



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



Máster en Investigación Biomédica

**Desarrollo de un biopolímero tipo seda-elastina con propiedades
antinflamatorias para la cicatrización de heridas.**

Trabajo Fin de Máster presentado por:

Ailín Ramírez Abreu

Tutores:

Dra. Alessandra Girotti

Dr. F. Javier Arias Vallejo

Valladolid 2022/23

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	3
1. Introducción	4
1.1. Cicatrización de heridas e ingeniería tisular.....	4
1.2. Biomateriales e Hidrogeles en Biomedicina.....	5
1.3. Elastina.....	6
1.4. Polímeros tipo elastina, ELP.....	6
1.5. Seda y polímeros tipo seda, SLP.....	7
1.6. Polímeros tipo seda elastina, SELP	7
2. Materiales y métodos.....	10
2.1. Materiales	10
2.2. Métodos	13
2.3. Transformación bacteriana de pDNA.....	13
2.3.1. Purificación de plásmidos transformados en DH5 α	13
2.3.2. Bioproducción de polímeros	14
2.3.3. Aislamiento de polímeros recombinante.....	14
2.3.4. Purificación de polímeros recombinantes mediante ciclos de transición inversa (ITC).....	15
2.3.5. Caracterización de los polímeros.....	15
3. Resultados y Discusión	17
3.1. Purificación del pET7TGF β EIS ₂ R6.....	17
3.2. Bioproducción de polímeros	18
3.3. Caracterización de los polímeros.....	19
3.3.1. Electroforesis SDS-PAGE	19
3.3.2. Espectrometría de masas: MALDI-TOF.....	20
3.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).	21
3.3.4. Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta mediante DLS .	22
3.3.5. Gelificación de los polímeros.....	24
4. Conclusiones.....	26
5. Recomendaciones.....	26
6. Referencias Bibliográficas	27
7. Anexos	29

RESUMEN

La cicatrización de heridas causadas por aquellas enfermedades con altas complicaciones médicas como la diabetes es un proceso complejo que requiere cada vez más del empleo de materiales de ingeniería tisular para ayudar a la reparación del tejido dañado. En los últimos años en la investigación biomédica se ha trabajado en el diseño de polímeros tipo seda-elastina, que por sus características físico-mecánicas y biológicas aportan buenas propiedades como biomateriales en aplicaciones biomédicas. Este trabajo se enfoca en la producción de dos polímeros de esta familia: EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6 para la obtención de hidrogeles con aplicaciones en la cicatrización de heridas. Se transformaron los vectores de expresión génica en *E. coli* para su posterior producción y purificación mediante ciclos de transición inversa y se caracterizaron los polímeros por diferentes técnicas (SDS-PAGE, MALDI-TOF, RMN y DLS). Ambos polímeros fueron capaces de formar hidrogeles a la concentración 120 mg/mL a la temperatura fisiológica. Los resultados obtenidos en este trabajo son concluyentes para el desarrollo de sistemas poliméricos de hidrogeles para su futura evaluación en la cicatrización de heridas.

ABSTRACT

The healing of wounds caused by diseases with high medical complications such as diabetes is a complex process that increasingly requires the use of tissue engineering materials to aid in the repair of damaged tissue. In recent years, biomedical research has been working on the design of silk-elastin type polymers, which due to their physical-mechanical and biological characteristics provide good properties as biomaterials in biomedical applications. This work focuses on the production of two polymers of this family: EIS₂R6 and TGFβEIS₂R6 to obtain hydrogels with applications in wound healing. Gene expression vectors were transformed into *E. coli* for subsequent production and purification by reverse transition cycling and the polymers were characterized by different techniques (SDS-PAGE, MALDI-TOF, NMR and DLS). Both polymers were able to form hydrogels at the concentration 120 mg/mL at physiological temperature. The results obtained in this work are conclusive for the development of polymeric hydrogel systems for future evaluation in wound healing.

1. Introducción

1.1. Cicatrización de heridas e ingeniería tisular

La piel que recubre el cuerpo humano representa el 16% de su peso y está formada por tejido subcutáneo (junto con los músculos y los huesos subyacentes), dermis y epidermis (la capa más superficial). El tejido cutáneo desempeña un papel fundamental como barrera protectora de los órganos frente a las agresiones de agentes patógenos y los cambios ambientales. Por ello, la piel se ve directamente afectada por diversos agentes químicos, mecánicos, térmicos y biológicos (1). La formación de heridas se produce debido a factores físicos o químicos o a daños en la piel y los tejidos blandos causados por condiciones médicas y fisiológicas. Las heridas pueden dividirse en dos categorías: agudas y crónicas. Una herida aguda se define como una lesión cutánea debida a un traumatismo o a una intervención quirúrgica que suele curarse en un proceso ordenado y oportuno sin complicaciones. Las heridas crónicas no suelen recuperar su integridad funcional en 3 meses o incluso mostrar una tendencia a la cicatrización. Es más probable que estén causadas por una estimulación continua y que no solo cicatricen lentamente, sino que también recidiven. La Wound Healing Society clasifica las heridas crónicas en cuatro categorías, en función de su causa: úlceras por presión, úlceras venosas, úlceras por insuficiencia arterial y úlceras diabéticas. En comparación con el proceso normal de cicatrización de las heridas, las causas y los síntomas de la cicatrización crónica son más complejos y graves. Por lo tanto, la cicatrización crónica de heridas es un reto importante en la medicina moderna (2).

La reparación de heridas es un proceso complicado y dinámico que sustituye componentes celulares y capas tisulares dañados o defectuosos y se divide en cuatro fases consecutivas y superpuestas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Figura 1). Tras la lesión, aparece la fase de hemostasia en la que se produce una constricción vascular para detener la hemorragia y las plaquetas inducen la formación de coágulos, se liberan citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que proporcionan señales quimiotácticas para reclutar células inflamatorias, induciendo así las siguientes fases de la reparación. Durante la inflamación, las células inflamatorias eliminan los componentes de desecho que pueden favorecer la infección e impedir la cicatrización. En respuesta a la lesión, los macrófagos residentes se activan mediante mediadores proinflamatorios. Los mastocitos también se activan para liberar biomoléculas químicas y vasoactivas, como la histamina, que aumentan la permeabilidad de los capilares. En consecuencia, los monocitos atraviesan los capilares por diapédesis y se diferencian en macrófagos y fagocitan patógenos. Además, los neutrófilos se infiltran rápidamente en la zona de la herida y reducen la infección bacteriana. Una vez resuelta la inflamación, en la fase proliferativa se reclutan células para regenerar la epidermis y la dermis dañadas, y el lecho de la herida se infiltra predominantemente de células endoteliales y fibroblastos. Esta fase se caracteriza por tres acontecimientos principales (i) la producción de tejido de granulación/neodermis, (ii) la angiogénesis (formación de nuevos capilares, que dan al tejido su aspecto granular), (iii) y la re-epitelización. Los fibroblastos invaden el coágulo de fibrina siguiendo las señales quimiotácticas del PDGF y el TGF- β , y sustituyen el tejido conectivo más profundo a lo largo de los bordes del lecho de la herida. Los fibroblastos proliferan y empiezan a producir colágeno, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, componentes principales de la matriz extracelular (MEC) nativa que son necesarios para favorecer el crecimiento celular. La etapa final implica la remodelación del tejido de granulación en tejido normal y fisiológico, y puede durar de meses a años porque requiere la organización de las fibras de colágeno recién colocadas y la reducción de los vasos no esenciales (3).

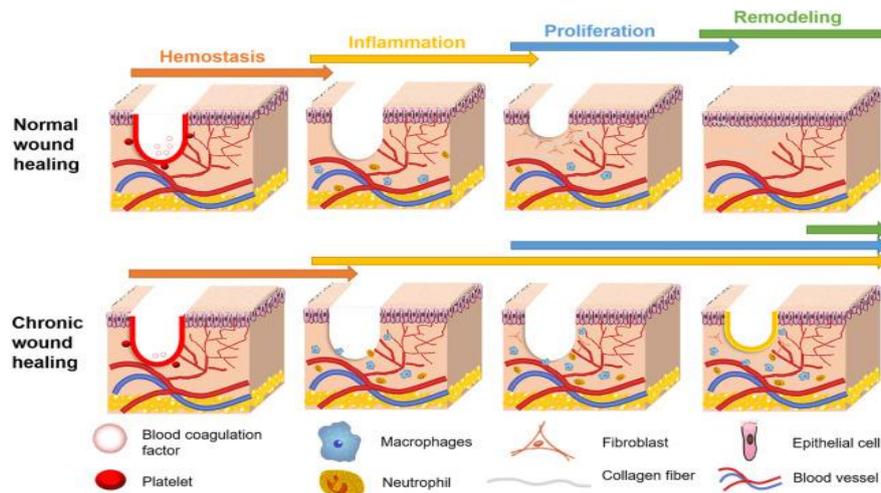


Figura 1. Comparación del proceso de cicatrización entre una herida crónica y una herida normal. La línea roja en forma de U en la zona de la herida indica que ésta se encuentra en fase hemostática, mientras que la línea amarilla indica que la herida no está cicatrizando y se encuentra en estado inflamatorio. (Imagen tomada de Li Q y colaboradores, 2022).

La cicatrización de heridas, basadas en procesos endógenos, requiere cada vez más de materiales de ingeniería para ayudar a la reparación del tejido. Los métodos de ingeniería tisular han introducido los apósitos como posibles alternativas para reparar las lesiones cutáneas. Un apósito convencional debería proporcionar un entorno húmedo en la interfaz de la herida, eliminar los exudados adicionales, permitir el intercambio de gases y actuar como barrera contra los microorganismos. Pero además, idealmente debería asegurar una rápida reconexión con la vasculatura del huésped que evite la pérdida de viabilidad celular. Los apósitos tradicionales se componen principalmente de pelusa, algodón, gasas y vendas sintéticas y naturales con diversos grados de absorbencia que provocan lesiones y un crecimiento incompleto del tejido tras su retirada. Por lo tanto, es deseable disponer de apósitos biodegradables basados en materiales bioactivos y/o células que induzcan la cicatrización de las heridas y promuevan el depósito de MEC. Los apósitos a base de polímeros naturales son de gran interés en este campo debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y naturaleza no alérgica (4).

1.2. Biomateriales e Hidrogeles en Biomedicina

Durante los últimos años en la investigación biomédica se ha intentado desarrollar diferentes sistemas basados en biomateriales innovadores para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. En esta última generación de biomateriales se han implementado la biocompatibilidad, la especificidad, eficacia terapéutica; y además, la similitud con las propiedades y características que se encuentran en las macromoléculas naturales con el fin de ser utilizados en múltiples aplicaciones biomédicas (5).

Los polímeros basados en proteínas, que consisten en secuencias repetitivas de aminoácidos naturales son algunos de los candidatos más prometedores para una nueva generación de biomateriales innovadores, ya que la ingeniería genética y las técnicas biotecnológicas permiten diseñar y construir biomateriales basados en proteínas con un mayor grado de complejidad y precisión. Además, sus secuencias, derivadas de módulos estructurales basados en proteínas, pueden modificarse fácilmente para incluir motivos bioactivos y señales biológicas que mejoren sus funciones e interacciones material-huésped, satisfaciendo así requisitos biológicos fundamentales (6).

En las últimas décadas, las técnicas de DNA recombinante han demostrado ser herramientas muy poderosas para el desarrollo de nuevos biomateriales basados en proteínas capaces de autoensamblarse en diferentes estructuras, como los hidrogeles (7). Estos deben cumplir una serie de propiedades como porosidad y tamaño de poro adecuado, suficiente área superficial, adecuada resistencia mecánica, biocompatibilidad, ser biodegradable e interactuar activamente con las células, aumentando su adhesión, migración, crecimiento y diferenciación (8).

1.3. Elastina

La elastina es una proteína de la MEC que se encuentra en los animales superiores con dominios en varias conformaciones unidos mediante enlaces cruzados. Confiere propiedades de elasticidad y resistencia, así como la regulación de una serie de actividades celulares (adhesión, migración, proliferación y diferenciación) en tejidos como la piel, el sistema cardiovascular, el pulmón y los ligamentos donde es especialmente abundante (9). Estas características propias de la elastina, la convierte en una biomolécula de gran impacto e interés para aplicaciones biomédicas.

