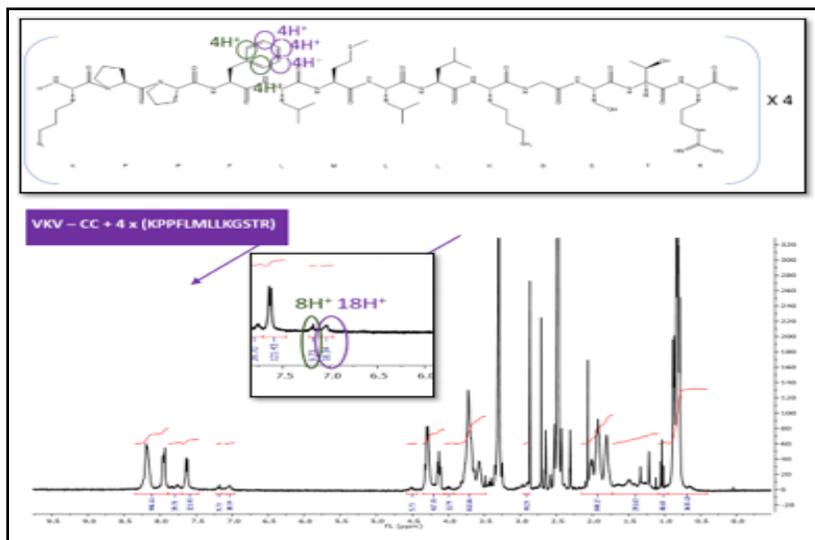


Ilustración 21 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Polímero VKV-cc-Pep2x4

En la ilustración 22, incluimos 6 péptidos del péptido 2, y verificamos la señal de los protones del aminoácido F, los cuales se pueden dividir en dos tipos de señales: dos protones que estarán más cerca de la cadena carbonatada y tres protones que estarán más alejados y tienen menos influencia de ella. La primera señal es equivalente a los dos protones más cercanos de la cadena carbonatada multiplicada por los 6 péptidos que se ingresan para este caso, esto se observa en la primera señal que integra 12 H (en verde en la ilustración 22). La segunda señal corresponde a los tres protones más alejados de la cadena carbonatada y hay que mirar el espectro de RMN del VKV modificado y se comprueba que en esa zona (en torno a 7 ppm) aparecen 10 H de las lisinas modificadas con ciclooctino (es decir, ciclooctinos que se han introducido en la cadena). De esos 10 ciclooctinos utilizaremos seis para que reaccionen con las azidas de los péptidos e incluir 6 péptidos en la estructura VKV-cc, por lo tanto de los 10 H de las lisinas modificadas (7.5 ppm) le restamos los 6 H usados en la reacción de inserción de péptidos, teniendo como resultado 4 protones. Por lo tanto, a esta señal que aparece en el espectro VKV-cc hay que añadirle los 3 protones característicos del péptido que estamos introduciendo en la modificación. Estos 3 protones de los átomos externos del compuesto aromático los multiplicamos por la inserción de 6 péptidos dándonos un valor de 18 H. por lo tanto sumamos la señal de VKV-cc (4H) a la nueva señal del péptido (18H) que nos da un total de 22 H+ (en la ilustración 22 resaltado en morado se observan 20 H, existiendo un pequeño desfase de 2 protones debido a que la integral es fijada manualmente y en ocasiones suelen omitirse pequeñas regiones en la integral o el ruido opaca la señal.).

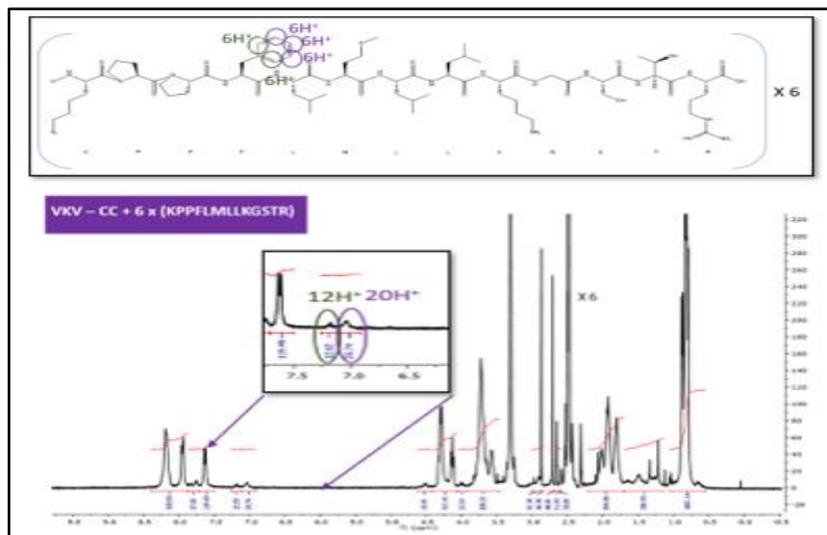


Ilustración 22 Resonancia Magnética Nuclear-Protón del Polímero VKV-cc-Pep2x6

4.5. MALDI-TOF

Se obtuvieron los espectros de masas de los polímeros VKV-cc, VKV-cc-Pep1x2, VKV-cc-Pep1x4, VKV-cc-Pep1x6, VKV-cc-Pep2x2, VKV-cc-Pep2x4, VKV-cc-Pep2x6, péptido1, y péptido2 para determinar con exactitud la masa molecular y así comprobar que se han introducido los péptidos en la cadena del VKV-cc. En el eje de las abscisas se representa los ratios m/z de los iones detectados, mientras que en eje de las ordenadas se representan las intensidades que reflejan la cantidad de iones de un determinado ratio m/z impactado contra el detector durante el análisis.

El primer ensayo se realizó con el polímero VKV para identificar los picos correspondientes a la masa del polímero y su posterior modificación química.

