



Universidad de Valladolid

TRABAJO FIN DE MÁSTER

# ‘Desarrollo de un hidrogel para la regeneración neuronal de lesión medular’

Máster en Investigación Biomédica y Terapias Avanzadas

**Autora:** Nuria Sáenz Ibáñez

**Tutores:** Dra. Alessandra Girotti

Dr. Francisco Javier Arias

Dr. Juan González Valdivieso

Valladolid 2023/2024

# ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
1.1. Lesión medular.....	2
1.2. Biomateriales e hidrogeles en biomedicina.....	3
1.3. Elastina y polímeros tipo elastina (ELP) .....	4
1.3.1. Elastina.....	4
1.3.2. Polímeros tipo elastina (ELP).....	4
1.4. Seda y polímeros tipo seda (SLP) .....	5
1.5. Polímeros tipo seda elastina (SELP) .....	5
1.6. Aplicación biomédica de los SELP como hidrogeles en la regeneración neuronal de la lesión medular.....	5
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Materiales.....</b>	<b>7</b>
3.1.1. Soluciones tamponadas.....	7
3.1.2. Soluciones de tinte.....	7
3.1.3. Material biológico.....	7
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>8</b>
3.2.1. Transformación bacteriana de pDNA con BLR (DE3).....	8
3.2.2. Bioproducción de polímeros.....	8
3.2.3. Recolección del polímero recombinante .....	9
3.2.4. Purificación de polímeros recombinantes mediante ciclos de transición inversa (ITC).....	9
3.2.5. Caracterización de polímeros .....	10
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>12</b>
4.1. Optimización de la bioproducción del recombinámero TGF $\beta$ (EIS) <sub>2</sub> RGD <sub>6</sub> V <sub>5</sub> H <sub>6</sub> 13	
4.2. Bioproducción del polímero .....	13
4.3. Purificación del polímero .....	14
4.4. Caracterización del polímero .....	15
4.4.1. Evaluación del contenido en polímero de las diferentes fracciones de purificación .....	15
4.4.2. Espectrometría de masas: MALDI-TOF .....	16
4.4.3. Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	17
4.4.4. Determinación del tamaño de partícula y curva de temperatura mediante DLS.....	20
4.4.5. Gelificación del polímero.....	23
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>24</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>25</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>28</b>

## RESUMEN

La lesión de la médula espinal (LME), expone una condición neurológica y patológica que conduce a una alteración motora y sensorial. Ocurre a causa de un trauma inesperado en la columna vertebral, que conlleva a una dislocación cervical y fracturas de las mismas. Actualmente, no existe un tratamiento clínico completamente eficaz para la reparación/regeneración de la LME. Los investigadores han propuesto el uso de biomateriales como una herramienta esperanzadora en las estrategias terapéuticas para la LME. El reto que supone el uso de biomateriales es la creación de un biomaterial capaz de actuar afín a la matriz extracelular (MEC). En los últimos años, se ha trabajado con un tipo de polímero de tipo seda-elastina, el cual presenta unas características fisicoquímicas ideales para esta patología, capaces de formar hidrogeles. Este trabajo se enfoca en la producción de un polímero con capacidad antiinflamatoria proveniente de los polímeros tipo seda-elastina: TGF $\beta$ (EIS)<sub>2</sub>RGD<sub>6</sub>V<sub>5</sub>H<sub>6</sub>. Para obtener este polímero se ha realizado una transformación bacteriana en una cepa de *E. coli* (BLR DE3), para posteriormente producir, purificar y caracterizar el polímero a través de diferentes técnicas (SDS-PAGE, MALDI-TOF, DLS y RMN). El resultado obtenido en el presente trabajo es determinante para el desarrollo de este polímero en la formación de hidrogeles como técnica terapéutica en la LME.

**Palabras claves:** Lesión de médula espinal, Polímeros tipo seda-elastina, biomateriales, hidrogeles, bioproducción, caracterización.

## ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) exposes a neurological and pathological condition that leads to motor and sensory alteration. It occurs due to unexpected trauma to the spine, which leads to cervical dislocation and fractures. Currently, there is no completely effective clinical treatment for SCI repair/regeneration. Researchers have proposed the use of biomaterials as a hopeful tool in therapeutic strategies for SCI. The challenge posed using biomaterials is the creation of a biomaterial capable of acting like the extracellular matrix (ECM). In recent years, work has been done with a type of Silk-Elastin type polymer, which has ideal physicochemical characteristics for this pathology, capable of forming hydrogels. This work focuses on the production of a polymer with anti-inflammatory capacity from Silk-Elastin type polymers: TGF $\beta$ (EIS)<sub>2</sub>RGD<sub>6</sub>V<sub>5</sub>H<sub>6</sub>. To obtain this polymer, a bacterial transformation has been carried out in a strain of *E.coli* (BLR DE3), to subsequently produce, purify and characterize the polymer through different techniques (SDS-PAGE, MALDI-TOF, DLS and NMR). The result obtained in the present work is decisive for the development of this polymer in the formation of hydrogels as a therapeutic technique in SCI.