Mediante diferentes estudios de composición aminoacídica de la elastina se ha descrito que la misma contiene dos tipos de dominios: un dominio reticular hidrófilo en α -hélice con zonas ricas en alanina (Ala, A) y lisina (Lys, K) implicadas en los enlaces cruzados de la elastina natural, y dominios elásticos hidrófobos de conformación en forma de espiral β ricos en glicina (Gly, G), prolina (Pro, P) y valina (Val, V), implicados en las propiedades de extensibilidad de la elastina. Entre los dominios elásticos, el pentapéptido VPGVG es el elemento más común encontrándose repetido consecutivamente más de 50 veces en una molécula de elastina (10, 11). Esta particular estructura permite a las fibras extenderse y volver sucesivamente a la posición de partida, es decir, tener un comportamiento típicamente elástico.

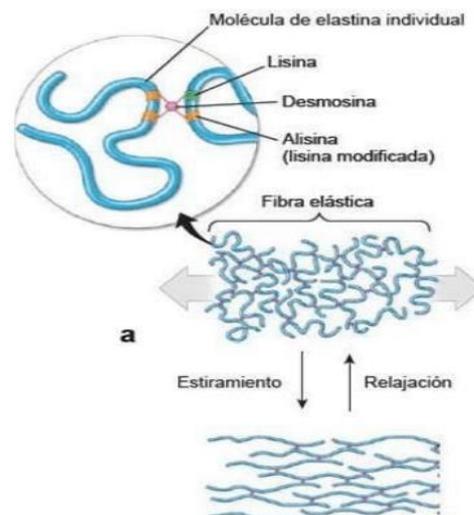


Figura 2. Comportamiento elástico de la elastina

La elastina cuando está en disolución acuosa, experimenta una transición desde un estado desordenado a un estado ordenado en el que las moléculas son capaces de agregarse, formando una fase densa y pegajosa. Esta transición de desorden \rightarrow orden se da cuando la temperatura de la disolución aumenta al pasar de 15°C a 25°C. Este comportamiento está en contra de la tendencia normal de los sistemas físicos para los cuales cabe esperar un aumento del orden a temperaturas decrecientes (12).

1.4. Polímeros tipo elastina, ELP

Los polímeros similares a la elastina (ELP, del inglés *Elastin-Like-Polymers*) son biopolímeros sintéticos contruidos por la repetición de secuencias que con mayor

frecuencia se encuentran en la elastina natural como poli(GVGVP), poli(IPGVG), poli(VAPGVG) etc. Cuando su peso molecular es lo suficientemente alto, presentan las características físico químicas de la elastina natural, especialmente la transición desorden → orden que se da al aumentar la temperatura de sus disoluciones. De entre todas las combinaciones de secuencias de polímeros tipo elastina, la gran mayoría se basan en la fórmula (VPGG)_n, donde n es el número de repeticiones y "X" representa cualquier aminoácido excepto la prolina, siendo el más estudiado el poli(VPGVG) (13). La estructura molecular monótona de las ELP confiere un conjunto de propiedades interesantes, como el estímulo-respuesta, la biocompatibilidad y el comportamiento de autoensamblaje, pero también presenta dificultades técnicas para su síntesis. La generación de ELPs como polímeros recombinantes multibloques similares a la elastina para su uso en aplicaciones biomédicas ha surgido como un método más efectivo que el método tradicional de síntesis química, teniendo como ventajas una menor complejidad a nivel molecular, alta precisión y reproducibilidad de producción (14).

En el diseño de los ELPs se pueden realizar diferentes modificaciones del pentapéptido VPGXG, siendo las modificaciones en la posición "X" las más comunes, aunque también se han modificado aminoácidos en otras posiciones. Por ejemplo, la sustitución de Gly en la primera posición por Ala da lugar a un cambio de comportamiento elástico a plástico. En la elastina natural, 'X' es frecuentemente Val, Ala o isoleucina (Ile, I). La sustitución de un residuo de Val por otro que contenga una cadena lateral con propiedades diferentes introduce una fuerte reactividad a estímulos específicos, incluidos los cambios de presión, sal, pH y corriente eléctrica (5). Otros ELPs se han diseñado para incorporar péptidos o regiones de péptidos con cierta actividad biológica como el dominio de adhesión celular mediata por integrinas RGD y el péptido biomimético procedente del factor de crecimiento transformante beta TGFβ (pm26TGF β1) con funciones en el desarrollo, la curación de heridas y la regulación inmunológica.

1.5. Seda y polímeros tipo seda, SLP

Las sedas son proteínas producidas de forma natural, caracterizadas como copolímeros en bloque con repeticiones altamente conservadas de aminoácidos de cadena lateral corta como bloques hidrofóbicos y secuencias cortas de aminoácidos de cadena lateral más grande o cargados como bloques hidrofílicos. La fibroína de seda contiene una cadena pesada compuesta de secuencias ricas en Gly y Ala de hexapéptidos que incluyen: GAGAGS, GAGAGY, GAGAGA, o GAGYGA, donde S es serina (Ser, S) e Y es tirosina (Tyr, Y) (13).

Los polímeros similares a la seda (SLP, del inglés *Silk-Like Polymers*) están bioinspirados en la secuencia de la seda. Uno de los motivos más populares es el hexapéptido GAGAGS, presente de forma natural en la cadena pesada de la fibroína de seda producida por el gusano *Bombyx mori*. El interés de este dominio se debe a su capacidad para mediar interacciones físicas irreversibles y estables adoptando una conformación de lámina β. Esta conformación de la estructura secundaria de las sedas permiten producir SLP que reúnan características específicas de solubilidad, resistencia mecánica, tasa de biodegradación, así como cinética de liberación del fármaco, y pueden prediseñarse en la secuencia (5).

1.6. Polímeros tipo seda elastina, SELP

La combinación de los dominios de seda y elastina ha dado lugar a los denominados polímeros tipo seda elastina (SELP, del inglés *Silk-Elastin Like Polymers*). Las SELP consisten en bloques de la secuencia de fibroína [GAGAGS]_n y de la secuencia de la tropoelastina de mamífero [GVGVP]_n que explotan las propiedades fisicomecánicas específicas de cada secuencia. El bloque similar a la seda, tiende a autoensamblarse en estructuras secundarias insolubles fuertemente empaquetadas, láminas-β, para proporcionar estabilidad térmica y química, capacidad de ajuste mecánico y sitios de

entrecruzamiento físico para los sistemas poliméricos SELP. El bloque similar a la elastina experimenta transiciones estructurales reversibles tras la exposición a estímulos ambientales específicos, proporcionando funciones dinámicas a las SELP. Las características más atractivas de las SELP para la administración de fármacos provienen de sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, que pueden ajustarse mediante: 1) variando la proporción seda-elastina; 2) modificando un residuo en la secuencia de la elastina; 3) modificando el peso molecular; y 4) añadiendo péptidos para ampliar las funciones. Variando la relación seda-elastina, se pueden ajustar las propiedades de respuesta térmica, donde un aumento de la relación seda-elastina conduce a una mayor transición de temperatura inversa. Modificando la hidrofobicidad del segundo y cuarto residuo en el bloque de elastina, las SELP se vuelven más sensibles a diversos estímulos, como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, los cambios redox, las enzimas y los campos eléctricos (5, 15).

1.6.1. Aplicaciones biomédicas de los SELP como hidrogeles en la cicatrización de heridas

Las redes poliméricas hidrofílicas tridimensionales reticuladas o hidrogeles son candidatos potenciales para la ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y los materiales de implante. Los hidrogeles despiertan interés por su facilidad de fabricación, su potencial inyectabilidad para la administración no invasiva y sus útiles interacciones con materiales biológicos. Las propiedades de los hidrogeles, como sus altos índices de hinchamiento, porosidad y consistencia blanda, los hacen similares a los tejidos vivos naturales y, por tanto, buenos candidatos para aplicaciones biomédicas. Mientras que los biomateriales de origen natural pueden producir respuestas biológicas inconsistentes o no deseadas, el uso de proteínas de bioingeniería permite ajustar las propiedades mecánicas y de respuesta a estímulos, junto con una alta pureza y un peso molecular consistente, evitando resultados negativos. La reticulación de los hidrogeles garantiza que estos andamiajes ofrezcan propiedades similares a las del entorno de la MEC para favorecer la adhesión celular y la expresión génica. Los hidrogeles reticulados químicamente ofrecen una mayor robustez mecánica y de los materiales. En cambio, los hidrogeles reticulados físicamente proporcionan materiales sensibles a los estímulos y a los cambios ambientales, como la temperatura, el pH y la fuerza iónica (16).

En concentraciones de $\geq 4\%$ (p/v) o superiores, la seda-elastina soluble en agua a temperatura ambiente puede formar un hidrogel a temperatura corporal. Antes de su aplicación, la seda-elastina se encuentra en estado líquido; sin embargo, puede solidificarse para formar un hidrogel a temperatura corporal. Así, cuando la seda-elastina se aplica a una herida en estado acuoso, forma automáticamente un hidrogel de seda-elastina, que cubre la herida y mantiene un estado húmedo sin inflamación (17). Además de estas propiedades de autogelación, la seda-elastina tiene el potencial de promover la migración de fibroblastos y macrófagos, y la producción de colágeno de fibroblastos (15). La propiedad de autoagregación del componente de elastina permite al componente de seda mediar en la reticulación física efectiva de las redes de polímeros a nanoescala; esto se traduce en una mayor resistencia y estabilidad, al tiempo que permite la difusión de moléculas bioactivas incrustadas a través del hidrogel (18).

1.7. Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1)

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) es una citocina pleiotrópica con múltiples funciones en el desarrollo, la cicatrización de heridas y la regulación inmunitaria. La disfunción inmunitaria mediada por el TGF- β 1 puede dar lugar a condiciones patológicas, como la inflamación. El proceso inflamatorio crónico se caracteriza por una liberación continua de citocinas proinflamatorias, y la inhibición o el bloqueo de estas vías de señalización de citocinas se consideran un objetivo de tratamiento. El péptido biomimético pm26TGF- β 1 es un péptido de 7 aminoácidos

procedente del TGF β que ha demostrado poseer propiedades antiinflamatorias potentes y no presenta quimioatracción de neutrófilos (controlando la reactividad de las células T) (19). Esto sugiere que este péptido puede ser útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, así como la cicatrización de heridas.

Objetivo General

Producción de dos polímeros tipo seda elastina y obtención de hidrogeles para su posterior aplicación biomédica, como dispositivo con actividad antiinflamatoria y su control, en la cicatrización de heridas.