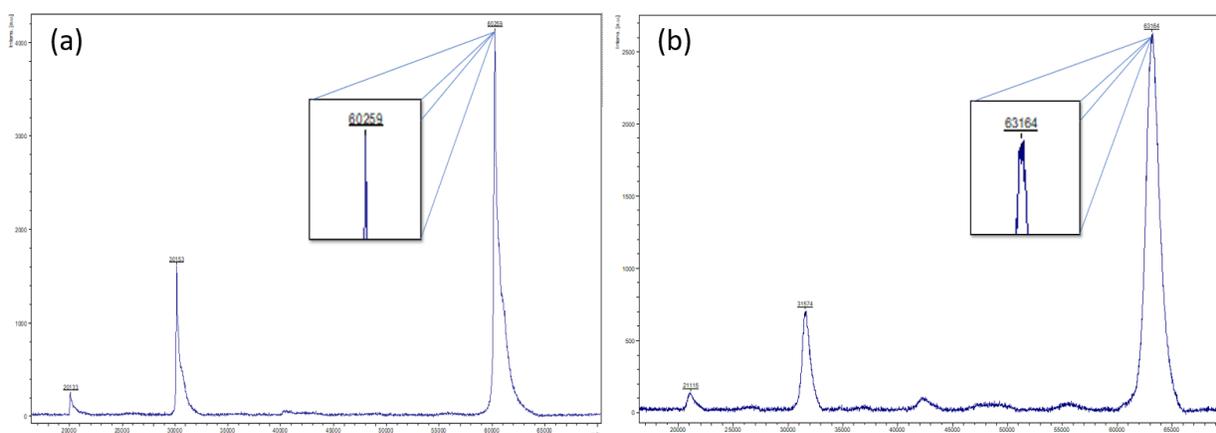


Ilustración 23 Maldi-Tof del Polímero VKV y del polímero VKV-cc

Gracias a la ionización del analito por la ablación del láser es posible observar en la ilustración 23 la primera ionización, la cual es la banda más estrecha y de mayor intensidad a la derecha en el rango de 60000 a 65000 m/z , tanto para (a) como para (b). En (a) podemos determinar que la masa del polímero VKV es de

60259 g/mol. En (b) observamos el VKV-cc, con un pico de intensidad de 63164, este aumento en la masa del polímero nos indica la adición de la masa del grupo ciclooctino. Como resultado podemos inferir cuantas lisinas fueron modificadas por el ciclooctino.

Si obtenemos la diferencia entre los dos picos obtendremos la masa del conjunto de ciclooctinos que reaccionará con las lisinas del polímero VKV

$$\Delta m = 63164 \text{ g/mol} - 60259 \text{ g/mol} = 2905 \text{ g/mol}$$

Como conocemos el valor de la masa de cada ciclooctino que es 176 g/mol es fácil determinar el número de lisinas modificadas (es decir, del número de ciclooctinos introducidos):

$$\Delta m = \frac{2905 \text{ g/mol}}{176 \text{ g/mol}} = 16 \text{ lisinas modificadas}^*$$

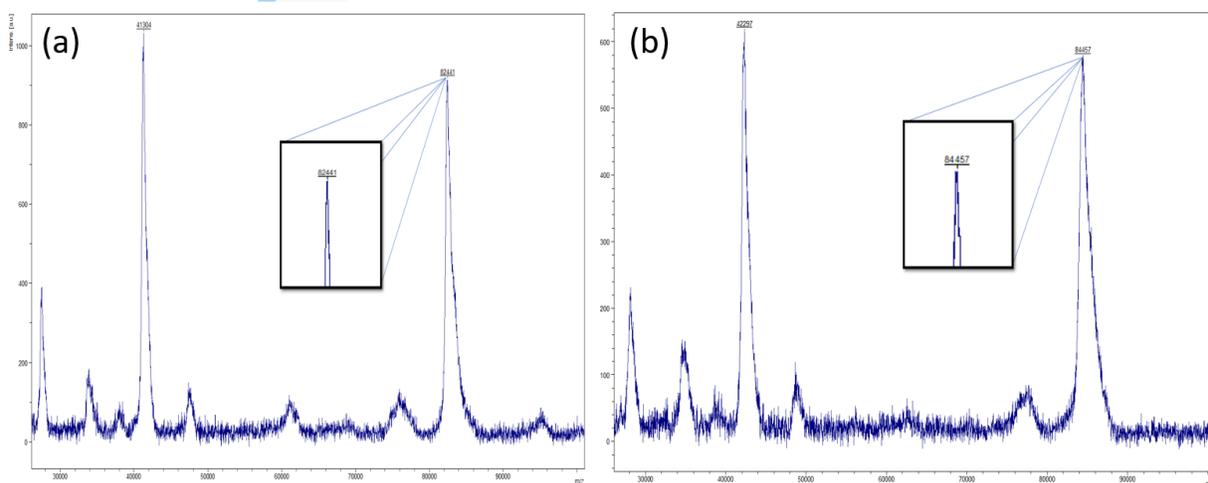


Ilustración 24 Maldi-Tof del Polímero SKS y del polímero SKS-N₃

En la ilustración 24 podemos observar la primera ionización que es la banda más estrecha y de mayor intensidad a la derecha en el rango de 82000 a 90000 m/z, tanto para (a) como para (b). En (a) podemos determinar que la masa del polímero SKS es de 82441 g/mol. En (b) observamos el SKS-cc, con un pico de intensidad de 84457, este aumento en la masa del polímero nos indica la adición de la masa del grupo azida. Como resultado podemos inferir cuantas lisinas fueron modificadas por las azidas.

Si obtenemos la diferencia entre los dos picos obtendremos la masa del conjunto de azidas que reaccionará con las lisinas del polímero SKS

$$\Delta m = 84457 \text{ g/mol} - 82441 \text{ g/mol} = 2016 \text{ g/mol}$$

Como conocemos el valor de la masa de cada azida que es 113 g/mol es fácil determinar el número de lisinas modificadas (es decir, del número de azidas introducidos):

$$\Delta m = \frac{2016 \text{ g/mol}}{113 \text{ g/mol}} = 17.8 \text{ lisinas modificadas}^*$$

En la Ilustración 25 observamos el espectro de masas de: (a) VKV, (b) VKV-cc, y VKV-cc-pep1 (para sus diferentes concentraciones) (c) pep1x2, (d) pep1x4, (e) pep1x6. Las bandas correspondientes a las primeras ionizaciones se encuentran en el rango de 60000-70000 m/z. Se comprueba que a medida que se incluyen más números de péptidos aumenta su masa molecular (es decir, la banda característica de la primera ionización se desplaza hacia la derecha en el eje de las abscisas). Observamos que en el espectro (c) hubo un desplazamiento de banda hacia la derecha (en relación a la banda anterior del VKV-cc) y se corroboró con el cálculo teórico que nos confirmó que se modificaron 2.05 lisinas, introduciéndose por tanto dos péptidos. En el espectro (d) no se observa un desplazamiento de banda hacia la derecha como se esperaría. De acuerdo con los cálculos teóricos realizados se verifica que solo se han modificado 2.08 lisinas de las 4 lisinas esperadas (introducción de 4 péptidos), indicando que solo se llevó a cabo el 52% de la reacción, además en el espectro (e) se modifican 4.52 lisinas de las 6 que se esperaban (introducción de 6 péptidos), representando el 75.33% de la reacción.