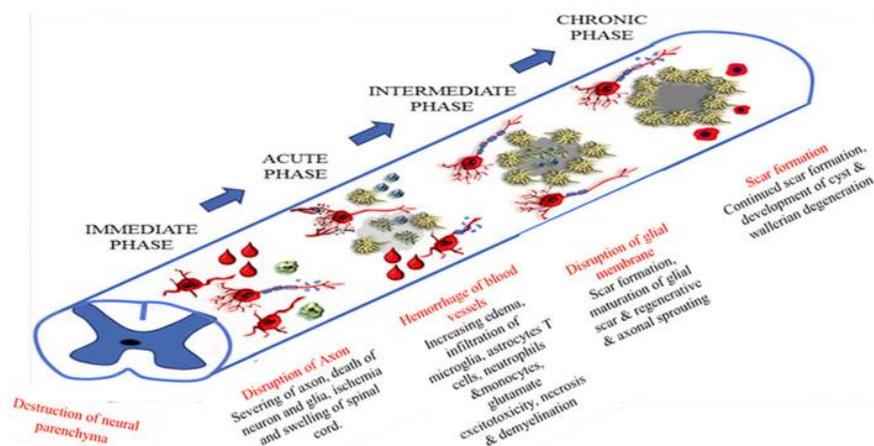
**Keywords:** Spinal cord injury, Silk-Elastin polymers, hydrogels, biomaterials, bioproduction, characterization

# 1. Introducción

## 1.1. Lesión medular

La lesión de la médula espinal (LME), expone una condición neurológica y patológica asoladora, que conduce a una alteración motora y sensorial del individuo que la padece. Este tipo de lesión suele ocurrir a causa de un trauma inesperado en la columna vertebral, lo que conlleva a una dislocación cervical y fracturas de las mismas (Anjum *et al.*, 2020).

La LME se divide en dos tipos de lesiones, primaria y secundaria. Por una parte, la lesión primaria ocurre inmediatamente tras la lesión (Ohnmar *et al.*, 2009; Katoh *et al.*, 2019), produciendo una modificación de la red axonal, así como de la membrana glial, además de una hemorragia y una destrucción del parénquima neuronal, lo que conlleva a un daño funcional completo, siendo escasos los segmentos que se mantienen unidos por algunos de los axones (Dimitrijevic *et al.*, 2015; Alizadeh *et al.*, 2019). Por otra parte, la lesión secundaria es producida por la lesión primaria y conlleva un deterioro químico y mecánico en los tejidos de la columna. El daño producido supone una excitotoxicidad neuronal debido a un aumento de calcio en el interior celular, que lleva consigo un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de los niveles de glutamato (Anjum *et al.*, 2020). Todo ello implica daños en el sistema como la isquemia, daño vascular, inflamación y vías apoptóticas, entre otros.



**Figura 1:** Acontecimientos tisulares en la lesión de médula espinal. Anjum *et al.*, 2020.

Debido a la alteración que sufren los vasos sanguíneos, originada por las hemorragias en el tejido espinal, hay una invasión de células del sistema inmune como macrófagos, células T y microglía, así como una liberación del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas, que producen una inflamación neuronal (Turtle *et al.*, 2019). La producción de interleucinas específicas aumenta en células como la microglía y los astrocitos (Colombo y Farina, 2016), además de existir una mejora en la producción de quimiocinas proinflamatorias M1 y M2 en este tipo celular por medio de la expresión de TNF- $\alpha$ , IFN-gamma y citocinas antiinflamatorias como son la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Asimismo, algo particular que presenta la LME es la cicatriz glial ocasionada por el aumento de astrocitos reactivos que van a actuar como una barrera de regeneración axonal. Este tipo de células van a proteger a las neuronas cuando se ocasiona un daño, contribuyendo a una homeostasis del microambiente y a la regeneración de la barrera hematoencefálica, previniendo de esta manera una infiltración de células inmunitarias. Por otro lado, se producen otras moléculas como citoquinas y factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Jeong *et al.*, 2021).

En este caso, el factor de crecimiento transformante (TGF-  $\beta$ ) se encuentra conformado por una serie de proteínas formada por más de 35 citocinas entre las que comprenden a las inhibinas, proteína morfogénica de hueso (BMP), activinas y al propio factor de crecimiento transformante (TGF-  $\beta$ ) (Sporn, 1999). Este tipo de citocina es considerada una citocina pleiotrópica ya que, presenta diferentes efectos en los diversos tipos celulares. Es en este caso, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-  $\beta$ 1) es el que presenta funciones relacionadas con la cicatrización de heridas, desarrollo y regulación inmunitaria. Una disfunción inmune mediada por este factor puede ocasionar ciertas condiciones patológicas, como la inflamación. La evolución inflamatoria crónica se califica por una continua liberación de citocinas proinflamatorias mientras que, su inhibición o bloqueo de las vías de señalización de estas citocinas son consideradas un objeto de tratamiento. Existen diversos péptidos desarrollados a partir de este factor pero, es el péptido sintético pm26TGF-  $\beta$ 1 conformado por 7 aminoácidos el que posee características antiinflamatorias y al mismo tiempo no posee quimioatracción de neutrófilos. Por lo que, este péptido presenta capacidades para ser útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Vaz *et al.*, 2015).

## **1.2. Biomateriales e hidrogeles en biomedicina**

Actualmente no existe un tratamiento clínico completamente eficaz para la reparación/regeneración de la LME. Los enfoques clínicos actuales se basan en la descompresión quirúrgica, la rehabilitación y los ensayos clínicos. En los últimos años, se han obtenido resultados muy prometedores en lo relacionado al estudio sobre estrategias de la LME que ayudarían a inhibir o disminuir procesos que ocurren en la lesión secundaria a través de la neuroprotección, detención de la inflamación y nuevas perspectivas a través de la neuroregeneración del tejido endógeno, realizados en animales de experimentación (Silva *et al.*, 2021).

Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos actuales no llegan a promover una recuperación eficaz, al igual que la mayoría de los tratamientos propuestos aún no han llegado a la clínica debido a los efectos secundarios que presentan. Estos efectos se deben principalmente a las vías de administración, que precisan dosis tan altas para obtener un efecto local que, hacen que se vuelvan incluso tóxicas, dañando otros órganos como el hígado (Lee *et al.*, 2019). Por todo ello, los investigadores han propuesto el uso de biomateriales como una herramienta esperanzadora en las estrategias terapéuticas para la LME. El reto que supone el uso de biomateriales es la creación de un biomaterial capaz de actuar afín a la matriz extracelular (MEC). Esta, presenta una serie de interacciones con las células difíciles de reproducir en los biomateriales ya que deben de presentar sensibilidad a proteasas, adhesión celular específica y liberación de citocinas, entre otras características (Fernández-Colino *et al.*, 2014). Además, desde un punto de vista constitutivo, la MEC presenta unas propiedades biofísicas influyentes en el comportamiento celular, estas propiedades hacen referencia a su carácter viscoelástico y fibrilar.