Objetivos Específicos

1. Bioproducción de los polímeros EIS₂R6 y TGF β EIS₂R6 a partir de la expresión génica de plásmidos transformados en una cepa de *E.coli*.
2. Caracterización fisicoquímica de sendos biopolímeros empleando diferentes técnicas de análisis (SDS-PAGE, MALDI-TOF, RMN y DLS).
3. Demostrar la capacidad de formación de hidrogeles a partir de los polímeros EIS₂R6 y TGF β EIS₂R6 para su posterior aplicación biomédica.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos químicos:

Reactivo	Casa comercial
Ácido acético	Thermo Fisher
Ácido clorhídrico	Thermo Fisher
Acido fórmico	Acros Organics
Acrilamida/Bis-acrilamida	VWR Life Science
Agarosa (SeaKem® LE);	Cambrex
Ampicilina	Apollo Scientific
Azul de bromofenol 2%	Alpha Aesar
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma Aldrich
Benzamidina	Acros Organics
Cloruro de cobre II (CuCl ₂)	Thermo Fisher
DNA Marker: NZYDNA Ladder III	NZYTech
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Formedium
Fluoruro de fenilsulfonilmetano (PMSF)	Sigma Aldrich
Glicerol	Thermo Fisher
Glicina	Thermo Fisher
Glucosa	Sigma Aldrich
Isopropanol	Merck
NZY-Blue Protein marker,	NZYTech
Persulfato amónico (PSA)	Merck
Pierce™ Protease inhibitor	Pierce
Tetrametilendiamina (TEMED)	Thermo Fisher
Tris(Hidroximetil)aminometano (Tris)	Sigma Aldrich
2-Mercaptoetanol (2-ME)	Gibco

2.1.2. Soluciones tamponadas

- **SDS-PAGE tampón de carga 5x:** 10% (m/v) SDS, 25% (v/v) β mercaptoetanol, 2% (v/v) azul de bromofenol (BPB), 50% (v/v) glicerol, 0.3 M Tris; pH 6.8
- **SDS-PAGE Running Buffer 5x (pH 8.3):** Tris base 0.12M; glicina 0.96M; SDS 0.02M
- **TAE 1x (pH 8):** 40 mM Tris-base, 19 mM ácido acético, 1 mM EDTA
- **Tampón de carga de DNA 5x (pH8):** 50 mM Tris-HCl, 0.05 mM EDTA, 0.05% (v/v) azul de bromofenol, 30% (v/v) glicerol
- **Tampón de lavado celular (pH 8):** Tris-Base 20mM, NaCl 140 mM
- **Tampón de sonicación o lisis celular (pH 8):** Tris-Base 20mM, EDTA 1Mm

2.1.3. Soluciones de teñido

- **Gel de poliacrilamida: cloruro de cobre II (CuCl₂):** se prepara una solución de 0.2M de CuCl₂ en agua destilada. Se destiñe el colorante con agua destilada.
- **Gel de agarosa: GELPed Nucleic Acid Stain (Biotium):** se prepara una solución de 1:10000 (v/v) en TAE 1x

2.1.4. Materiales biológicos

2.1.4.1. Cepas bacterianas

Se emplearon las siguientes cepas de *Escherichia coli* (*E.coli*):

- **BLR (DE3) competent Cells (Novagen):** Eficiencia de transformación $>2 \times 10^6$ cfu/ μ g.
- **DH5 α TM ("library efficiency DH5 α TM competent cell"):** Eficiencia de transformación $> 1 \times 10^9$ cfu/ μ g de DNA plasmídico.

2.1.4.2. Medios de cultivos

- **LB (Lysogeny Broth) (FormediumTM):** 10 g/L de bacto-triptona, 10 g/L NaCl y 5 g/L de extracto de levadura (25 g/L de LB en agua destilada; pH 7.0).
- **LB-agar:** medio LB con un 1.5 % (p/v) de bacto-agar; pH 7.0.
- **TB (Terrific Broth) (FormediumTM):** 20 g/L de triptófano, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL/L de glicerol, KH₂PO₄ 0.017 M y K₂HPO₄ 0.072 M; pH 7.0.
- **S.O.C. Medium Fisher (BioreagentsTM):** 2% (m/v) de triptófano, 0.5% (m/v) de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM Glucosa; pH 7.0.

2.1.4.3. Enzimas de restricción

Las enzimas empleadas para la digestión del plásmido y análisis con gel de agarosa son las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *XhoI*. Para el empleo de las mismas se siguieron las especificaciones aportadas por Thermo ScientificTM (20).

2.1.4.4. Vector de expresión

El vector de expresión empleado en este trabajo es pET7 Rare (Figura 3), construido previamente por Girotti A., 2007 (21) a partir del vector pET-25b (+) de Novagen. Entre los distintos sistemas de expresión disponibles el pET es uno de los más potentes para la clonación y expresión de proteínas recombinantes y en el sistema bacteriano de *E.coli*. El pET-25b (+) contiene el promotor T7lac y el represor *lac*, que controlan eficazmente la expresión del gen de interés. Este vector posee un tamaño de 5547pb y un único sitio de reconocimiento por las enzimas *EcoRI* y *XhoI* de manera que una vez sea digerido por las mismas, de manera individual este queda totalmente lineal.

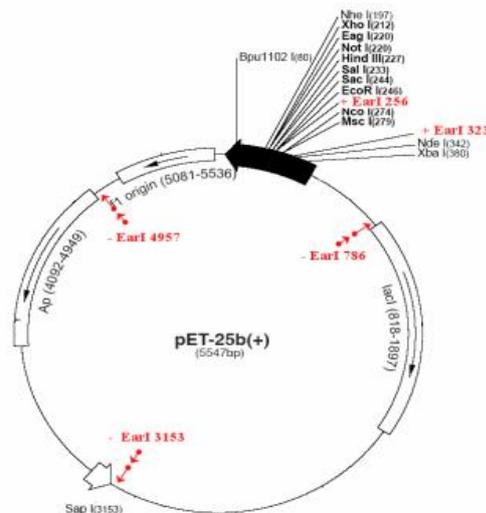


Figura 3. Representación del vector de expresión pET25 (+) y los sitios de modificación para construcción del vector de expresión pET7. (Imagen tomada de Girotti A., 2007).

2.1.4.5. Polímeros recombinantes empleados

Los genes empleados para la producción de polímeros habían sido anteriormente sintetizados en el laboratorio de Biodispositivos Avanzados para Nanomedicina, y se habían clonado independientemente en la zona de inserción (polylinker) del vector de clonación pET7.

Tenemos finalmente dos plásmido para la expresión de proteínas recombinantes: **pET7EIS₂R6** y **pET7TGFβEIS₂R6**. Ambas secuencias están formadas por dos bloques de EIS (Figura 4). EIS es un bloque anfifílico que a temperatura y pH fisiológico se autoensambla y forma hidrogeles, donde E se corresponde con el dominio hidrofílico de elastina (compuesto por un 20 % de ácido glutámico) con una temperatura de transición (Tt) superior a 70°C, el dominio I se corresponde con el dominio hidrófobo de la elastina (compuesto por el aminoácido isoleucina) con una Tt inferior (15°C) y S se corresponde con el dominio de la fibroína de la seda que otorga mayor estabilidad, ya que a temperaturas mayores que la Tt adquiere la estructura de lámina β de manera irreversible. Este bloque con dominios de diferentes Tt permite que a temperaturas fisiológicas (37°C), el subdominio E permanece completamente soluble en agua, mientras que el I ya es insoluble. Este estado anfifílico conduce a la formación de diferentes estructuras autoensambladas. Además, poseen seis bloques RGD (dominio de adhesión celular mediada por integrinas), una región V5 derivada de un pequeño epítipo (Pk) que se encuentra en las proteínas P y V del paramixovirus de la familia del virus simio 5 (SV5), la cual proporciona un método fiable para la detección de la proteína diana, y un tag de seis histidinas que permite la purificación por afinidad sobre columnas de níquel.

El **pET7TGFβEIS₂R6** a diferencia de **pET7EIS₂R6** presenta la secuencia del péptido biomimético pm26TGF β1 procedente del TGF β y el fragmento CM2, el cual contiene secuencias peptídicas selectivamente reconocidas por endoproteasas, liberadas durante el proceso de re-modelamiento de la MEC, lo que permite que se produzca una digestión enzimática y se libere el fragmento pm26TGF β1. Además, no posee las regiones V5 y las seis histidinas.

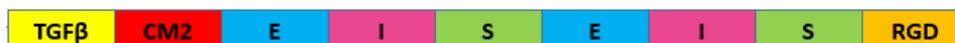
El gen insertado en el plásmido **pET7EIS₂R6** contiene 4470 pb y el polímero para el cual codifica (**EIS₂R6**) presenta un peso molecular de 124048.55 Dalton.

El gen insertado en el plásmido **pET7TGFβEIS₂R6** contiene 4608 pb y el polímero para el cual codifica **TGFβEIS₂R6** presenta un peso molecular de 125506.22 Dalton.

EIS₂R6:



TGFβEIS₂R6:



E	=	[(VPGVG) ₂ VPGE(VPGVG) ₂] ₁₀
I	=	(VGIPG) ₆₀
S	=	<u>Silk-like peptide</u> = [V(GAGAGS) ₅ G] ₂
RGD	=	[(VPGIG) ₅ AVTGRGDSPASS] ₆
CM2	=	VGGGGGPMGSPGWGGGGG VGGGGQPQLAKGGGGG VGGGGPQGIWGQGGGG
		Cat K MMPs → VGGGGGPMGSPGWGGGGGV
		MMP GL (MMP13) → VGGGGQPQLAKGGGGGV
		MMP GI (MMP2) → VGGGGPQGIWGQGGGGV
TGFβ	=	MESPLKRQV
V5	=	GGSGGSGKIPNPLLGLDSTGGSGGSGGS

Figura 4. Polímeros empleados. Bloques de ácido glutámico (E), isoleucina (I), fibroína de la seda (S), péptido de adhesión celular (RGD), sitio de reconocimiento de metaloproteasas (CM2), péptido biomimético (TGFβ), región de detección (V5).

2.1.4.6. Kit de extracción y purificación de DNA plasmídico, PDNA

Para la extracción y purificación del plásmido de interés se empleó el kit de purificación Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (*Bio-Rad*) y NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) (*Macherey-Nagel*).

2.2. Métodos

2.2.1. Transformación bacteriana de pDNA

Se realizan transformaciones de plásmidos en células competentes de *E.coli* específicas (*apartado 2.1.4.1*) dependiendo de la finalidad de la misma y siguiendo el protocolo de uso por el suministrador.

La siembra se lleva a cabo en placas de cultivo con el correspondiente antibiótico de resistencia del plásmido (Ampicilina) y glucosa en caso de las células BLR. Las placas de cultivo se incuban a 37°C hasta la observación de colonias aisladas (16 - 24h). Las placas donde hayan crecido colonias aisladas se almacenan a 4°C para su posterior uso.

2.2.2. Purificación de plásmidos transformados en DH5α

La purificación de plásmido se lleva a cabo con el objetivo de determinar que las colonias transformadas son positivas, es decir contienen el plásmido (mediante electroforesis de agarosa analítica y secuenciación) y obtener alícuotas del plásmido para futuras producciones del polímero en cuestión. Primeramente se realiza la transformación del plásmido en la cepa bacteriana DH5α (*apartado 2.1.4.1*). Para la extracción de plásmido y su posterior purificación se emplearon dos tipos de kits (2.1.4.6), siguiendo el protocolo establecido. El DNA eluído es cuantificado y evaluada su pureza mediante un NanoDrop One^o Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.2.2.1. Análisis de PDNA mediante electroforesis analítica en gel de agarosa SeaKem® LE

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica que nos permite separar, analizar y purificar moléculas de DNA por su tamaño, aprovechando el carácter poroso del propio gel. La movilidad electroforética de los diferentes fragmentos de DNA depende de su carga (determinada por el pH del tampón de electroforesis), del tamaño de éstos, del

voltaje aplicado entre ambos electrodos y del tamaño de poro que posea el medio anticonvectivo, lo cual va a ser determinado por la concentración de agarosa empelada en la preparación del gel.

Se emplea una electroforesis analítica con el fin de comprobar el éxito de la purificación del plásmido luego de ser digerido por diferentes enzimas de restricción (*apartado 2.1.4.3*) siguiendo las especificaciones aportadas por el fabricante. El gel se tiñe con solución de GelRed Nucleic Acid Stain, colorante fluorescente para ácidos nucleicos ultrasensible. Las bandas de DNA con el fluoróforo se observan empleando un sistema digital de imagen de luz UV Gel Doc™ EZ Imager.

2.2.2.2. Secuenciación de pDNA

La secuenciación de DNA es una técnica cuyos resultados permiten el conocimiento exacto de la composición y orden nucleotídico de determinado fragmento génico, para lo cual deben seleccionarse primers específicos que reconozcan cierta secuencia del plásmido y actúen como origen de replicación. En este caso el pDNA ha sido secuenciado mediante el método de Sanger. El método implica la síntesis de una cadena de DNA complementaria utilizando una matriz de DNA de una sola hebra y luego la secuenciación de la cadena resultante utilizando moléculas de dideoxinucleótidos marcadas fluorescentemente. Al incorporarse a la cadena recién sintetizada, los dideoxinucleótidos detienen la elongación de la cadena en posiciones específicas, lo que genera fragmentos de longitud variable que se separan mediante electroforesis y se detectan a través de la fluorescencia. La secuencia del fragmento de DNA original se puede deducir a partir de los fragmentos separados según su tamaño.

La secuenciación de los PDNA se lleva a cabo en Cenit Support Systems S.L., empresa localizada en el Parque Científico de Salamanca (Villamayor).