A continuación, se detallan los cálculos realizados para determinar el número de péptidos introducidos en la cadena VKV-cc.

Péptido 1x2

$$\Delta m = 65899 \text{ g/mol} - 63191 \text{ g/mol} = 2708 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = \frac{2708 \text{ g/mol}}{1315 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 2.05 \text{ lisinas modificadas}^*$$

Péptido 1x4

$$\Delta m = 65943 \text{ g/mol} - 63191 \text{ g/mol} = 2752 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = \frac{2752 \text{ g/mol}}{1315 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 2.08 \text{ lisinas modificadas}^*$$

Péptido 1x6

$$\Delta m = 69159 \text{ g/mol} - 63191 \text{ g/mol} = 5968 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = \frac{5968 \text{ g/mol}}{1315 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 4.52 \text{ lisinas modificadas}^*$$

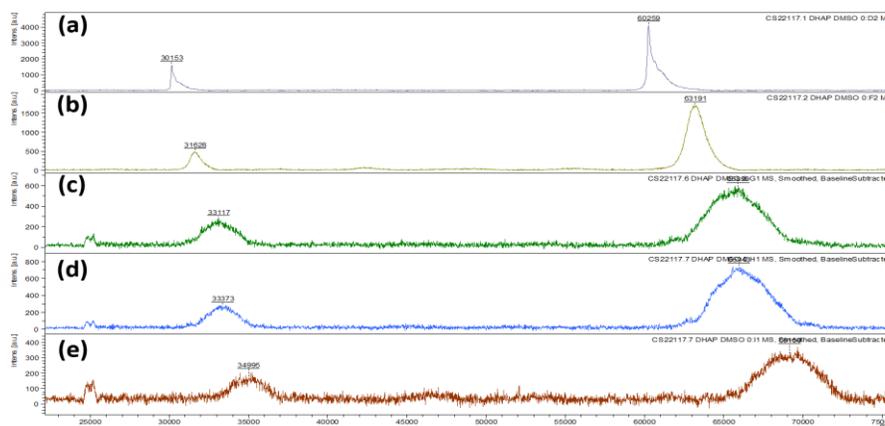


Ilustración 25 (a) VKV, (b)VKV-cc, (c)VKV-cc-pep1x2, (d)VKV-cc-pep1x4, (e)VKV-cc-pep1x6. Es posible observar cómo los espectros de masas aumentan en los pep1x2(d)VKV-cc-pep1x4(e)VKV-cc-pep1x6 en comparación al polímero VKV-cc

En la ilustración 26 observamos el espectro de masas de: (a) VKV,(b) VKV-cc y VKV-cc-pep2 para sus diferentes concentraciones (c) pep2x2, (d) pep2x4, (e) pep2x6). Estas bandas corresponden a las primeras

ionizaciones y se encuentran en el rango de 60000-73000 m/z. A medida que aumenta el número de inclusiones de péptidos en la estructura del polímero VKV-cc aumenta la masa molecular de este (es decir aumenta la banda característica de la primera ionización se desplaza hacia la derecha en el eje de las abscisas). Observamos que en el espectro (c) hubo un desplazamiento de la banda hacia la derecha (en relación a la banda anterior del VKV-cc) y se corroboró con los cálculos teóricos confirmando que se modificaron 0.83 lisinas, indicándonos que se llevó a cabo el 41.5% de la reacción. En el espectro (d) se observa un desplazamiento de la banda hacia la derecha pero muy cercano al valor esperado, y lo verificamos con los cálculos teóricos que se muestran que han modificado 3.43 lisinas, llevándose a cabo el 85.75% de la reacción.

En el espectro (e) es visiblemente notorio que la banda no se desplaza hacia la derecha en la magnitud que se espera se modifican 2.13 lisinas de las 6 que se esperaban (introducción de 6 péptidos), representando el 35.5% de la reacción.

A continuación, se detallan los cálculos realizados para determinar el número de péptidos introducidos en la cadena VKV-cc.

Péptido 2x2

$$\Delta m = 64464 \text{ g/mol} - 63191 \text{ g/mol} = 1273 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = \frac{1273 \text{ g/mol}}{1515 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0.83 \text{ lisinas modificadas*}$$

Péptido 2x4

$$\Delta m = 68381 \text{ g/mol} - 63191 \text{ g/mol} = 5190 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = \frac{5190 \text{ g/mol}}{1515 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 3.43 \text{ lisinas modificadas*}$$

Péptido 2x6

$$\Delta m = 66418 \text{ g/mol} - 63191 \text{ g/mol} = 3227 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = \frac{3227 \text{ g/mol}}{1515 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 2.13 \text{ lisinas modificadas*}$$

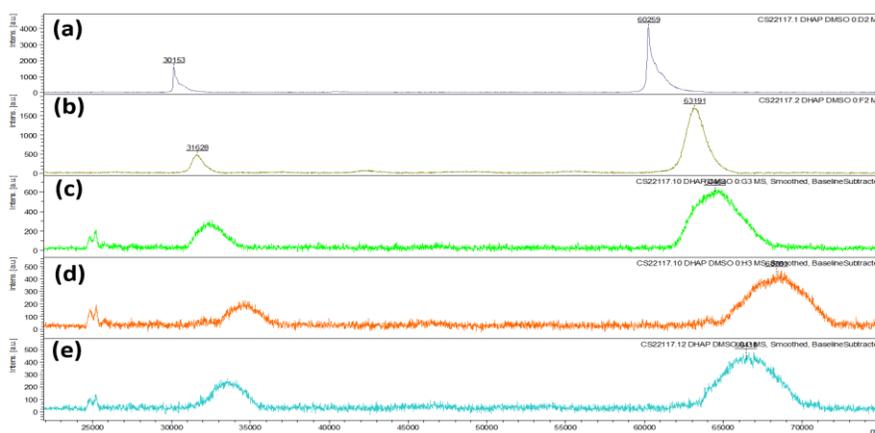


Ilustración 26 (a) VKV (b)VKV-cc (c)VKV-cc-pep2x2(d)VKV-cc-pep2x4(e)VKV-cc-pep2x6

4.6. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Los poros son estructuras importantes en los hidrogeles tipo elastina, ya que, permiten la migración celular, intercambio de desechos celulares, nutrientes y oxígeno, y de esta manera permiten simular de mejor manera las propiedades mecánicas de un tejido nativo objetivo. Estas características pueden ser observada gracias a la microscopia electrónica de barrido, dicha técnica nos permite obtener imágenes nítidas de las secciones transversales de los hidrogeles y estudiar como el tamaño de los poros está estrechamente relacionado con la adhesión y proliferación celular.