En particular, son los hidrogeles los biomateriales más usados en la actualidad. Su estructura reticular compuesta por un alto contenido en agua es su característica más distintiva, ya que presentan capacidad de ser similar al tejido nervioso. Estos hidrogeles son un tipo de biomaterial compatible con capacidad de rellenar la cavidad quística produciendo consigo un aumento del crecimiento axonal además de producir una diferenciación celular (Silva *et al.*, 2021). Además, por un lado, se trata de un material biodegradable por su rápida degradación a medida que va creciendo el nuevo tejido mientras que por otro lado tiene como misión no desencadenar una respuesta inmune para el huésped, todo ello es posible gracias a las propiedades mecánicas y fisicoquímicas que presentan (Assunção-Silva *et al.*, 2015).

### 1.3. Elastina y polímeros tipo elastina (ELP)

#### 1.3.1. Elastina

La elastina es la principal proteína elástica que se encuentra en todos los vertebrados. Se trata de una proteína esencial en la matriz extracelular (MEC) y en los tejidos ya que, aporta una serie de características fundamentales como son el retroceso elástico y la extensibilidad (Xiao *et al.*, 2021). La proporción de elastina que se puede llegar a encontrar en los tejidos va a depender de las características elásticas que el tejido requiera, así como de la estructura del mismo (Xiao *et al.*, 2021). Esta proteína es producida por diversos tipos celulares como son los fibroblastos, células endoteliales y células del músculo liso (Coenen *et al.*, 2018; Yeo *et al.*, 2018).

La elastina se encuentra conformada por un precursor nativo soluble que es la tropoelastina, una proteína soluble de baja complejidad que está conformada por motivos de secuencia primaria que se encuentran parcialmente repetidos en el interior de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, que se encuentran organizados de manera alterna (Wise y Weiss, 2009; Richard *et al.*, 2019). En cuanto a su estructura a nivel proteico, se encuentra conformada por aminoácidos no polares que engloba a aminoácidos tales como la prolina, valina, glicina y alanina. Esta proteína presenta dos dominios principales, un dominio reticular hidrofílico y un dominio elástico hidrofóbico, según las propiedades físicas y funcionales (Reichheld *et al.*, 2017). El dominio reticular hidrofílico en  $\alpha$ -hélice suele contener lisina y alanina espaciada entre las lisinas. Mientras que, los dominios hidrofóbicos con una conformación de espiral  $\beta$ , se encuentran formados por aminoácidos como la valina (V), prolina (P) y glicina (G), dando lugar a repeticiones en tándem de motivos VPGVG, siendo este último dominio elastomérico el que les confiere a las fibras de la proteína el comportamiento elástico (Xiao *et al.*, 2021).

La elastina se puede encontrar en dos estados, extendido o plegado, en el que se puede ir de un estado a otro a través del fenómeno de Transición Inversa con la Temperatura (ITT), fenómeno fisicoquímico basado en los cambios de estado que puede presentar un material como respuesta a los cambios en la temperatura (Figura 2). Y son estos cambios de temperatura conocidos como Temperatura de Transición ( $T_t$ ), por encima de la cual se genera un ensamblaje polimérico directo y rápido y por debajo de la cual la proteína está en forma de monómero, siendo la autoagregación el efecto final entre los dominios hidrofóbicos. La única manera de estabilizar la estructura es mediante la interacción de las moléculas de agua entre sí, siendo una hidratación obligada que se estabiliza por puentes de hidrógeno. Se trata de una interacción exotérmica que se forma a bajas temperaturas. En el momento en el que la temperatura aumenta se produce la rotura de la estructura y las moléculas comienzan a interaccionar entre sí produciéndose un plegamiento. En este caso se estaría generando un cambio hacia un estado plegado en el que la entropía aumenta al romperse la unión entre las moléculas de agua (Reichheld *et al.*, 2017).

#### 1.3.2. Polímeros tipo elastina (ELP)

Los polímeros tipo elastina (ELP, Elastin-Like-Polymers) son polímeros recombinantes que se han producido mediante tecnología recombinante (Arias *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2019). Se tratan de biopolímeros artificiales inspirados en la elastina natural, donde las secuencias de los mismos siguen un patrón similar a la elastina natural y donde se producen repeticiones de motivos del dominio elastomérico de la elastina, siendo el más repetido el pentapéptido VPGXG, siendo V valina, P prolina, G glicina y X cualquier aminoácido excepto prolina (Urry *et al.*, 2002), debido a que este tipo de aminoácido produce una desestabilización de la estructura de hélice  $\beta$ , conformada por giros tipo  $\beta$  continuos, del monómero de la elastina (Kowalczyk *et al.*, 2014).

Estos ELP presentan una estructura monótona que les atribuye un conjunto de características como son el comportamiento de autoensamblaje, la biocompatibilidad y

la capacidad de respuesta-estímulo, que los hacen distintivos (Ruff *et al.*, 2018), aunque, sin embargo, presentan complicaciones técnicas con relación a su síntesis (Deyling *et al.*, 2018). La creación de estos polímeros ha dado lugar a un gran número de ELP con propiedades específicas en las que hay una alta precisión y reproducibilidad de producción, así como una mayor complejidad a nivel molecular que han hecho que el uso de estos polímeros en aplicaciones biomédicas aumente con los años (Girotti *et al.*, 2022).