2.2.3. Bioproducción de polímeros

Para la producción de los polímeros se debe realizar en primer lugar la transformación bacteriana del pDNA que contiene el gen que codifica los polímeros en un vector de expresión (*apartado 2.1.4.4*). Las bacterias competentes que se emplean en este trabajo son BLR (*apartado 2.1.4.1*). Para comprobar qué clones han sido transformados con el pDNA que expresa nuestra proteína de interés, se lleva a cabo un screening empleando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (*apartado 2.2.7.1*). Una vez realizada la electroforesis, se selecciona la colonia que exprese el polímero en mayor cantidad y con mayor calidad.

La colonia seleccionada es empleada para la producción de los polímeros. Para ello se procede a preparar el **preinóculo**, donde la colonia es cultivada a 37°C con agitación (250 rpm) durante 16 h, en 5 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente (ampicilina) y enriquecida con glucosa. Se transfieren 100 mL del preinóculo a 30 mL de medio LB+antibiótico+glucosa en incubándose en las mismas condiciones durante 4h, cuando el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, con el fin de aumentar la cantidad de biomasa (**inóculo**). Seguidamente se procede a realizar la **inoculación** en la que se añaden 1 mL del inóculo por cada 500 mL de medio TB+LB AIM con ampicilina para un total de 7.5 L y se procede a incubar en las mismas condiciones durante 16h, generándose una cantidad adecuada de biomasa e induciéndose la expresión de proteína. Se detiene la producción para proceder a recoger la biomasa y analizar la expresión génica mediante SDS-PAGE.

A continuación, se procede a varios ciclos de lavados del cultivo bacteriano para eliminar el medio de cultivo.

2.2.4. Aislamiento de polímeros recombinante

Las bacterias productoras se recogen en recipientes adecuados y se centrifugan a 2700 g durante 15 min a 4°C, proceso tras el cual se elimina el sobrenadante (medio de cultivo). A continuación, se realizan tres lavados del cultivo celular empelando

tampón de lavado celular, donde se resuspende el sedimento bacteriano y se lleva a cabo una centrifugación en las mismas condiciones. Seguidamente se procede a la ruptura de las células, para ellos se resuspenden las bacterias en tampón de sonicación con inhibidores de proteasas. La ruptura de las células se lleva a cabo en el sonicador UP400St de Hielscher con un sonotrodo de 14mm. Este proceso consiste en aplicar ciclos de altas presiones (entre 1500 y 1800 bar.) y bajas temperaturas (4 °C). El lisado bruto bacteriano obtenido tras la sonicación celular se somete a una centrifugación a 4°C 16000g durante 45 min. Finalmente, el sobrenadante se emplea para llevarse a cabo la purificación del ELP.

2.2.5. Purificación de polímeros recombinantes mediante ciclos de transición inversa (ITC)

La purificación de los ELPs se lleva a cabo siguiendo un método sencillo llamado Ciclos de Transición Inversa (ITC, *por sus siglas en inglés*), teniendo en cuenta el fenómeno de transición inversa con la temperatura (ITT) típico de los ELP. Siguiendo un método estándar de purificación de estas proteínas y teniendo las características propias de cada polímero de interés se logra una óptima purificación del mismo. Primeramente la fracción soluble resultante de la lisis bacteriana se somete a acidificación con ácido clorhídrico diluido (pH 4). Las proteínas ácidas desnaturalizadas y el DNA se eliminan por centrifugación en frío a 4°C y 16.000 g durante 45 min. El sobrenadante resultante de la acidificación debe contener la proteína de interés y se recupera provocando su transición de fase aumentando la temperatura de la solución a 40°C (por encima de la temperatura de transición inversa de ELP) durante 2 h en un baño de agua caliente. A esta temperatura, el ELP forma agregados de tamaño micrométrico, que pueden separarse de la fracción soluble del lisado celular mediante centrifugación a 40°C y 16.000 g durante 15 min. Los contaminantes solubles y las proteínas insolubles pueden co-localizarse en la fracción sólida con el ELP. Por ello se necesitan varios ciclos de purificación que implican resuspender el pellet en tris –base 20 mM (pH 8.8) a 4°C durante 12h en 2 mL de agua ultrapura (H₂O mQ) fría por litro de cultivo, y dejar agitar a 4°C durante 12 h y seguidamente varios ciclos de adición de sales (NaCl 1M), calentamiento (2h, 42°C, agregación y precipitación del ELP) y enfriamiento (H₂O mQ, 4°C, ON, solubilización del ELP) hasta obtener una óptima pureza de la proteína. Una vez obtenida la proteína pura, se somete a diálisis para eliminar las sales que pueda contener y luego es liofilizada para obtener el polímero puro y seco.

2.2.6. Remoción de las estructuras secundarias láminas-β de los SELP.

Se prepara una solución del polímero en ácido fórmico (50mg/mL), se deja solubilizar durante 3h a 4°C y se procede a la eliminación del ácido fórmico mediante diálisis.

2.2.7. Caracterización de los polímeros

2.2.7.1. Electroforesis SDS-PAGE

Los polímeros una vez purificados y en cada etapa de obtención del mismo (expresión en cepa bacteriana, screening, producción y ciclos de purificación) son analizados mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se realiza siguiendo básicamente el protocolo para sistemas discontinuos, descrito por Laemmli (22). Los geles separadores del 10% están formados por una mezcla de acrilamida 10% (p/v), bis-acrilamida 0,4% (p/v), Tris-HCl 375 mM pH=8,8, SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,05% (p/v) y TEMED 0,05% (v/v). Por otra parte, el gel compactador se compone de acrilamida 3,9%, bis-acrilamida 0,1%, Tris-HCl 125 mM pH=6,8, SDS 0,1%, persulfato amónico 0,05% y

TEMED 0,08%. Se emplea un aparato "MiniVE vertical electrophoresis system" de Hoefer (Amersham farmacia biotech.) con mini-geles de 0,75 x 80 x 100 mm aplicando una intensidad de corriente constante de 20 mA por gel. Esta técnica permitirá la separación de proteínas por su tamaño molecular y ser detectadas mediante tinción de cloruro de cobre y visualización en el transiluminador de luz blanca Gel Doc™ EZ Imager.

2.2.7.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una técnica analítica instrumental de análisis cualitativo y cuantitativo que permite identificar átomos, compuestos sencillos e incluso macromoléculas gracias a la separación de iones desplazados según su relación masa-carga (m/q). Para determinar la masa molecular experimental de los polímeros se procedió a analizar el mismo a una concentración de 5 mg/mL en el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Autoflex®) (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization acoplado al detector de vuelo Time-Of-Flight) en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid.

2.2.7.3. Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta mediante DLS

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS del inglés, *Dynamic light scattering*) es una técnica usada clásicamente para medir el tamaño de partículas en la región sub-micrónica dispersas en un líquido y la carga superficial (ζ -Potencial). Las muestras de los polímeros son disueltas a una concentración de 1 mg/mL en H₂O mQ, filtradas con un filtro de membrana membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.22 μ m para evitar la presencia de partículas extrañas y agregaciones por encima de los 220 nm. Las medias son realizadas en el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Se determina el tamaño de partícula a 4°C (por debajo de la temperatura de transición) y luego a 40°C (por encima de la teórica temperatura de transición) en microcubetas plásticas DTS0012 para evaluar el comportamiento de la molécula en las diferentes condiciones. La carga superficial se determinó a 37°C (condiciones fisiológicas) en una cubeta DTS 1070 en presencia o ausencia del NaCl 10mM.

2.2.7.4. Análisis proteómico mediante RMN

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno. Esta técnica es considerada como la herramienta más poderosa para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. El ensayo de RMN de los polímeros se realizó con una concentración de 20mg/mL y empleando el espectrómetros de RMN 500 Hz de Agilent Technologies del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid.

2.2.7.5. Prueba de gelificación de los polímeros

Teniendo en cuenta la capacidad de formación de hidrogeles de los polímeros a estudiar y la aplicación biomédica de los mismos se procede a realizar una prueba de gelificación para determinar la concentración óptima a la cual los polímeros forman hidrogeles para ser aplicados en la cicatrización de heridas. Se evaluaron diferentes concentraciones 50 mg/mL, 100 mg/mL y 120 mg/mL en H₂O mQ. Para ellos se disolvió el polímero en H₂O mQ a 4°C y se dejó disolviéndose hasta lograr una solución homogénea, luego fueron calentados a 37°C ON y se evaluó visualmente la formación de hidrogeles.

3. Resultados y Discusión

En este trabajo se ha llevado a cabo la producción de los polímeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6, siendo el primero el control del segundo. Estos polímeros son capaces de formar hidrogeles para su posterior uso en aplicaciones biomédicas. El TGFβEIS₂R6 a diferencia del EIS₂R6 presenta un péptido biomimético procedente de TGFβ, en el extremo amino, separado por la secuencia de reconocimiento de las metaloproteasas (CM2) del esqueleto de EIS₂ lo cual una vez reconocido por las metaloproteasas endógenas es capaz de liberarse el péptido y actuar en el sitio de acción con el objetivo de promover una cicatrización temprana no inhibitoria (23).

3.1. Purificación del pET7TGFβEIS₂R6

Con el objetivo de obtener un buen rendimiento del plásmido pET7TGFβEIS₂R6 para la posterior transformación en la cepa de expresión BLR y producción del polímero TGFβEIS₂R6, fue transformado en la cepa de clonación DH5α. Una vez obtenidas las colonias con el plásmido estas son cultivadas en medio LB suplementado con el antibiótico de resistencia y se lleva a cabo la purificación del pDNA siguiendo el protocolo de NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) (apartado 2.1.4.6). Finalmente tenemos el plásmido en disolución acuosa con la concentración de 154.2 ng/μL y una pureza óptima (ratio A260/A280 = 1.92; A260/A230 = 2.15).

Luego se procede a realizar la digestión del pDNA con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* siguiendo sus especificaciones (apartado 2.1.4.3) durante 2h. Seguidamente, se comprobó mediante la electroforesis en gel de agarosa analítica y la secuenciación (Figura 5) que se ha obtenido de manera correcta el plásmido pET7TGFβEIS₂R6. Tras la digestión obtenemos una única banda correspondiente al plásmido lineal con un tamaño de 10209 pb, el cual se corresponde con el tamaño teórico. La secuenciación del extremo 5' y 3' con el primer T7 nos indica que la secuencia de nucleótidos del inserto pET7TGFβEIS₂R6 es correcta y se localizan en el marco de lectura conveniente.

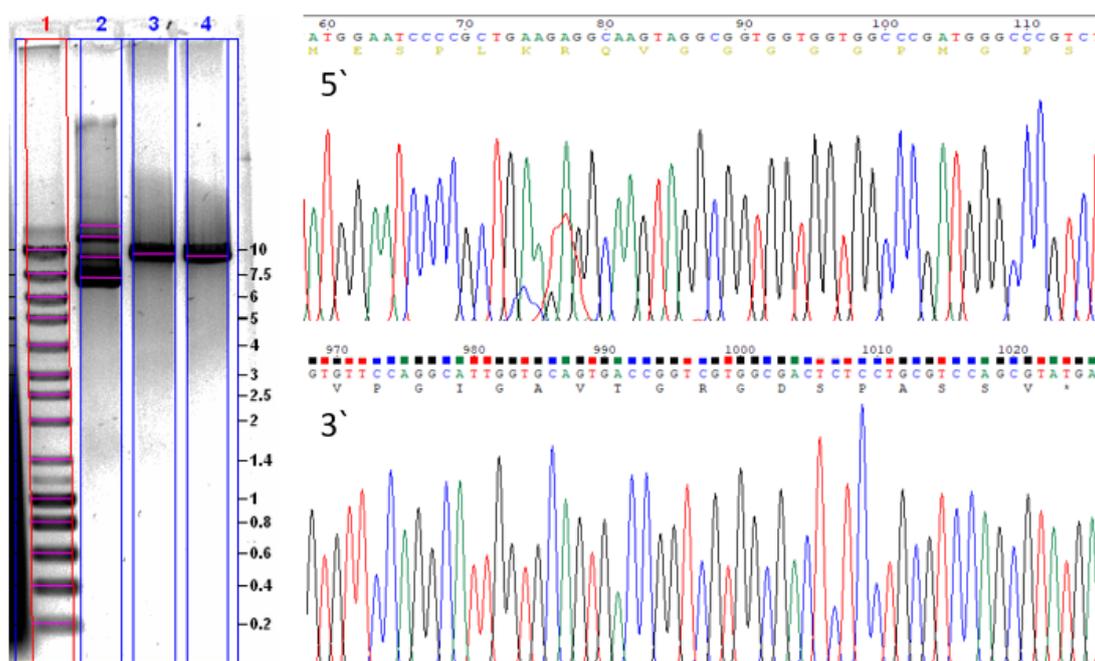


Figura 5. Control de transformación y purificación de pET7TGFβEIS₂R6. Gel de agarosa (1: marcador de peso molecular; 2: plásmido sin digerir; 3: plásmido digerido con *EcoRI*; 4: plásmido digerido con *XhoI*) y secuenciación del extremo 5' y 3'.