Las imágenes de microscopia electrónica de barrido de los hidrogeles VKV-cc-pep/SKS-N₃ se muestran en la ilustración 23. En la ilustración 27(a) se puede observar que el hidrogel de control VKV-cc/SKS-N₃ posee un gran número de estructuras porosas interconectada con diferentes tamaños de poro. En el hidrogel VKV-cc-pep1x2/SKS-N₃ de la Ilustración 27 (b) se ve una estructura porosa homogénea con poros internos más pequeños que interconectan el hidrogel proporcionando una ventaja notable en la proliferación celular, la ilustración 27 (c) muestra la imagen del hidrogel VKV-cc-pep1x4/SKS-N₃ de la cual no fue posible observar un gran número de poros posiblemente debido a la orientación en la que fue colocada la muestra para el estudio. En la ilustración 27 (d) el hidrogel VKV-cc-pep1x6/SKS-N₃ presenta una estructura porosa homogénea con poros cada vez más pequeños. Por lo que se puede concluir, que al aumentar el número de péptidos se forman poros más pequeños. En la ilustración 27 (b') es posible observar poros homogéneos bien delimitados, con microporos internos más pequeños, en la ilustración 27 (c') observamos poros uniformes de menor tamaño y en 27 (d') se visualiza estructuras laminares con pequeñas porosidades internas, estos poros disminuyen de tamaño a lo largo de la estructura.

Se observó que la geometría de los poros es predominantemente circular o elipsoidal y a medida que incrementamos la concentración de péptido en los hidrogeles, el tamaño de poro disminuye, al igual que las paredes del poro se hacen más delgadas, estos parámetros se midieron con ayuda del Software ImageJ y los resultados se incluyen en la tabla 6.

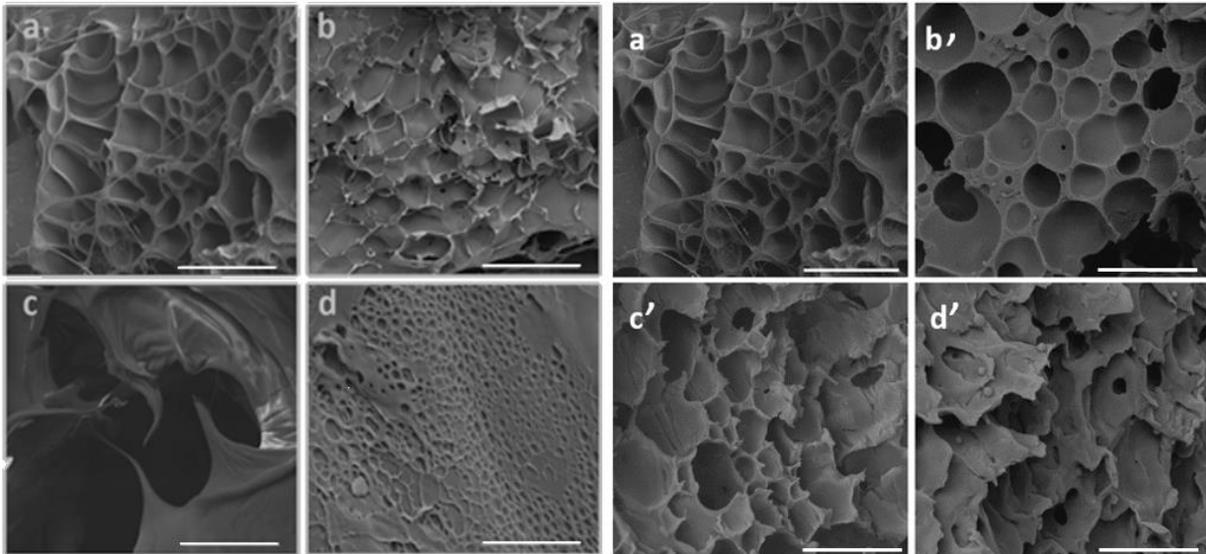


Ilustración 27 Micrografías SEM de Hidrogeles VKV-cc-pep a 37 °C para varias concentraciones de péptidos (a), VKV-cc/SKS-N₃, (b) VKV-cc-pep1x2/SKS-N₃ (c) VKV-cc-pep1x4/SKS-N₃ (d) VKV-cc-pep1x6/SKS-N₃, (b') VKV-cc-pep2x2/SKS-N₃ (c') VKV-cc-pep2x4/SKS-N₃ (d') VKV-cc-pep2x6/SKS-N₃. Barra de escala: (a)(c) 100 μ m (b)(b') (c')(d)(d') 50 μ m.

Se realizaron 10 mediciones en cada imagen en diferentes regiones. Éstas se promediaron para calcular los valores de media y desviación estándar $p < 0.05$ para realizar la comparación entre diferentes concentraciones de péptidos.

Tabla 6 Medidas de tamaño de poro para los hidrogeles VKV-cc-pep/NH₃

Hidrogeles VKV-cc-pep/NH ₃			
Hidrogel	Tamaño de Cavity Porosa (µm)	Tamaño de Poro interior (µm)	Espesor de la pared del poro (µm)
VKV-cc/SKS-N ₃	328.70	--	2.61
VKV-cc-pep1x2/SKS-N ₃	36.79	7.68	2.20
VKV-cc-pep1x4/SKS-N ₃	86.80	--	--
VKV-cc-pep1x6/SKS-N ₃	5.59	--	1.31
VKV-cc-pep2x2/SKS-N ₃	22.94	4.67	2.61
VKV-cc-pep2x4/SKS-N ₃	17.71	--	1.70
VKV-cc-pep2x6/SKS-N ₃	11.71	--	1.38

4.7. Reología

Las propiedades mecánicas del hidrogel se pueden determinar mediante mediciones reológicas. Los hidrogeles utilizados para estos experimentos tienen una concentración de 25mg/ml, y se trabaja con una temperatura de 37 °C, buscando asemejar la temperatura del cuerpo humano.

Se realizó un estudio *strain sweep* para encontrar el área LVR, de la cual tomamos el valor de 1 Hz porque se encuentra dentro del comportamiento lineal. Una vez seleccionado ese valor se realizan las medidas de *Frequency sweep*.

De esta manera, centrándonos en la frecuencia de 1 Hz, obtenemos los valores G' y $\tan \delta$ para las distintas concentraciones de péptidos en el hidrogel, que se representan en la tabla 7. El módulo de almacenamiento (G') disminuye a medida que aumenta la concentración del péptido, poniendo de manifiesto lo que se comprobó visualmente con anterioridad, que cuando mayor es la concentración del péptido más blando es el hidrogel obtenido.