#### **1.4. Seda y polímeros tipo seda (SLP)**

La seda es una proteína fibrosa que se produce de manera natural, caracterizada por copolímeros de bloques que presentan repeticiones muy conservadas de ciertos aminoácidos de cadena lateral corta como representación de bloques hidrófobos y secuencias más cortas de aminoácidos de cadenas laterales más grandes en representación al bloque hidrofílico (Sarkar *et al.*, 2019). Esta conformación hace que tenga capacidad de autoensamblaje, asociada a su estructura secundaria. Una de las fuentes recombinantes de seda más estudiada es la secuencia de fibroína de seda proveniente del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*. Esta proteína presenta en su estructura una cadena pesada formada por secuencias de hexapéptidos ricas en alanina y glicina, donde los motivos más repetidos son: GAGYGA, GAGAGA, GAGAGY y GAGAGS, donde Y es tirosina, S serina, G glicina y A alanina (Chambre *et al.*, 2020). Estos dominios presentan capacidad para mediar interacciones físicas estables e irreversibles, dando lugar a una conformación en lámina  $\beta$ . Por lo que gracias a la estructura secundaria de la seda se generan polímeros similares a la seda (SLP, Silk-Like Polymers) que muestran propiedades específicas de resistencia mecánica, solubilidad, tasa de biodegradación y cinética de liberación de fármacos (Frandsen y Ghandehari, 2012).

#### **1.5. Polímeros tipo seda elastina (SELP)**

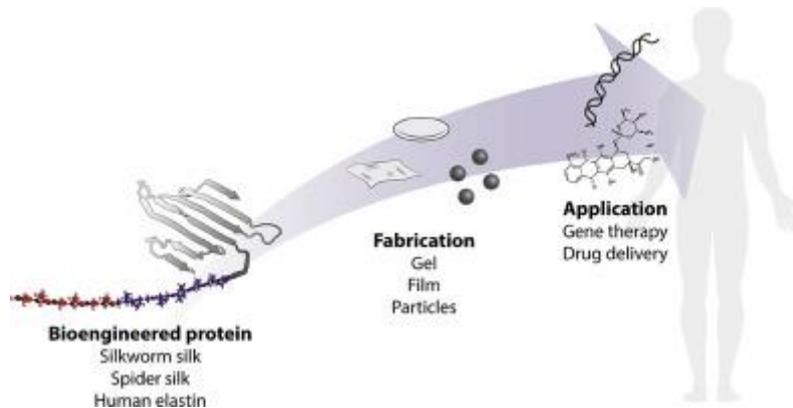
La asociación de los dominios estructurales de elastina y seda han ocasionado los denominados polímeros tipo seda elastina (SELP, Silk-Elastin Like Polymers). Este tipo de polímero se encuentra conformado por el bloque más común de la secuencia de la seda, (GAGAGS) y por el bloque más común de la elastina (VPGXG) (Hu *et al.*, 2010)

La combinación de ambos da lugar a que por una parte los SLP concedan una estabilidad sólida como consecuencia a las láminas  $\beta$ , lugares de entrecruzamiento físico para los SELP y capacidad de ajuste mecánico. Mientras que, por otro lado, los ELP ofrecen autoensamblado, biomimetismo y elasticidad entre otros. Por lo que, este tipo de polímero es muy eficaz en la administración de fármacos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y por ser graduable en términos de características mecánicas y vida útil de degradación (Chambre *et al.*, 2020).

#### **1.6. Aplicación biomédica de los SELP como hidrogeles en la regeneración neuronal de la lesión medular**

Actualmente, cada vez son más los estudios que se centran en la generación de hidrogeles usando péptidos naturales autoensamblables ya que, pueden llegar a unir las propiedades que presenta un hidrogel con las que presenta el polímero (González *et al.*, 2022). En este caso el uso de SELP para la formación de hidrogeles proporciona una estrategia alternativa para la regeneración neuronal de la lesión medular ya que, la seda-elastina a ciertas concentraciones es soluble en agua a temperatura ambiente y es capaz de llegar a formar hidrogeles a temperatura corporal. Por lo que, este tipo de polímero es capaz de autorregularse además de promover la migración de macrófagos y fibroblastos al sitio dañado, así como de favorecer la producción de colágeno de los fibroblastos (Ozaki *et al.*, 2014).

Los SELP para la formación de hidrogeles serían buenos candidatos debido a las propiedades que presentan tales como porosidad, inyectabilidad, polimerización in situ, biodegradabilidad, biocompatibilidad, altos índices de hinchamiento, consistencia blanda e inmunogenicidad, entre otros (González *et al.*, 2022).



**Figura 2:** Aplicación biomédica de hidrogeles tipo seda-elastina (SELP).  
Chambre *et al.*, 2020.

## 2. Objetivos

Bioproducción de un polímero tipo seda elastina con capacidad formadora de hidrogeles para un posterior uso en el campo de la biomedicina, con actividad antiinflamatoria para la regeneración neuronal de lesión medular.

### Objetivos específicos

- Bioproducción del polímero  $TGF\beta(EIS)_2RGD_6V_5H_6$  partiendo de una transformación bacteriana a partir de células competentes de *E. coli* específicas (BLR).
- Caracterización del polímero mediante técnicas fisicoquímicas como son SDS-PAGE, MALDI-TOF, DLS y RMN.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales

En el presente trabajo se han usado los siguientes reactivos químicos:

- Acetato de magnesio
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico; HCl
- Ácido etilendiaminotetraacético; EDTA.
- Albúmina sérica bovina; BSA
- Ampicilina.
- Azul de bromofenol.
- Bactotripton
- Butanol
- Cloruro de cobre (II) ( $\text{CuCl}_2$ )
- Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ )
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Ditioltreitol (DTT)
- DNA Marker: NZY DNA Ladder III
- Dodecilsulfato sódico (SDS)
- Etanol.
- Extracto de levadura.
- Fluoruro de fenilsulfonilmetano (PMSF)
- Glicerol
- Glucosa
- Isopropanol
- Kanamicina.
- Nzytech protein Marker, marcador de proteínas.
- Persulfato amónico (PSA)
- Poliacrilamida (acrilamida+bisacrilamida).
- SeaKem® LE Agarosa.
- SimplySafe™ - SYBR Safe®
- Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )
- Tetrametilendiamina (TEMED)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)
- B-mercaptoetanol.