3.2. Bioproducción de polímeros

La producción de los recombinámeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6 fue llevado a cabo luego de ser transformados los plásmidos con los genes de expresión en la cepa bacteriana BLR, esta cepa es deficiente en sistemas de recombinación del DNA y en algunas proteasas, lo que provoca que los productos génicos y proteicos sean más estables, propiedad necesaria para la expresión de proteínas sintéticas cuya secuencia es monótona y por ende susceptible de recombinación (14). Una vez obtenidas varias colonias transformadas, 8 fueron seleccionadas al azar para verificar la de mayor expresión del polímero. Estas fueron inoculadas en medio TB (5mL) suplementado con ampicilina e incubadas a 37°C durante 16h. Para la producción de EIS₂R6 fue seleccionada la colonia 4, siendo esta la de mayor expresión (Figura 6, A) y para TGFβEIS₂R6 se seleccionó la colonia 4 (Figura 6, B), teniendo en cuenta que todas tenían un perfil similar de expresión. Además, se empleó un control negativo de expresión (calle 6: proteína Wnt3a-HA-EIS2) con peso molecular de 162.5 kD, para asegurarnos que las bandas marcada corresponde con el polímero en cuestión y las restantes bandas se corresponden con proteínas endógenas de la bacteria.

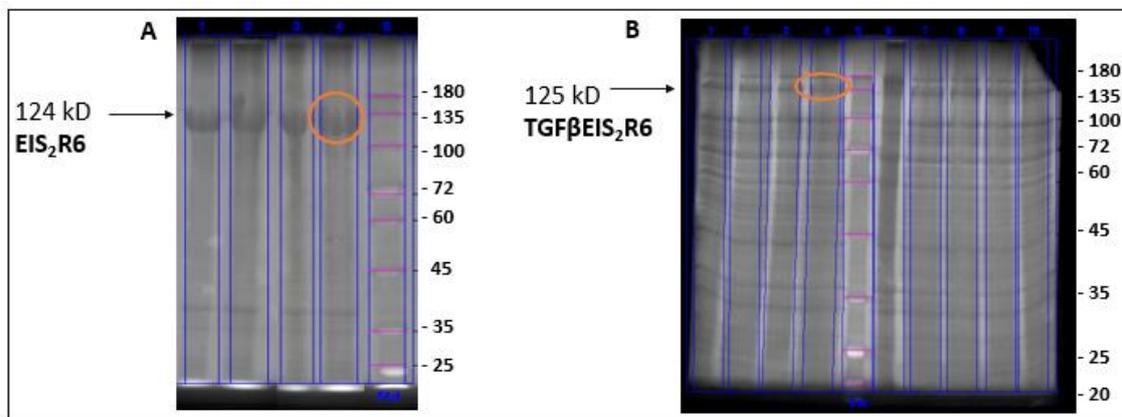


Figura 6. Expresión del polímero EIS₂R6 (A) y TGFβEIS₂R6 (B).

Estas colonias fueron empleadas para iniciar el proceso bioproducción de los polímeros (*apartado 2.2.3*). La bioproducción comienza con un pequeño volumen de medio de cultivo LB suplementado con ampicilina y glucosa. La glucosa apoya al crecimiento de cultivo bacteriano durante las primeras fases por su aporte como fuente de carbono; sin embargo, inhibe la expresión de polímeros al suprimir el operón lac. Una vez se agote la glucosa, la biomasa empieza a emplear la lactosa como fuente de carbono y esta induce la expresión de proteínas recombinantes (14).

El cultivo bacteriano estando en fase exponencial fue inoculado en medio LB+TB AIM con glucosa y glicerol; y la producción fue detenida cuando el crecimiento llegó a la fase de estacionaria y se mantuvo media hora más. Cuando las fuentes de carbono preferenciales, glucosa y glicerol, se agotan el cultivo empieza a metabolizar la lactosa induciendo la mayor expresión del polímero y determinando que el crecimiento del cultivo se detenga y llegue a la fase de meseta. Se realizaron varias medidas de absorbancia a primera hora de la mañana y cuando se obtuvo una absorbancia constante (Abs (EIS₂R6) = 4; Abs (TGFβEIS₂R6) = 5) se detuvo la producción y fue analizado por SDS-PAGE para comprobar la presencia de los mismos.

Luego, se procedió a la recolección de la biomasa y a continuación, se precisó del lavado de células para eliminar contaminantes del medio y proteínas endógenas secretadas por las bacterias genéticamente modificadas (*apartado 2.2.4*). Las células resuspendidas en tampón de sonicación se sometieron a un proceso de ruptura en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF, benzamidina). Estos inhibidores de proteasas evitarán durante el proceso de lisis bacteriana la proteólisis de las moléculas poliméricas por parte de las proteasas endógenas del microorganismo. En el caso de la

molécula TGF β EIS₂R6 se añadió también la mezcla Pierce™ Protease inhibitor (AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina A), teniendo en cuenta que el motivo CM2 será más susceptible a degradaciones proteolíticas. Con el proceso de sonicación se logra romper la pared celular bacteriana y la membrana plasmática de la bacteria, es liberado el polímero al medio líquido y eliminado el lisado celular por centrifugación. El polímero se encontrará en el sobrenadante debido a su elevada solubilidad a bajas temperaturas; mientras que los restos celulares deben mantenerse en el precipitado.

La purificación de los ELP se basa en la naturaleza termo-responsiva de estos biomateriales, más concretamente en el fenómeno de ITT, típico de los ELP, que puede desencadenarse por el calor, los cambios de pH o la adición de sal. Este procedimiento implica un método sencillo de ITC (14). Una vez obtenido el polímero en solución a 4°C, se logra eliminar las proteasas endógenas de la bacteria y otras proteínas que precipitan en medio ácido y es recuperado el polímero mediante una transición de fase, aumentando la temperatura a 42°C. La molécula polimérica es capaz de pasar de un estado desordenado a ordenado, agregándose, la cual se puede recuperar por centrifugación y re-suspendiéndose en tampón tris base 20 mM (pH 8.8) a 4°C al fin de ajustar a un pH básico para evitar la desnaturalización irreversible y precipitación de otras proteínas. Seguidamente se realizan varios ciclos de adición de sales, calentamiento y enfriamiento. Las sales influirán en la temperatura de transición de la molécula de manera que cuando calentemos a 42°C se logre una buena agregación y precipitación de la misma, para eliminar de la porción soluble todas las proteínas que no precipitan. Por último, con el enfriamiento obtenemos un polímero totalmente solubilizado que es sometido a diálisis a fin de eliminar todas las sales contenidas en la solución y liofilizado para obtener un polímero seco para su caracterización y aplicación biomédica.

El rendimiento del polímero EIS₂R6 fue de 111 mg/L de medio de cultivo, mientras que del TGF β EIS₂R6 de 7.56 mg/L para la cual se procede a realizar otras producciones de este último a fin de obtener un mayor rendimiento (Figura 7). La deficiencia en el rendimiento de TGF β EIS₂R6 puede deberse a la presencia de la secuencia diana CM2 de reconocimiento de metaloproteasas, que, si bien es eficiente para la aplicación biomédica al ser liberado el péptido de interés en respuesta a las variaciones del ambiente fisiológico en la regeneración tisular, durante el proceso de producción puede ser ineficiente debido a que esta región puede ser reconocida por las proteasas endógenas de la bacteria.

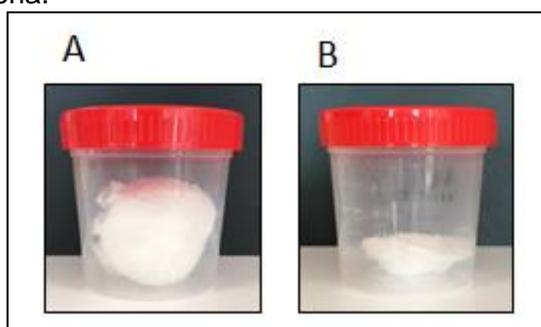


Figura 7. Polímeros puro y liofilizado. (A) EIS₂R6 y (B) TGF β EIS₂R6

3.3. Caracterización de los polímeros

En este trabajo se emplearon diferentes técnicas de caracterización de los polímeros bioproducidos como SDS-PAGE, MALDI-TOF, RMN y DLS.

3.3.1. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis fue empleada para caracterizar e identificar los polímeros en cada paso de obtención de los mismos. En la Figura 8 tenemos la caracterización del polímero purificado. Podemos observar las bandas correspondientes a EIS₂R6 y

TGF β EIS₂R6 con un peso molecular aparente de 133.9 kD y 132.9 kD respectivamente determinado por la curva de regresión lineal con el marcador de peso molecular. Si bien estos pesos moleculares son mayores que los teóricos (124 kD y 125kD respectivamente), es indicativo que dichas moléculas poseen un retraso electroforético debido a la hidrofobicidad de la molécula por la presencia del bloques VGIPG. En el caso del polímero TGF β EIS₂R6 obtuvimos una masa aparentemente pura, sin embargo, con el EIS₂R6 aparecen unas bandas con pesos moleculares de 30-45 kD, los cuales pueden ser producto de la degradación del mismo, ya que dichas bandas no coinciden con las bandas correspondientes a las proteínas endógenas bacterianas. Debido a estas bandas de degradación el EIS₂R6 presenta una pureza del 96.5 %.

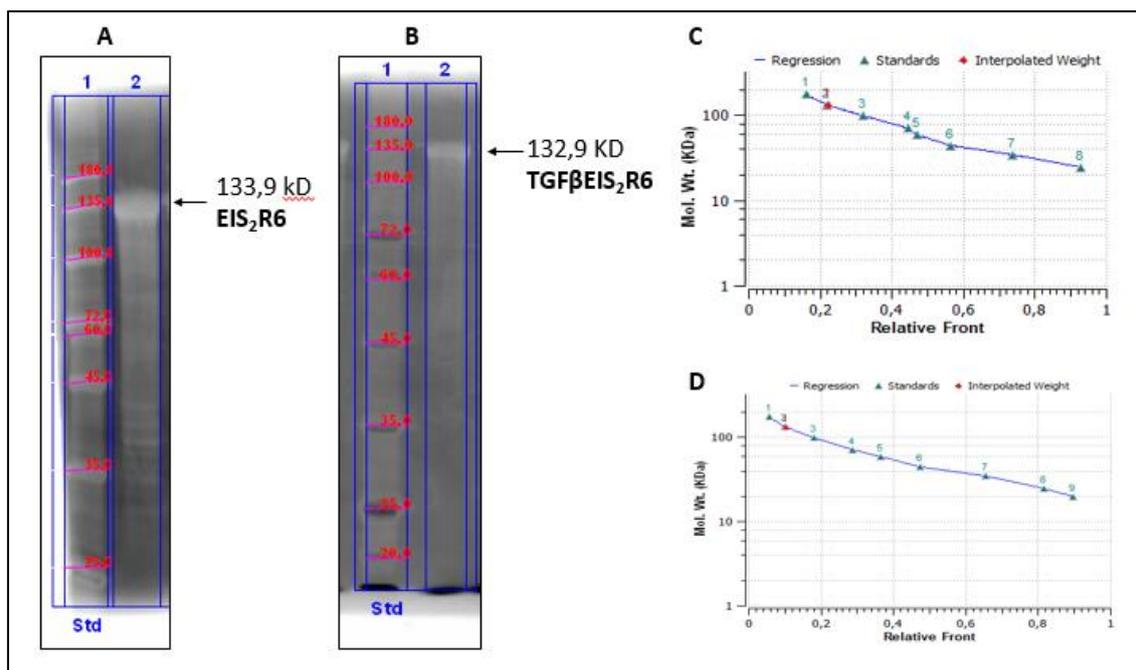


Figura 8. Movilidad electroforética y pureza de los polímeros EIS₂R6 (A, C) y TGF β EIS₂R6 (B, D).