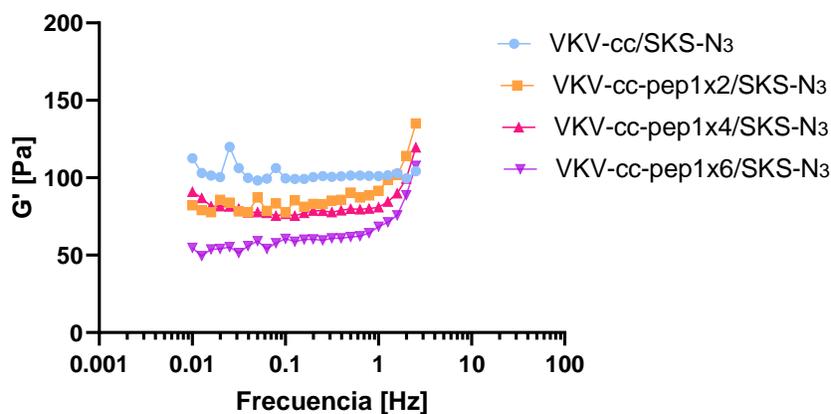


Ilustración 28 Dependencia de la frecuencia de los módulos de almacenamiento (G') para hidrogeles ELR a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabla 7 Módulos de Almacenamiento de los Hidrogeles ELR

Módulos de Almacenamiento de los Hidrogeles ELR		
Hidrogel	Módulo de Almacenamiento (G')	Tan δ
VKV-cc/SKS- N_3	101.026667	0.0362
VKV-cc-pep1x2/SKS- N_3	97.0133333	0.033583333
VKV-cc-pep1x4/SKS- N_3	81.4566667	0.038037
VKV-cc-pep1x6/SKS- N_3	59.8633333	0.047893333

De la ilustración 28 podemos observar que el módulo de almacenamiento aumenta a partir de frecuencias de 1 Hz y se observa un valor máximo en torno a los 2.5 Hz. Los ángulos de fase que se obtuvieron son muy bajos, característico de hidrogeles altamente elásticos que almacenan energía.

Se calculó el nivel de significancia entre cada uno de los geles con la prueba t test (non parametric tests), y entre todas las muestras experimentales con el modelo One-way ANOVA. El nivel de significancia nos indica que las propiedades mecánicas entre el hidrogel de referencia (VKV-cc-SKS- N_3) y el hidrogel con 2 péptidos son iguales. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de péptido (x4 y x6) si existen diferencias significativas con respecto al hidrogel de partida VKV-cc/SKS- N_3 cambiando sus propiedades mecánicas.

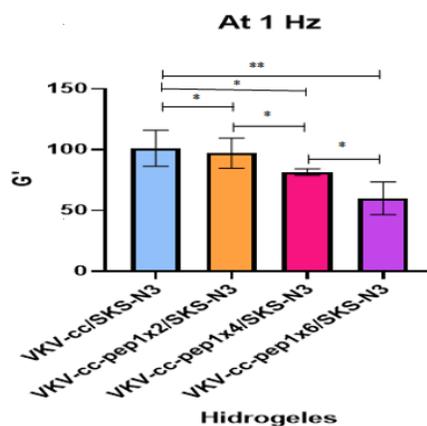


Ilustración 29 El modelo se estudia con un número de muestras igual a 3. Se establecieron las diferencias con un nivel de significancia para (*) $p > 0,05$; (**) $p < 0,05$

Hay que hacer notar que para los hidrogeles VKV-cc-pep2/SKS-N₃, no fue posible realizar las pruebas reológicas debido a que no se poseía la cantidad de péptido 2 requerido para crear cada hidrogel.

4.8. Células

Las pruebas *in vitro* se realizaron a 1, 3, 7 y 14 días en muestras por triplicado, tanto para los hidrogeles VKV-cc/SKS-N₃ (hidrogel de control), como para los hidrogeles modificados con los péptidos 1 y péptido 2.

Las células fueron sembradas un día anterior a comenzar los experimentos para medir la actividad metabólica. El día 1 se estudió el nivel de fluorescencia de las células HaCat en el TCP, en el hidrogel de control VKV-cc/SKS-N₃ y los hidrogeles modificados con el péptido 1 y el péptido 2. No se mostró cambios importantes a nivel de significancia entre el grupo de control y los hidrogeles modificados con péptidos.

El día 3 a través de un análisis en la fluorescencia para cada hidrogel, en el TCP, en el hidrogel de control VKV-cc/SKS-N₃ y los hidrogeles modificados con el péptido 1 y el péptido 2, nos mostró que no existe diferencias significativas entre el número de células presentes en los hidrogeles de control y los hidrogeles modificados con péptidos, no obstante si existen diferencias significativas entre el número de células sembradas en el medio TCP y las células sembradas en el hidrogel de control VKV-SKS-N₃, así como también existen diferencias significativas entre las células sembradas en hidrogel modificado con Pep1 x2 y las células en el medio TCP.

En el día 7 el análisis de fluorescencia en cada hidrogel nos mostró que no existe diferencias significativas entre en número de células de los hidrogeles del péptido 1 y entre los hidrogeles del péptido 2. En cambio, en el medio TCP se observa una mayor abundancia de células en relación de las sembradas en el hidrogel de control VKV-cc/SKS-N₃. Es posible observar que no existen diferencias significativas entre el número de células del hidrogel de control y el hidrogel VKV-cc-pep1x2/SKS-N₃, pero si una diferencia significativa entre las células de los hidrogeles que contienen el péptido 2.

En el día 14 el análisis de fluorescencia en cada hidrogel nos mostró que si existe diferencias significativas entre en número de células existentes en el hidrogel VKV-cc-pep1/SKS-N₃, por lo tanto, existe una mayor proliferación de células en el hidrogel VKV-cc-pep1x2. También se observa que la proliferación celular en el hidrogel de control VKV-cc/SKS-N₃ decae y es igual a los hidrogeles VKV-cc-pep2/SKS-N₃.

Observamos que los hidrogeles VKV-cc-pep1/SKS-N₃ en las que se modificaron 4 lisinas y 6 lisinas tienden a decaer el nivel de proliferación celular igualando a los hidrogeles VKV-cc-pep2/SKS-N₃ y al hidrogel de control, mientras que fue notorio en los hidrogeles VKV-cc-pep1x2/SKS-N₃ existe un aumento gradual en el número de células superando al hidrogel de control.