##### 3.1.1. Soluciones tamponadas

- **Tampón de lavado celular (pH 7.6):** 20 mM Tris-base and 140 mM NaCl
- **Tampón de sonicación (pH 8):** 10 mM Tris-base 1 mM EDTA pH 8. Antes de su uso de añadió 1 mM PMSF.
- **Protein Loading buffer 5X (pH 6,5):** 0,3 M Tris, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) glicerol, 25 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% (w/v) azul de bromofenol en agua ultrapura tipo 1
- **SDS-PAGE Running buffer (pH 8,3):** 25 mM Tris-base pH 8,3, 192mM glicina y 0,1 % (w/v) SDS.

##### 3.1.2. Soluciones de teñido

**Disolución de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ):** 0,2 M de  $\text{CuCl}_2$  en 250 ml de agua destilada.

##### 3.1.3. Material biológico

###### 3.1.3.1. Cepas Bacterianas

La cepa de *Escherichia coli* (*E.coli*) utilizada en el presente trabajo es la cepa BLR (DE3) *competent Cells* (Novagen), con una eficiencia de transformación cfu/ug de pUC19 DNA  $\geq$  a  $10^6$ .

### 3.1.3.2. Medios de cultivos bacterianos

Los medios usados se han preparado siguiendo los protocolos ya optimizados para de esta manera alcanzar el mayor rendimiento. Los medios bacterianos usados son los siguientes:

- **LB (*Luria Bertani*):** 10 g/L de bacto triptona, 10g/L NaCl y 5g/L de extracto de levadura a pH 7, LB-Agar :LB, 1,5 % (p/v) Agar pH 7.
- **TB (*Terrific Broth*):** 12 g/L de bacto triptona, 24 g/L de extracto de levadura, 4 ml/L de glicerol,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6,8 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7,1 g/L, glucosa 0,5 g/L, lactosa 2 g/L y  $\text{MgSO}_4$  0,15 g/L, pH 7.

Todos los medios de cultivos se esterilizan en una autoclave 20 minutos a una temperatura de 120°C y 1 atm de presión.

### 3.1.3.3. Vector de expresión

En el presente trabajo se ha usado el vector de expresión pET7 Rare, construido en el laboratorio, un tipo de vector de expresión para *E. coli*. Este vector incluye el promotor T7lac y el represor lac, que se van a encargar de controlar la expresión del gen de interés.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Transformación bacteriana de pDNA con BLR (DE3)

La cepa empleada es adecuada para la expresión de proteínas o polímeros recombinantes de secuencia repetitiva, debido a la mutación en *recA*, que la hace menos propensa a recombinación homóloga no deseada y por ende, mejora la estabilidad de los plásmidos que contienen en su estructura el gen de interés. Además, para ello, se ha utilizado un plásmido específico (3.1.3.3. Vector de expresión) que contiene el gen de resistencia a ampicilina generando que crezcan en presencia de la misma aquellas que son capaces de incorporar el plásmido.

La transformación de las bacterias comerciales BLR (DE3) competentes se ha llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, respecto a los tiempos de incubación en frío y al choque térmico. Tras el tiempo de recuperación las bacterias se han sembrado en placas *Petri* LB con ampicilina 50 µg/mL y glucosa 1%, que se han incubado durante 16-24 h a 37°C. Luego, las placas donde se ha observado un crecimiento, son almacenadas a 4°C para un uso posterior

### 3.2.2. Bioproducción de polímeros

En la primera etapa se seleccionan las colonias a expresar entre las transformantes. Para seleccionar las colonias se lleva a cabo un screening de producción cuyo resultado se analiza mediante electroforesis SDS-PAGE. Realizar esta técnica nos va a permitir seleccionar la colonia más productora ya que será la que va a expresar el polímero en cantidades mayores y por tanto será de mayor rentabilidad respecto a las demás.

Una vez se realiza la selección de la colonia más productora se lleva a cabo el proceso de bioproducción de polímeros que consta de 3 etapas principales:

- **Pre-inóculo**, la colonia más productora es cultivada a 37°C durante 16h a una agitación constante de 250 rpm, en 5 mL de medio LB con un suplemento de glucosa al 1 % (w/v) y de ampicilina 50 µg/mL.
- **Inóculo**, se transfieren 100 µL del pre-inóculo a un *Erlenmeyer* estéril de 250 mL que contenga 50 mL de medio LB, ampicilina 50 µg/mL y glucosa al 1% . Se procede a la incubación durante 4h a 37°C, a una agitación constante de 250 rpm

- **Inoculación/producción**, donde una vez pasadas las 4 horas de la incubación del inóculo se preparan 16 Flask estériles, ya que se requieren 6,4L. A cada uno de los Flask se les añadirá 150 mL de LB, 250 mL de TB, 1 mL del inóculo ampicilina 50 µg/mL. Los Flask deben de contener un volumen de ¼ de su volumen para que permita la oxigenación y por ende un correcto crecimiento del cultivo. Se incuban durante 16h a 37°C en una agitación constante de 250 rpm.