3.3.2. Espectrometría de masas: MALDI-TOF

El espectro obtenido mediante espectrometría de masas para los polímeros EIS₂R6 y TGF β EIS₂R6 se muestran en la Figura 9. En el caso del polímero EIS₂R6 aparece un pico a 122324 m/z (kD) el cual se corresponde con el peso molecular teórico con un 1.38 % de error. Además aparecen picos de 61269 m/z, 41018 m/z y 24774 m/z que se corresponden con varias ionizaciones de la molécula y otros dos picos con 30572 y 46113 kD que puede corresponderse con los productos de degradación observado por SDS-PAGE. En el caso del polímero TGF β EIS₂R6 se observa un pico a 124502 m/z (kD), el cual se corresponde con el peso molecular teórico con un 0.8 % de error. Además aparecen picos de 62471 m/z, 41624 m/z y 24856 m/z que se corresponden con varias ionizaciones de molécula.

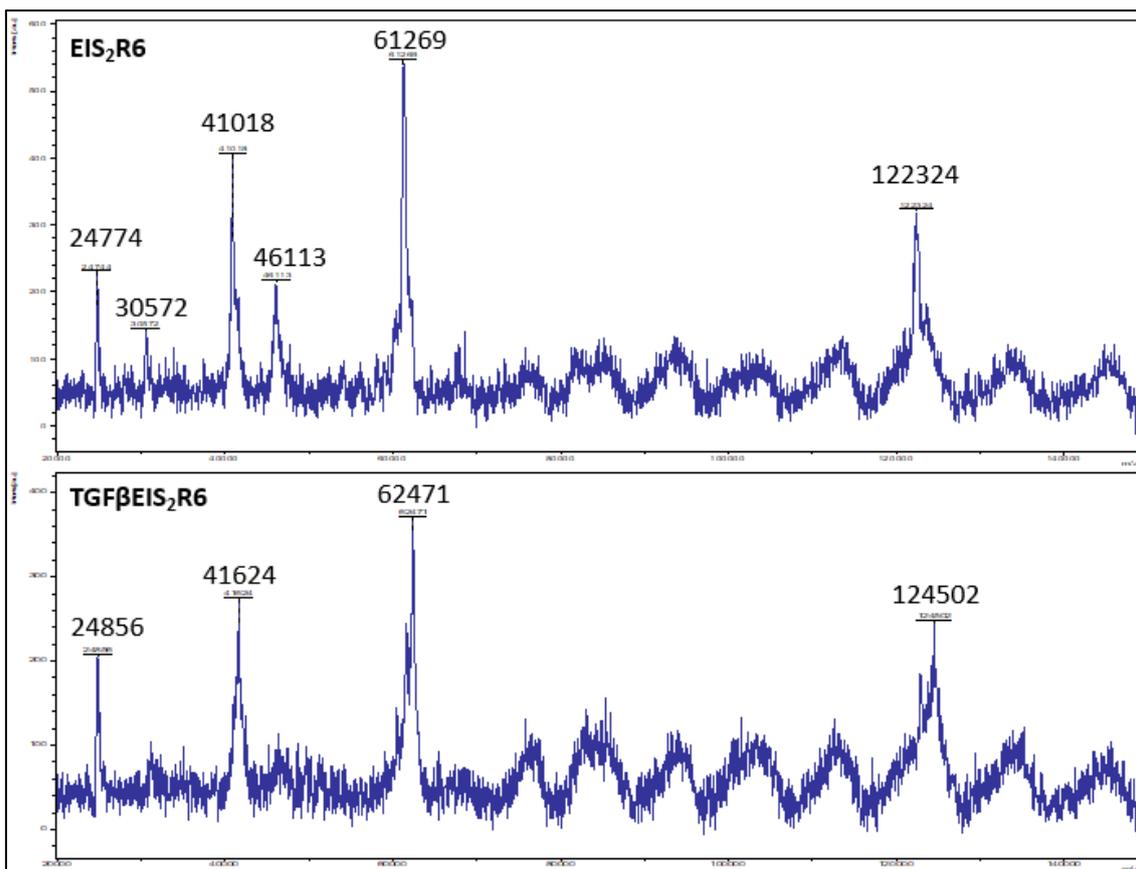


Figura 9. Espectro de masas de los polímeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6.

3.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Se realiza un RMN de protón de los polímeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6 (Anexo 3) para comprobar si el número de ¹H teórico que contiene la estructura según sus aminoácidos se corresponde a la señal dada por RMN (Tabla1). Las señales en el espectro son integradas empleando el software MestReNova 12.0. Para integrar las señales se toma como referencia el primer pico (0.5-0.75 ppm) correspondiente con los protones del grupo metilo (CH₃) y con esta referencia se le asigna valores a las restantes integrales. Aparecen diferentes picos en el intervalo de 0.75-1.20 ppm; 1.25-2 ppm; 3.25- 4.25 ppm y otra señal sobre los 4.7 ppm que pueden ser tanto de lo CH como de los CH₂.

Teniendo en cuenta todas las señales de CH y CH₂ tenemos un total de 4143.81 para el polímero EIS₂R6 con un error del 6.5 % respecto al valor teórico y 4623.32 para TGFβEIS₂R6 con un error del 2.5 % respecto al valor teórico. Cuando superponemos ambos espectros (**Anexo 4**) se observa como las señales salen bastante similares, sin embargo en el caso de TGFβEIS₂R6, las señales son más intensas debido a que posee más aminoácidos y por tanto mayor número de ¹H. Finalmente, con esta caracterización de RMN tenemos que la composición del polímero obtenido experimentalmente es bastante similar a la teórica.

Tabla 1. Número de protones teóricos de los polímeros según las estructuras de sus aminoácidos.

Polímeros	No. aa	CH ₃	CH ₂	CH	NH	OH	COOH	¹ H totales
EIS ₂ R6	1490	3168	3290	1144	1530	52	28	9212
TGFβEIS ₂ R6	1546	3165	3354	1154	1566	46	27	9312

3.3.4. Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta mediante DLS

La distribución del tamaño de partícula y el potencial zeta son características físicas importantes en nanomateriales para aplicaciones biomédicas. Al medir el diámetro hidrodinámico de las partículas si estas presentan un índice de polidispersidad (PDI) cercano a 0.1 es indicativo de que la partícula es monodispersa y por tanto la distribución del tamaño se mantiene uniforme y no hay presencia de varios agregados. El potencial zeta es una medida de las interacciones electrostáticas entre partículas y pueden ser usadas para predecir la estabilidad de la dispersión y su vida útil. Para dispersiones estabilizadas electrostáticamente, un valor extremo de potencial zeta, indica que la dispersión será más estable.

Las medidas de distribución de tamaño de partícula y potencial zeta se realizaron según se indica el *apartado* 2.2.7.3. Primeramente se procedió a medir el diámetro hidrodinámico de los polímeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6 a una concentración de 1 mg/ml en H₂O mQ (pH 6.8) a 4°C y luego a 40°C, valor claramente superior a la T_t teórica de los polímeros. En la Figura 10 y 11 se observa las diferentes distribuciones de tamaño de partícula. El polímero EIS₂R6 posee un comportamiento similar con ambas temperaturas de trabajo, con dos distribuciones de tamaño de partícula y por tanto con un índice de polidispersidad relativamente alto (0.3), una en el orden de los nanómetros correspondiente a la molécula polimérica y otra en el orden de 0.1 μm, correspondiente al agregado polimérico, siendo esta última de mayor intensidad, lo cual es indicativo de que el polímero ya se encuentra agregado a 4°C. En el caso del TGFβEIS₂R6, si bien el diámetro hidrodinámico varía de 0.1 μm a 0.5 μm al aumentar la temperatura de trabajo, se encuentran ambas mediciones lejanas del orden nanométrico y por tanto ya se encuentran agregadas de igual manera a 4°C. Este comportamiento es diverso al esperado, donde la molécula a bajas temperatura se encontraría de forma desordenada y extendida con un tamaño de partícula nanométrica y al aumentar la temperatura por encima de la de transición, este formaría un agregado ordenado y de mayor tamaño.

La agregación de estos polímeros a bajas temperaturas está condicionado por la presencia de bloques de la fibroína de la seda (GAGAGS) que adopta un conformación estable de láminas β intra y intercatenarias que tienden a autoensamblarse y proporciona una estructura fuertemente empaquetada (5). Con el fin de romper las interacciones hidrofóbicas entre las láminas betas de la estructura de la fibroína de la seda y obtener el polímero, se procedió a tratar los ELPs con ácido fórmico (*apartado* 2.2.6) y seguidamente se procedió a realizar nuevas mediciones del tamaño de partícula (24). En el caso del EIS₂R6 luego de ser tratado con ácido fórmico, se observa como a 4°C, obtenemos una distribución de tamaño a 12.5 nm con una intensidad de 88.4 % y una señal de menor intensidad de 121.8 nm, y un PDI de 0.09, lo cual es indicativo que el polímero se encuentra en forma de molécula monodispersa a bajas temperaturas y al aumentar la temperatura obtenemos un agregado monodisperso de 58.2nm. En el caso del TGFβEIS₂R6 al ser tratado con ácido fórmico obtenemos dos picos (8.0 nm y 81.8 nm) siendo el de mayor intensidad el pico de mayor tamaño y al aumentar la temperatura obtenemos un agregado de 39.2 nm con un alto índice de polidispersidad y una distribución de campana de gauss muy amplia, lo cual nos indica que se está formando una agregación muy inestable, probablemente porque el polímero posee este comportamiento polidisperso o porque el tratamiento con ácido fórmico no fue capaz de romper todas las interacciones hidrofóbicas de las láminas β para estabilizar la molécula. Este comportamiento en medio acuoso y tratamiento con ácido fórmico ha sido reportado anteriormente con la fibroína de la seda (24). Por tanto es requerida una puesta a punto del protocolo de medición del tamaño de partícula que incluya el tratamiento previo de los polímeros con ácido fórmico.

En la Figura 12 se observa las medidas de potencial zeta de los polímeros tratados con ácido fórmico. Se realizaron las medidas en medio salino (NaCl 10mM) y sin este

teniendo en cuenta que el medio salino es necesario para aportar la conductividad requerida para las medidas del potencial (25). Las mediciones del potencial zeta sin sal fueron para EIS₂R6 una media de -37.36 mV y para TGFβEIS₂R6 -18 mV. Luego de realizar las mediciones con sal obtenemos un potencial zeta para TGFβEIS₂R6 de -16.38 mV, que, si bien ha disminuido con la presencia de sal, debido a que esta provoca un apantallamiento alrededor de la partícula, es un valor indicativo de que el polímero presenta estabilidad. En el caso de TGFβEIS₂R6 obtenemos dos distribuciones de potencial (-2.248 mV y -11.21 mV) lo cual se corresponde con el comportamiento anómalo de la distribución del tamaño de partícula que va variando constantemente y la presencia de un alto PDI, indicativo de la alta inestabilidad de este polímero.