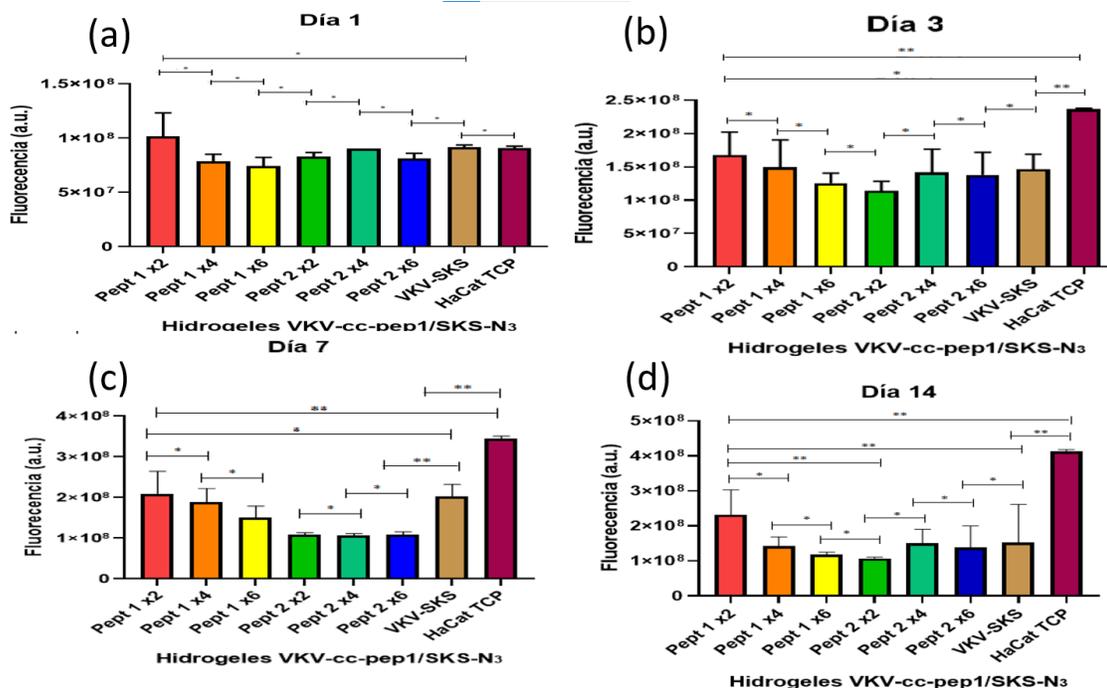


Ilustración 30 El modelo para cada hidrogel se estudia con un número de muestras igual a 3. Se establecieron las diferencias con un nivel de significancia para (*) $p > 0,05$; (**) $p < 0,05$; (a) Día 1 (b) Día 3, (c) Día 7, (d) Día 14, del estudio de células HaCat *in vitro*.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 8.0.1. Los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se aplicó la prueba de One way ANOVA y t-test para comparar los datos *in vitro* y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron $< 0,05$.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha realizado correctamente la Modificación Química de los biopolímeros VKV y SKS con el grupo ciclooctino y el con el grupo Azida, respectivamente, en los laboratorios del grupo de

investigación BIOFORGE, aplicando las normas y técnicas de laboratorio adecuadas para obtener la materia prima necesaria para la creación de los Hidrogeles con injertos de péptidos de la laminina por la metodología click.

2. Por medio de la síntesis en fase solida de péptidos se han obtenido las secuencias específicas de aminoácidos AASIKVAVSADR y PPFLMLLKGSTR característicos de la laminina para la inclusión en la estructura de hidrogeles ELR mediante la metodología click.
3. Se ha corroborado la estructura de dichos péptidos de manera satisfactoria, mediante análisis de aminoácidos, análisis elemental y resonancia magnética de protón.
4. Se estudió y caracterizó fisicoquímicamente los biopolímeros ELR modificados con péptidos, mediante diferentes técnicas espectroscópicas tales como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o MALDI-Tof, así como por Análisis de Aminoácidos.
5. Se han obtenido satisfactoriamente los hidrogeles a partir de los ELRs VKV y SKS, modificados los primeros con diferente proporción de los péptidos 1 y 2 previamente sintetizados. La obtención de los hidrogeles es un resultado de gran interés ya que es la primera vez que se obtienen geles de ELRs con péptidos injertados de tamaños medios.
6. Se midieron las propiedades físicas de los nuevos hidrogeles, mediante estudio Reológico. Los resultados reológicos muestran que, a medida que aumenta la proporción de péptido injertado, los hidrogeles muestran menor valor del módulo de almacenamiento, y los geles poseen menores propiedades mecánicas, adaptables a las posteriores aplicaciones biomédicas.
7. A través de micrografías SEM y un análisis en el Software ImagenJ fue posible estudiar la porosidad de los Hidrogeles VKV-cc-pep/SKS-N₃ en sus diferentes proporciones de injerto. Se ha observado una reducción en el tamaño del poro a medida que el número de péptidos injertados aumenta. Al mismo tiempo se observa el estrechamiento de las paredes del hidrogel.
8. Se realizó un ensayo de células inmortalizadas HaCat para estudiar la proliferación celular, en los nuevos hidrogeles VKV-cc-peptido-1/SKS-N₃, VKV-cc-peptido-2/SKS-N₃, comparándolos con células cultivadas en hidrogeles VKV-cc/SKS-N₃ (Hidrogel control) que no poseen péptidos injertados. Se ha evidenciado una notoria mejor proliferación en aquellos hidrogeles que tenían el péptido 1 en su estructura, especialmente aquél que contiene dos péptidos injertados.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] ROSA, V. (2013). What and where are the stem cells for Dentistry? *Singapore Dent J.*, 34(1): 13-18.
- [2] SHAPIRA, A. et al. (2014). Advanced micro- and nanofabrication technologies for tissue engineering. *Biofabrication*, 6(2). [Epub ahead of print]. doi: 10.1088/1758-5082/6/2/020301.
- [3] ATOUI, R. y CHIU, R. C. (2013). Immune responses after mesenchymal stem cell implantation. *Methods Mol Biol*, 1036:107-120.
- [4] SINGH, M. et al. (2008). Strategies and applications for incorporating physical and chemical signal gradients in tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.*, 14(4): 341-366.
- [5] Hoare, T.R.; Kohane, D.S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, 1994 – 1999.
- [6] ROMAGNOLI, C. et al. (2013). Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clin Cases Miner Bone Metab.*, 10(3): 155-161.
- [7] Molfino, H. Gonzales M, Alcalde-Yañez, A. Valverde-Morón, V. & Villanueva-Salvatierra, D. (2020). Electrospinning: Avances y aplicaciones en el campo de la biomedicina. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(4), 706-713. <https://dx.doi.org/10.25176/rfmh.v20i4.3004>
- [9] Herrero Cabrero, C. (n.d.). *Estudio del proceso de co-autoensamblado de polipéptidos sensibles a estímulos*. Retrieved July 11, 2022, from <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/50678/TFG-G5375.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [8] Kasai S, Ohga Y, Mochizuki M, Nishi N, Kadoya Y, Nomizu M. . (2004). Multifunctional peptide fibrils for biomedical materials. *Biopolymers*; 76(1):27-33. doi: 10.1002/bip.10565. PMID: 14997472
- [10] Katime D., Katime O., Katime I.A. (2004). Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio editorial de la Universidad del país Vasco. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228.
- [11] Rey, DFV y St-Pierre, J.-P. (2019). Técnicas de fabricación de tejido engi andamios neering. En: *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One* (ed. M. Mozafari, F. Sefat y A. Atala), 109–125. Elsevier.
- [12] Arredondo, A Peñaranda, M. E. (2009). *scielo.org*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rinbi/v3n5/v3n5a13.pdf>
- [13] Carlos Rodríguez-Cabello, J., Escalera, S., Juanes-Gusano, D., Santos, M., & Girotti, A. (2022). *Designing Elastin-Like Recombinamers for Therapeutic and Regenerative Purposes*.
- [14] Urrejola, M.C., Soto, L.V, Zumarán, C.C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., & Haidar, Z.S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463-1471. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022018000401463>
- [15] Río, E.P. (2015). Síntesis y caracterización de nuevos polímeros recombinantes tipo elastina fusionados a eGFP para la formación de nanopartículas.