### **3.2.3. Recolección del polímero recombinante**

Una vez han pasado las 16 h de incubación y el cultivo ha alcanzado una fase estacionaria en la que el número de células bacterianas es relativamente constante en un periodo de tiempo, se procede al aislamiento del polímero recombinante. Las bacterias productoras son recogidas en recipientes adecuados para ello de 2L y son centrifugadas a 4200 g a 4°C durante 15 minutos. Tras este proceso se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 100 mL de Buffer de lavado y se le somete a una centrifugación de 4200 g a 4°C, el proceso de lavado se repite 3 veces. Una vez que hemos conseguido lavar bien las bacterias, hay que proceder a la ruptura de las mismas mediante la sonicación. Para ello, se resuspenden las bacterias en tampón de sonificado al cual se le añaden inhibidores de proteasas. El tiempo de sonificado es de 30 minutos con 14 ciclos de 20 segundos a 4°C alternados a pausas para refrigerar. Con ello lo que se consigue es romper la pared y membrana plasmática de las bacterias para que se produzca la liberación del polímero al medio.

El lisado que se obtiene tras el proceso de sonicación es sometido a una centrifugación en condiciones de 15000 g a 4°C durante 60 minutos para separar la fracción soluble desde la insoluble. Finalmente, el sobrenadante de esta última centrifugación es el empleado para realizar la purificación del polímero, además de recoger muestras del pellet para su posterior análisis.

### **3.2.4. Purificación de polímeros recombinantes mediante ciclos de transición inversa (ITC)**

La purificación de polímeros recombinantes se realiza mediante un proceso conocido como Ciclos de Transición Inversa (ITC) el cual, tiene en cuenta una característica típica de estos polímeros como es la Transición Inversa con la Temperatura (ITT). Con esta técnica, se consigue obtener una purificación óptima del mismo gracias al uso de esta técnica y a las características que presenta el mismo.

En primer lugar, la fracción soluble del lisado después de la sonicación es sometido a un proceso de acidificación con ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH 4. Una vez se ha acidificado, esta solución es sometida a una centrifugación a 4°C y 15000 g durante 20 minutos para poder eliminar de esta manera las proteínas y los ácidos nucleicos que se han desnaturalizado. Seguidamente el sobrenadante obtenido es incubado a 60°C durante 2 h para de esta manera poder recuperar la proteína de interés. A esta temperatura, el polímero es capaz de formar agregados que suelen ser visibles a simple vista. Estos agregados pueden ser separados de la fracción solubles mediante una centrifugación a 30°C y 15000 g durante 20 minutos. En la fracción sólida se debería encontrar el polímero de interés y para su purificación son necesarios varios ciclos. En cada uno de los ciclos de purificación la fracción sólida que obtenemos tras la centrifugación a 30°C se resuspende a 4°C para de esta manera someter el pellet a una agitación durante 12 horas en 2 mL de agua desionizada) fría por litro de cultivo. Posteriormente la resuspensión es sometida de nuevo a ciclos de incubación a 60° C, centrifugación e incubación a 4°C, hasta 3 veces.

Una vez que se han realizado varios ciclos de purificación y se ha conseguido obtener una pureza óptima, el polímero es sometido a un proceso de diálisis para eliminar todas las sales que pudiese contener. Una vez terminada esta etapa, se

procede a la liofilización del mismo para obtener como producto final un polímero puro y seco.

### **3.2.5. Caracterización de polímeros**

#### **3.2.5.1. Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis en gel de acrilamida es una técnica muy usada en los campos de la biología molecular y la bioquímica, en la que su función principal es la separación de proteínas en función de su peso molecular.

Los geles utilizados en este caso son mini geles al 10 % bicomponentes, por un lado, el gel separador se encuentra formado por acrilamida 10% (v/v), bisacrilamida 0,4% (v/v), Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1% (w/v), persulfato amónico 0,05% (w/v) y TEMED al 0,05% (v/v). Por otro lado, el gel compactador se encuentra formado por acrilamida 3,9% (v/v), bisacrilamida 0,1% (v/v), Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1% (w/v), persulfato amónico 0,05% (w/v) y TEMED al 0,05% (v/v). Por otra parte, la intensidad de corriente a la que son sometidas los geles en esta ocasión es de un voltaje a 200V, durante 30 minutos.

Tras la finalización de la electroforesis, para la tinción del gel de poliacrilamida se ha usado una tinción negativa en cloruro de cobre, una reacción química indirecta que genera una imagen visible. Se ha utilizado este tipo de solución ya que el polímero en investigación no se tiñe con los agentes de tinción más comunes debido a su composición.

#### **3.2.5.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF**

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) es una técnica de alta precisión que se utiliza en el campo de la microbiología, proteómica, biomedicina, etc. Este tipo de espectrometría realiza un análisis cualitativo y cuantitativo de un extenso número de biomoléculas como proteínas, lípidos, metabolitos y azúcares, entre otros, además de átomos gracias a una disgregación de los iones que se separan en función de su masa/carga (m/q), por lo que estaríamos hablando de una técnica analítica muy precisa. En este caso para analizar la masa molecular experimental de nuestro polímero, se analizó una concentración de 4 mg/mL en agua desionizada, con una muestra de 50  $\mu$ L en el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Autoflex) (Matrix-Assiated Laser Desorption/Ionization acoplado al detector de vuelo Time-Of-Flight) con una resina de DHAP/DHAC y realizado por los técnicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid.

#### **3.2.5.3. Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta mediante DLS**

La técnica de dispersión de la luz dinámica o DLS es una técnica física que se basa en la medición del tamaño de partículas en la región submicrónica dispersas en un líquido. Se producen unas fluctuaciones aleatorias de la intensidad de la luz dispersada por las partículas que se encuentran en dispersión, a partir de lo cual se puede obtener el tamaño de las mismas. En el caso del potencial Z, es el encargado de evaluar la carga superficial de la partícula, con ello se va a obtener la estabilidad de la dispersión y la vida media de la partícula. En el caso del potencial Z un valor absoluto alto es indicio de una mayor estabilidad de partícula.