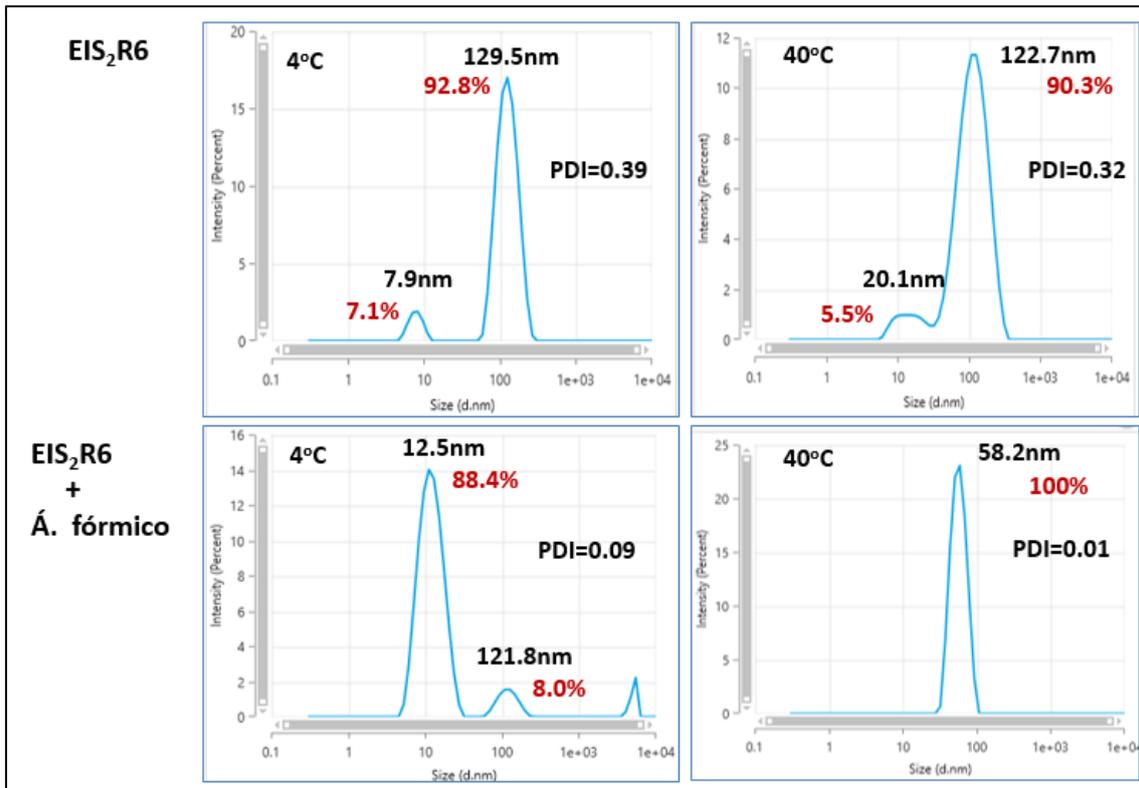


Figura 10. Distribución del tamaño de partícula de EIS₂R6

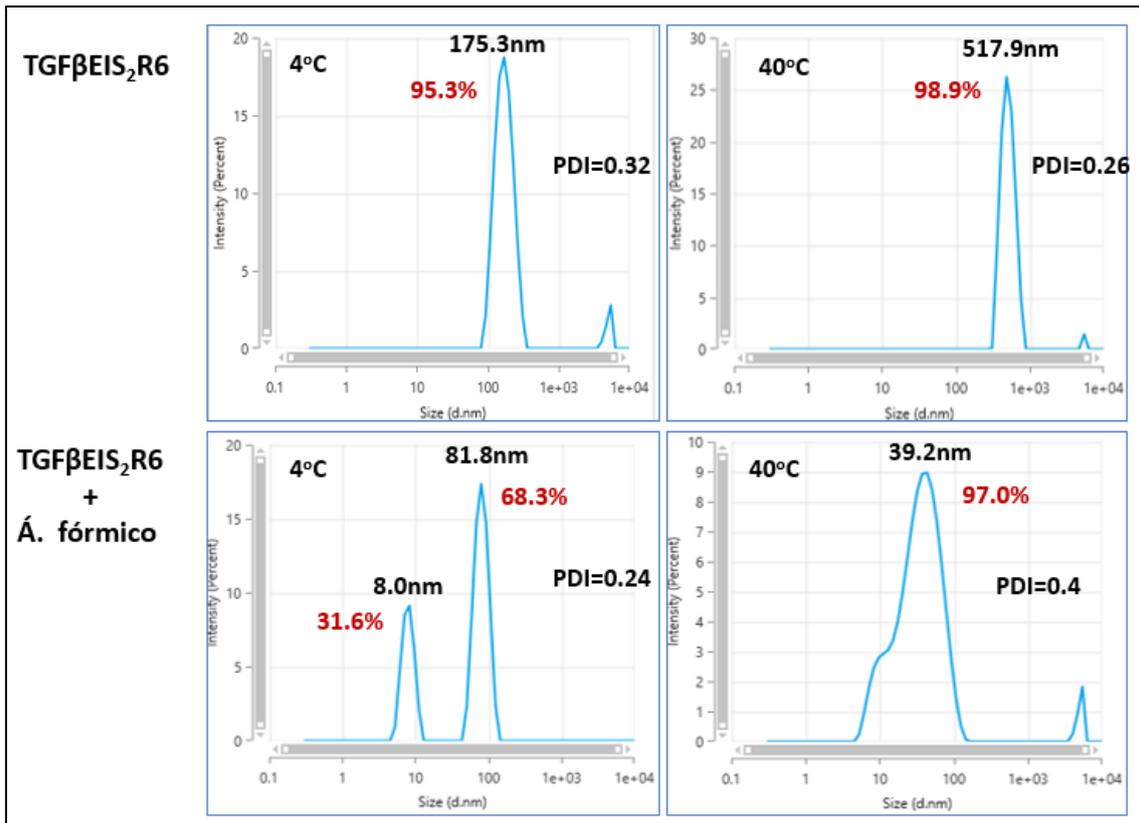


Figura 11 Distribución del tamaño de partícula de TGFβEIS₂R6

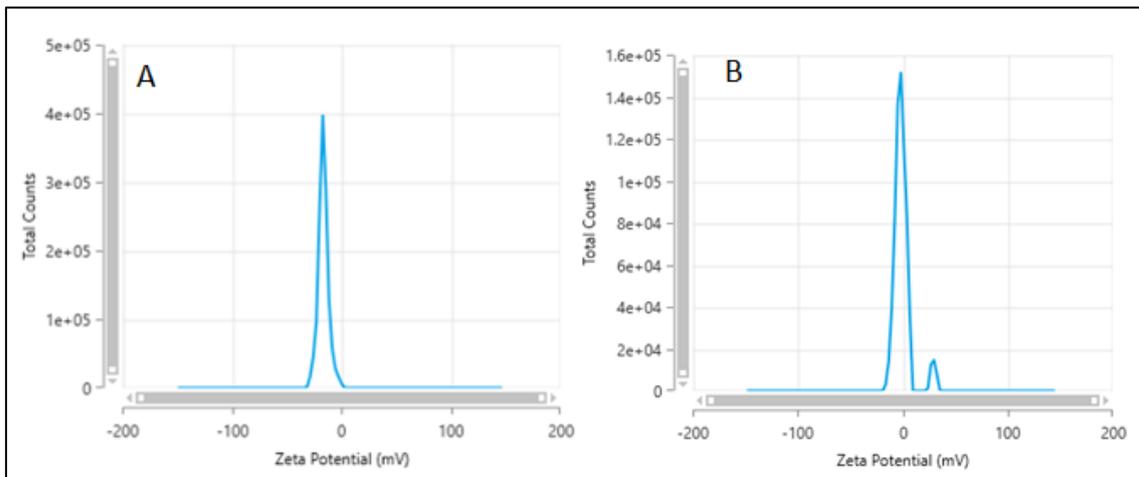


Figura 12. Distribución del potencial zeta de EIS₂R6 (A) y TGFβEIS₂R6 (B).

3.3.5. Gelificación de los polímeros

La formación de hidrogeles se llevó a cabo siguiendo lo descrito en el apartado 2.2.7.5. En las Figura 13 y 14 se muestra el comportamiento de gelificación de los polímeros. Estos fueron disueltos en H₂O mQ a 4°C incubándolos durante varias días hasta su completa disolución, lo cual se dificultaba debido a su alto índice de hidrofobicidad. Se observó el grado de gelificación de los mismos y se procedieron a calentar a 37°C hasta observar la formación de hidrogeles. El polímero EIS₂R6 fue capaz de formar hidrogeles a una concentración de 100 mg/mL y 120mg/mL al ser calentados a 37°C ON. Además, se realizó una prueba adicional con una concentración de 200 mg/mL y el polímero fue capaz de formar un hidrogel sin ser sometido a incremento de la temperatura. El polímero TGFβEIS₂R6 tuvo un

comportamiento similar, sin embargo, solo fue capaz de formar hidrogeles a la concentración de 120 mg/mL.

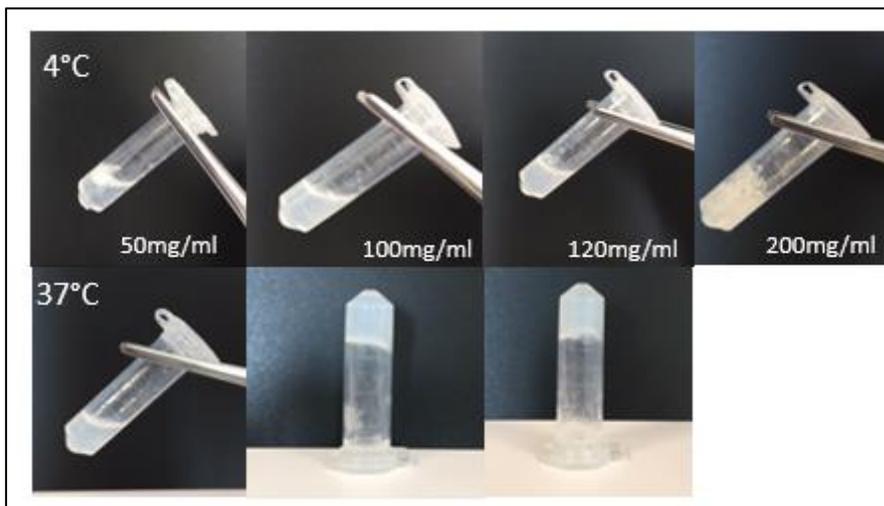


Figura 13. Gelificación de EIS₂R6

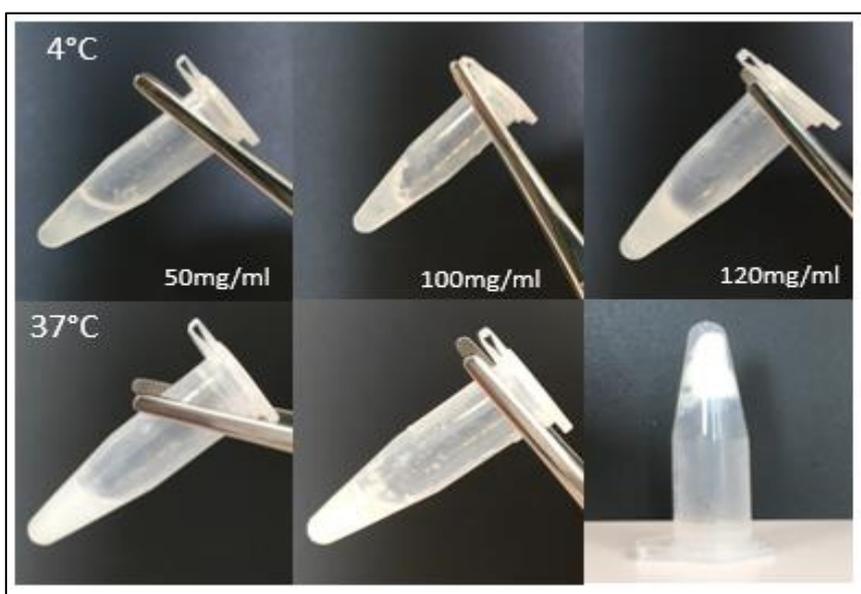


Figura 14. Gelificación de TGFβEIS₂R6

4. Conclusiones

Las conclusiones que se han podido determinar tras la realización de este trabajo son las siguientes:

- La producción y posterior purificación de los polímeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6 logró obtener un rendimiento de 111 mg/L y 7.56 mg/L respectivamente, siendo un buen rendimiento para el primero pero deficiente en el segundo. Este rendimiento deficiente puede ser debido a la secuencia proteica CM2 de reconocimiento por proteasas, que, si bien se hipotetiza pueda incrementar la actividad biológica del polímero, determinando la liberación del péptido bioactivo en el microambiente de la herida, dificulta la biosíntesis del mismo al ser potencialmente reconocido por proteasas endógenas de la bacteria.
- La caracterización de los polímeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6 ha permitido determinar que la producción y purificación de los mismos ha sido correcta y que poseen un comportamiento inestable en medio acuoso, donde a bajas temperaturas ya se encuentran en forma de agregados. Este comportamiento se debe a la espontánea formación de las láminas-β intra e intermoleculares como se esclareció tras el tratamiento con ácido fórmico.
- El polímero EIS₂R6 fue capaz de formar espontáneamente hidrogeles en medio acuoso a concentraciones de 100mg/mL y 120 mg/mL a la temperatura fisiológica y 200 mg/mL a 4°C y el polímero TGFβEIS₂R6 fue capaz de formar hidrogeles con una concentración de 120 mg/mL a la temperatura fisiológica.