- [16] Molfino, H. Mauricio Gonzales, Alcalde-Yañez, Alexander, Valverde-Morón, Valery, & Villanueva-Salvatierra, Dulce. (2020). Electrospinning: Avances y aplicaciones en el campo de la biomedicina. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(4), 706-713. <https://dx.doi.org/10.25176/rfmh.v20i4.3004>
- [17] Rivero Miguel, P. and Gonzales E.M.R., (2008) Diseño de experimentos para la optimización del medio de cultivo utilizado en un proceso biotecnológico de obtención de polímeros.
- [19] Christiano, M. C. (1996). The functions of laminins: Lessons from in vivo studies. *Matrix Biology*, 369-381.
- [20] Ryan, M. C., & Christiano, A. M. (1996). The Functions of Laminins: Lessons from In Vivo Studies 1. The Laminin α 3 Chain. In *Matrix Biology* (Vol. 15).
- [21] Misas, A. H. (2015). *Obtencion de hidrogeles quimicos, mediante tecnologia "click", a partir de polimeros tipo elastina para liberacion controlada de farmacos*. Obtenido de <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/14033>
- [22] Weeks BS, Nomizu M, Ramchandran RS, Yamada Y, Kleinman HK. Laminin-1 and the RKRLQVQLSIRT laminin-1 alpha1 globular domain peptide stimulate matrix metalloproteinase secretion by PC12 cells. *Exp Cell Res*. 1998 Sep 15;243(2):375-82. doi: 10.1006/excr.1998.4157. PMID: 9743597.
- [23] Kim, J. M., Park, W. H., & Min, B. M. (2005). The PPFLMLLKGSTR motif in globular domain 3 of the human laminin-5 α 3 chain is crucial for integrin α 3 β 1 binding and cell adhesion. *Experimental Cell Research*, 304(1), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.11.009>
- [23] Pizarek, J. A. (n.d.). *Immunomodulation of oral keratinocytes through titanium surface peptide coatings of cell adhesion oligopeptide motifs and IL-23 Receptor antagonist*.
- [24] Petrini P., Briatico Vangosa F., & Daniela Patricia Peneda Pacheco, I. (n.d.). *POLITECNICO DI MILANO Engineered gastric and cervicovaginal material-based mucus models*.
- [18] Jewett J.C., Bertozzi C.R. (2010). Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chemicals Society Reviews*; 39:1271-9.
- [25] Chhabra R.P. y Richardson J.F. (2008). *Non-Newtonian Flow and Applied Rheology: Engineering Applications*, 2ª Edition, 97-101, Butterworth-Heinemann, Oxford, United States.
- [26] Russo L, S. Z. (2011). Diazo transfer for azido-functional surfaces,. En *Materials Today* (págs. 164-169)
- [29] Fullana Alzamora, C. (2017). Síntesis en fase sólida y química combinatoria. Ejemplos en el campo de los heteroclitos. (Trabajo Fin de Grado Inédito). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- [30] Peñaranda A., M. E. (Junio de 2009). Scielo.org. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rinbi/v3n5/v3n5a13.pdf>
- [31] Aldámiz-Echevarría, L., & Ángel Prieto, J. (2010). Análisis e interpretación del perfil de aminoácidos en errores innatos del metabolismo. *Anales de Pediatría Continuada*, 8(1), 26–32. [https://doi.org/10.1016/s1696-2818\(10\)70004-4](https://doi.org/10.1016/s1696-2818(10)70004-4)
- [32] Garrido R., Vélez H., & Vérez V. (2013). Resonancia magnética nuclear: nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. *Vaccimonitor*, 22(1),

35-42. Recuperado en 07 de julio de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2013000100007&lng=es&tlng=es.

[33] Postek M.T., Howard K.S., Johnson A.H. and McMichael K.L. (1980). Scanning Electron Microscopy: A Student's Handbook, (Ladd Research Ind., Inc. Williston, VT.).

[34] Lyman C.E., Newbury D.E., Goldstein J.I., Williams D.B., Romig A.D., Armstrong J.T., Echlin P., Fiori C.E., Joy D.C., Lifshin E. and Ruediger Peters K. (1990). Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis and Analytical Electron Microscopy: A Laboratory Workbook, (Plenum Press. New York, N.Y.).

[35] Sebastian Manzano, C. C. (2011). Caracterización por Espectrometría de Masas MALDI de Cucurbit[n]uriles (n = 6,7,8). *AVANCES*, A50-A55.

7. ANEXOS

a) Cantidades de polímeros y péptidos usados para la formación de hidrogeles VKV-cc-pep/SKS-N₃

Tabla 8 Cantidades de polímeros y péptido usadas en la creación de hidrogeles a una concentración de 25 mg/mL a diferentes concentraciones de péptidos.