La muestra que se ha usado para determinar el tamaño de partícula en este caso, es el polímero a una concentración de 2 mg/ml en agua desionizada. Esta solución es filtrada con filtros de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 micras, para de esta manera poder separar partículas sólidas que se encuentren en el fluido, a través de un proceso conocido como filtración por tamizado. En el caso del potencial Z se ha usado la misma muestra con NaCl 10mM. Se determina el tamaño de partícula a

4°C (por debajo de la temperatura de transición) y luego a 37°C (por encima de la temperatura de transición teórica) en microcubetas plásticas ZEN0040 para las medidas del diámetro y DTS1070 para analizar el potencial Z. Las medidas se han llevado a cabo en el equipo Zetasizer Nano ZS Advance Pro Red Label (Malvern Ltd., Reino Unido) en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid.

#### **3.2.5.4. Análisis químico mediante RMN**

La resonancia magnética nuclear (RMN), es un método basado en el análisis químico, en la determinación de la estructura, dinámica e interacción molecular, en el que se somete a los núcleos atómicos a un campo magnético externo. Estos núcleos van a absorber radiación electromagnética a través de su región de frecuencias de radio o radiofrecuencias. Por lo que, la técnica es usada para poder determinar donde se hallan estos núcleos atómicos en el interior de la estructura molecular. Se trata de una herramienta muy útil para determinar la estructura de compuestos orgánicos.

En este caso, el ensayo de RMN de protón con el polímero se ha realizado a una concentración de 10mg de disuelto en 0.7mL de DMSO-D6 y se ha llevado a cabo en el espectrómetro RMN 500 Hz de Agilent Technologies del laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid.

#### **3.2.5.5. Prueba de gelificación de polímero**

En vista del impacto terapéutico que muestra el uso de hidrogeles en el campo de la biomedicina, se conoce que esta familia de polímeros presenta una alta capacidad de formación de hidrogeles estables por lo que, se ha llevado a cabo una prueba de gelificación del mismo para comprobar si nuestro polímero es capaz de formar un hidrogel. Se ha disuelto el polímero a 100 mg/mL (10wt %) en agua desionizada. Con ello se ha realizado una prueba de formación de gel a 4°C y a 37°C, se disolvió hasta obtener una solución homogénea y se le aplicó los diferentes cambios de temperatura, donde se procedió a una evaluación visual de la formación de hidrogel.

#### 4. Resultados y discusión

En el presente trabajo se ha realizado la bioproducción del polímero  $TGF\beta(EIS)_2RGD_6V_5H_6$ . Un polímero diseñado para formar espontáneamente hidrogeles para un uso posterior en la regeneración del LME.

Los genes que se han usado para poder llevar a cabo la producción del polímero han sido sintetizados previamente por el laboratorio de Biodispositivos Avanzados para Nanomedicina y clonados en el vector p7. Se obtiene finalmente el plásmido p7- $TGF\beta(EIS)_2RGD_6V_5H_6$ , esta secuencia se encuentra conformada por diferentes bloques, cada uno con unas funciones características (Figura 3).

El bloque EIS corresponde con el bloque anfipático que a temperatura y pH fisiológico se autoensambla para la formar un hidrogel. Donde E va a corresponder con el dominio hidrofílico de la elastina que contiene un 1,4 % del ácido glutámico, por otro lado I va a corresponder con el dominio hidrofóbico de la elastina donde se va a encontrar 10,11 % de isoleucinas, y por último el dominio S, un dominio derivado de la fibroína de la seda que adquiere estructura en de lámina  $\beta$  de manera irreversible. El bloque  $(EIS)_2$  produce la formación de hidrogeles de interacción física, no se produce un entrecruzamiento químico. A temperaturas mayores de la temperatura fisiológica, los bloques hidrofóbicos se unen y forman agregados con una zona extendida del bloque hidrofílico formando una red que cuanto más densa más fuerza presentará el hidrogel.



**Figura 3:** Representación del polímero  $TGF\beta(EIS)_2RGD_6V_5H_6$  y secuencia aminoacídica de los bloques que lo componen. Representación propia.

Sin embargo, hay una serie de bloques añadidos como es el bloque RGD (se repite 6 veces) extraído de un dominio de la fibronectina humana donde se incluyen 3 aminoácidos (arginina, glicina y ácido aspártico) el cual es un motivo de adhesión celular mediada por integrinas, que son receptores de superficie celular que se van a unir a proteínas en la matriz extracelular. Este bloque va a permitir la interacción celular y la interacción con muchos tipos de células que forman tejidos. También, nos encontramos con el bloque V5 que es una pequeña región que deriva de un epítipo que se localiza en las proteínas V y P del paramixovirus del virus simio 5 (SV5), el cual va a proporcionar un sistema eficaz para la detección inmunológica de la proteína diana. Y, por último, el bloque de seis Histidinas que nos va a permitir la purificación por cromatografía de afinidad IMAC. Además, el plásmido cuenta con un pequeño bloque derivado del TGF- $\beta$  en el extremo N-terminal que va a corresponder con los primeros aminoácidos del polímero, correspondiéndose con la parte con carácter antiinflamatorio del factor que es la que interesa para que se produzca una correcta regeneración de la lesión medular.