5. Recomendaciones

- Realizar más técnicas de caracterización físico-químicas de sendos polímeros para analizar el comportamiento de agregación a bajas temperaturas y determinar la temperatura de transición exacta de los mismos.
- Realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad de polímeros como hidrogeles en la cicatrización de heridas.

6. Referencias Bibliográficas

1. Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nature biotechnology*. 2005;23(7):821-3.
2. Li Q, Wang D, Jiang Z, Li R, Xue T, Lin C, et al. Advances of hydrogel combined with stem cells in promoting chronic wound healing. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10:1038839.
3. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*. 2014;6(265):265sr6-sr6.
4. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine*. 2003;9(6):702-12.
5. Chambre L, Martín-Moldes Z, Parker RN, Kaplan DL. Bioengineered elastin-and silk-biomaterials for drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2020;160:186-98.
6. Santos M, Serrano-Dúcar S, González-Valdivieso J, Vallejo R, Girotti A, Cuadrado P, et al. Genetically engineered elastin-based biomaterials for biomedical applications. *Current Medicinal Chemistry*. 2019;26(40):7117-46.
7. Girotti A, Orbanic D, Ibáñez-Fonseca A, Gonzalez-Obeso C, Rodríguez-Cabello JC. Recombinant technology in the development of materials and systems for soft-tissue repair. *Advanced healthcare materials*. 2015;4(16):2423-55.
8. Girotti A, Gonzalez-Valdivieso J, Santos M, Martin L, Arias FJ. Functional characterization of an enzymatically degradable multi-bioactive elastin-like recombinamer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:1640-8.
9. Teijón JM. *Fundamentos de bioquímica estructural*: Editorial Tébar; 2006.
10. Maeda I, Fukumoto Y, Nose T, Shimohigashi Y, Nezu T, Terada Y, et al. Structural requirements essential for elastin coacervation: favorable spatial arrangements of valine ridges on the three-dimensional structure of elastin-derived polypeptide (VPGVG) n. *Journal of peptide science*. 2011;17(11):735-43.
11. Gray WR, Sandberg LB, FOSTER JA. Molecular model for elastin structure and function. *Nature*. 1973;246(5434):461-6.
12. Urry DW. Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics. *Journal of protein chemistry*. 1988;7:1-34.
13. Fernández-Colino A, Quinteros DA, Allemandi DA, Girotti A, Palma SD, Arias FJ. Self-assembling elastin-like hydrogels for timolol delivery: development of an ophthalmic formulation against glaucoma. *Molecular pharmaceuticals*. 2017;14(12):4498-508.
14. Girotti A, González-Valdivieso J, Alonso-Sampedro I, Escalera-Anzola S, Ramos-Díez S, Arias FJ. Elastin-like Polymers as Nanovaccines: Protein Engineering of Self-Assembled, Epitope-Exposing Nanoparticles. *Vaccine Technologies for Veterinary Viral Diseases: Methods and Protocols*: Springer; 2022. p. 41-72.
15. Kawabata S, Kawai K, Somamoto S, Noda K, Matsuura Y, Nakamura Y, et al. The development of a novel wound healing material, silk-elastin sponge. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2017;28(18):2143-53.
16. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *polymer*. 2008;49(8):1993-2007.
17. Ozaki C, Somamoto S, Kawabata S, Tabata Y. Effect of an artificial silk elastin-like protein on the migration and collagen production of mouse fibroblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2014;25(12):1266-77.
18. Wen Q, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin biomaterials in dermal repair. *Trends in biotechnology*. 2020;38(3):280-91.
19. Vaz ER, Fujimura PT, Araujo GR, da Silva CA, Silva RL, Cunha TM, et al. A short peptide that mimics the binding domain of TGF- β 1 presents potent anti-inflammatory activity. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136116.

20. ThermoFisherScientific 2023 [Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html>. Consultado el 25 de abril de 2023.
21. Girotti A. Desarrollo de una plataforma biotecnológicas para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina: Universidad de Valladolid; 2007.
22. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 Nature; 227; 259. S; 1970.
23. Sánchez Gutiérrez T. Desarrollo de nuevos sistemas poliméricos para regeneración tisular 2019.
24. Um IC, Kweon HY, Lee KG, Park YH. The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer. International journal of biological macromolecules. 2003;33(4-5):203-13.
25. Clogston JD, Vermilya A, NCL Method PCC-2: Measuring Zeta Potential of Nanoparticles. <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Consultado el 20 de mayo de 2023.

7. Anexos

Anexo 1. ABREVIATURAS

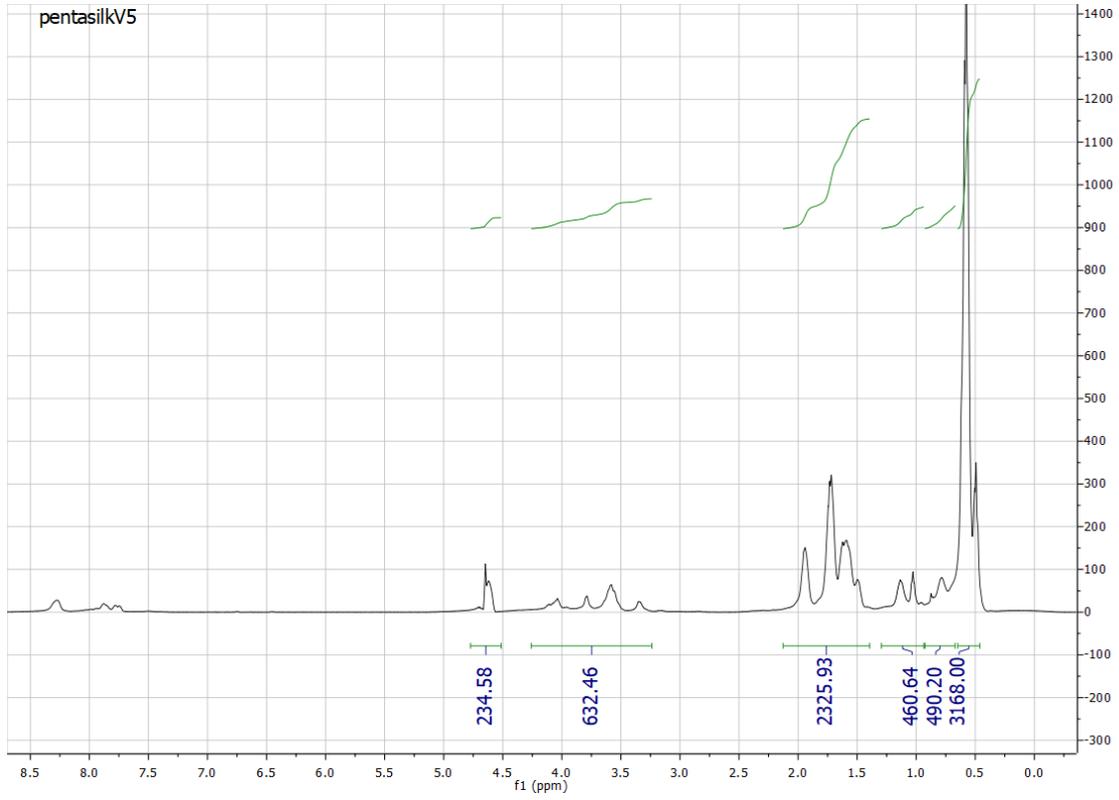
aa	aminoácidos
BBP	azul de bromofenol
bp/pb:	pares de bases
cfu	colony forming unit
Da	Dalton
DNA:	ácido desoxirribonucleico
DLS	dispersión dinámica de la luz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIS ₂	tetrabloque de elastina y fibroína
ELP	polímero tipo elastina (Elastin-Like Polymer)
g	aceleración de la gravedad estándar
h:	horas
H ₂ O mQ	agua ultrapura
ITT	transición inversa de la temperatura
ITC	ciclos de transición inversa
kD	kilo Dalton
2-ME	beta-mercaptoetanol
MEC	matriz extracelular
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
µL	microlitros
ON	overnight
PBS	tampón fosfato salino
PDI	índice de polidispersidad
PMSF	fluoruro de fenilsulfonilmetano
pDNA	DNA plasmídico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
SELP	polímeros tipo seda elastina
SLP	polímeros similares a la seda
Tt:	temperatura de transición
TEMED	tetraetilmetilendiamina

Anexo 2. Códigos de representación de los aminoácidos

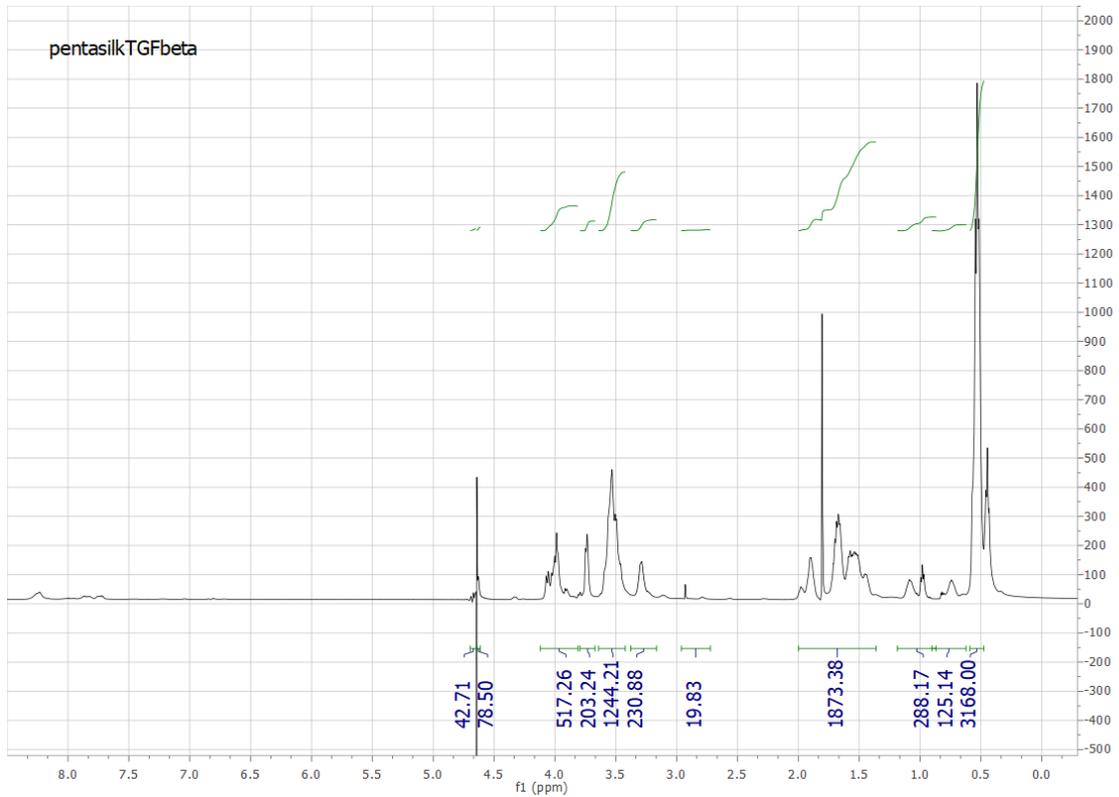
Nombre	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteina	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

Anexo 3. Espectros de RMN de los polímeros EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6

EIS₂R6



TGFβEIS₂R6



Anexo 4. Superposición de los espectros de EIS₂R6 y TGFβEIS₂R6