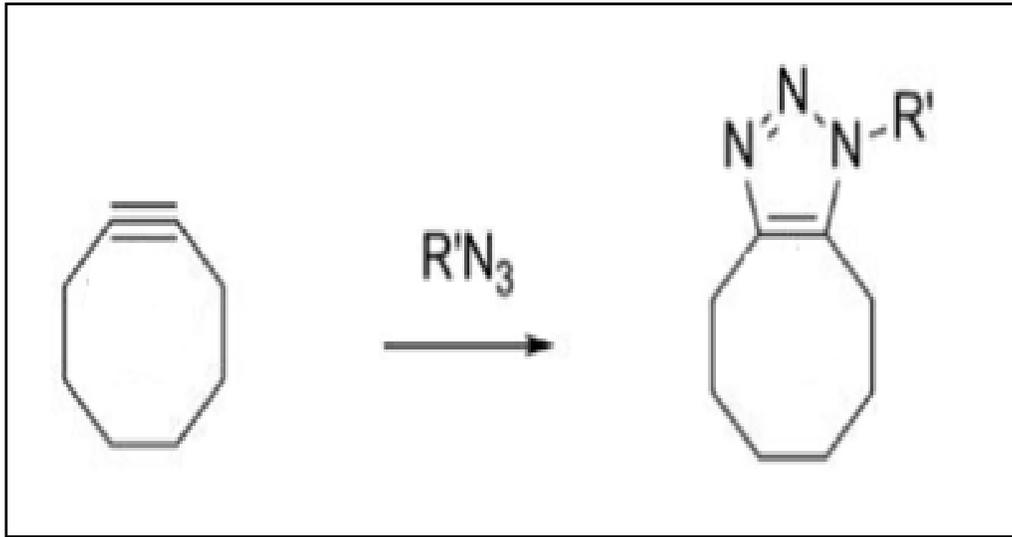
Medidas usadas en la creación de un solo hidrogel con inclusiones del péptido a diferentes concentraciones						
Masa polímero modificado VKV (mg)	Masa polímero modificado VKV (mg)	Masa polímero modificado SKS-N₃ (mg)	Volumen disuelto del polímero SKS en agua Mili-Q (μL)	Volumen de disolvente (μL) VKV-cc-Péptido Agua Mili-Q	Masa de péptido 1 requerido (mg)	Masa de péptido 2 requerido (mg)
Hidrogel VKV-cc-Péptido 1x2	17.5	17.5	89.2	110	0.67	0.88
Hidrogel VKV-cc-Péptido 1x4	17.5	17.5	78.21	121.78	1.57	1.77
Hidrogel VKV-cc-Péptido 1x6	17.5	17.5	65.019	134.98	2.35	2.65

b) Resultados de Análisis de Aminoácidos de los Péptidos AASIKVAVSADR y PPFLMLLKSTR

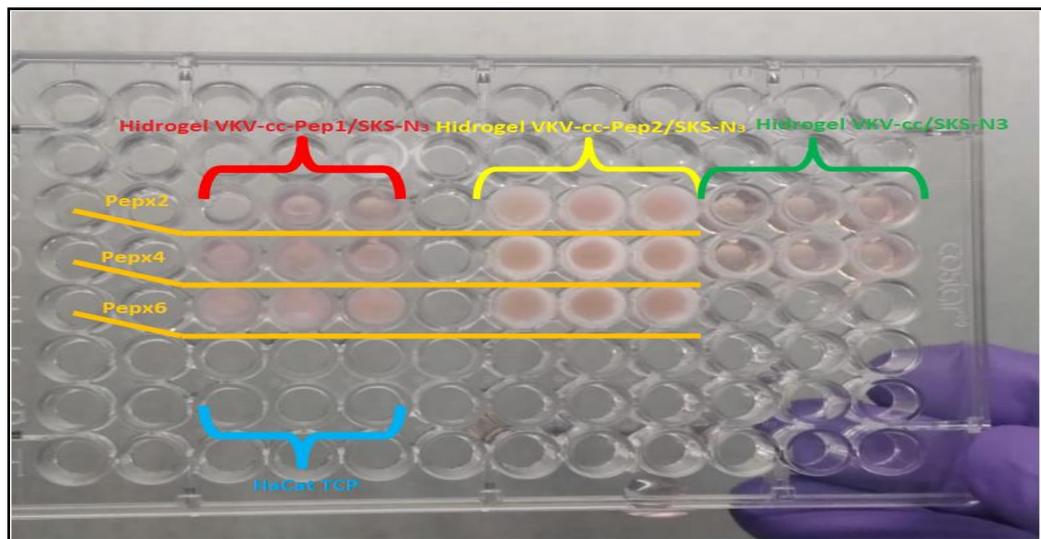
AASIKVAVSADR (Péptido 1)														
Nombre de la Muestra	Aminoácido D		Aminoácido S		Aminoácido R		Aminoácido A		Aminoácido V		Aminoácido I		Aminoácido K	
	Calculado	Teórico												
Péptido 1	1.12	1	1.87	2	1.19	1	4.25	4	1.86	2	0.85	1	1.87	2
VKV-cc-Péptido 1 x2	3.24	2	5.86	5	2.53	2	9.55	8	260.12	288	1.76	2	26.31	28
VKV-cc-Péptido 1 x4	4.17	4	7.19	9	3.71	4	13.53	16	261.27	273	2.75	4	27.65	32
VKV-cc-Péptido 1 x6	6.14	6	9.47	13	5.11	6	18.85	24	266.40	277	3.70	6	28.93	36

PPFLMLLKGSTR (Péptido 2)																		
Nombre de la Muestra	Aminoácido S		Aminoácido G		Aminoácido T		Aminoácido R		Aminoácido M		Aminoácido F		Aminoácido L		Aminoácido K		Aminoácido P	
	Calculado	Teórico																
Péptido 2	0.95	1	1.06	1	0.98	1	1.11	1	0.99	1	0.63	1	3.13	3	2.25	2	1.91	2
VK V-cc-Pep 2 x2	2.98	3	319.07	290	2.03	2	0.93	2	3.19	3	0.32	2	5.86	8	25.23	28	148.50	149
VK V-cc-Pep2 x4	4.41	5	327.44	292	3.90	4	4.49	4	4.06	5	2.40	4	14.70	14	28.05	32	154.97	153
VK V-cc-Pep2 x6	5.25	7	336.63	294	5.18	6	5.98	6	4.63	7	3.65	6	19.31	20	30.53	36	157.40	157

- c) Esquema de la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre un grupo alquino y una azida



- d) Esquema de la disposición de las muestras en los ensayos de actividad metabólica



e) Resultados de análisis elemental de péptidos AASIKVAVSADR y péptido PPFLMLLKSTR