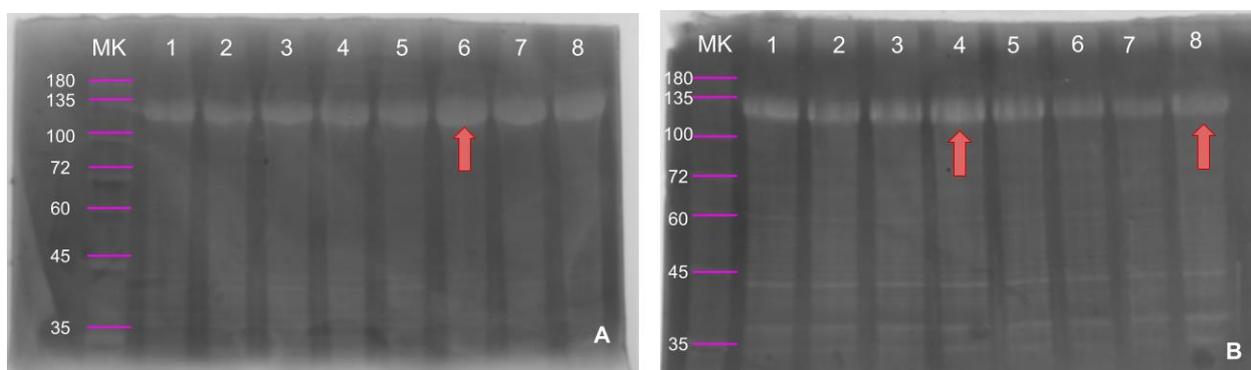
El gen insertado en el plásmido p7- $TGF\beta(EIS)_2RGD_6V_5H_6$  contiene 4485 pb y el polímero para el cual codifica ( $TGF\beta(EIS)_2RGD_6V_5H_6$ ) presenta un peso molecular teórico de 124.455 Dalton.

#### 4.1. Optimización de la bioproducción del recombinámero TGF $\beta$ (EIS)<sub>2</sub>RGD<sub>6</sub>V<sub>5</sub>H<sub>6</sub>

Puesto que el polímero utilizado en el presente trabajo es un polímero de nueva síntesis, ha sido necesario realizar determinados pasos de optimización para poder determinar cuáles son las condiciones óptimas para su producción.

El primer paso llevado a cabo ha sido la transformación en células competentes de una cepa bacteriana de expresión. Justo después de haber obtenido varias colonias transformadas, para la primera producción del polímero se eligieron 8 colonias al azar para averiguar cuál de todas ellas era la que presentaba una mayor expresión del polímero. Para ello se incubó cada colonia en medio TB complementado con ampicilina a 37°C durante 16 horas. Una vez transcurrido el tiempo indicado se realizó una electroforesis de proteínas SDS-PAGE o screening en la cual se comprobó cuál de las 8 colonias seleccionadas era la que había producido mayor cantidad del polímero. Como se puede ver en la Figura 4A, todas las colonias presentaban la aparición de una banda intensa en la zona situada entre los marcadores 100 y 136kDa con un nivel de expresión similar, pero se seleccionó la colonia 6, considerada la de mayor expresión. La colonia 6 fue aislada en una placa Petri LBGA por siembra en agotamiento, que se incubó durante 16 h a 37°C.

Sobre esta nueva placa Petri, se repitió el proceso anterior, realizándose en este caso un 2º screening. En este caso se volvieron a seleccionar 8 colonias de las cuales las que presentaban una mayor expresión eran las colonias 8 y 4 (Figura 4B). Cada una de estas colonias fueron aisladas y sembradas por agotamiento en una nueva placa Petri, se incubaron a 37°C durante 16 horas y una vez habían crecido, se guardaron a 4°C en el frigorífico para un uso posterior. Finalmente, para realizar la bioproducción del polímero se seleccionaron las colonias 6 del 1º Screening y la colonia 8 del 2º Screening.



**Figura 4:** 1º Screening, donde la colonia 6 presenta la mayor expresión (A) y 2º Screening donde las colonias 4 y 8 son las de mayor expresión (B).

#### 4.2. Bioproducción del polímero

Para comenzar con la bioproducción del polímero una vez seleccionadas las colonias de mayor expresión, se requiere que el medio LB sea integrado con glucosa y ampicilina. La glucosa se encarga de aportar a las bacterias una fuente de carbono primaria, por lo que el transcurso de las primeras fases se ve favorecido el crecimiento del cultivo, gracias a la misma. En una primera fase, las bacterias se alimentan de glucosa mientras esta tiene al operón Lac suprimido.

Una vez el cultivo ha alcanzado su fase exponencial de crecimiento, se realiza la inoculación y se deja incubar durante 16h a 37 °C. Cuando las fuentes de carbono principal se agotan, la glucosa y el glicerol, el cultivo bacteriano opta por otras vías de obtención de energía como es la lactosa, haciendo que haya la expresión del polímero y el crecimiento del cultivo de estabilice. Se llevó a cabo medidas de absorbancias de

las producciones para comprobar que efectivamente la producción había llegado a una fase de meseta en la que se comparan dos absorbancias con una diferencia de 30 minutos (Tabla 3) entre ambas para ver si son constantes, en el caso de que sí, se para la producción y se comienza con el siguiente paso del proceso. Como se puede observar en la tabla (Tabla 3), hay diferencia entre el t0 y t30 debido a un error relacionado con la recogida de la muestra, que conllevó a una recogida de muestra insuficiente e inadecuada.

**Tabla 2:** Valores de las Abs a 600 nm medidos durante la producción en Flask

Tiempo (min)	Colonia	A <sub>600</sub>
0	6	5.05
0	8	5.51
30	6	2.25
30	8	2.35

Posteriormente, se llevó a cabo la recolección de biomasa para el aislamiento del polímero que, para ello se realiza el lavado celular que ayuda a la eliminación de proteínas endógenas generadas por las bacterias, así como de cualquier otro contaminante que se encontrase en el medio. A continuación, las bacterias lavadas son sometidas a un proceso de sonicación. A lo largo de este proceso, las células van a sufrir una lisis bacteriana en la que se consigue romper tanto la pared bacteriana como la membrana plasmática produciéndose de esta manera una liberación del polímero al medio. Durante todo el proceso, el tampón de sonicado con el que se ha realizado la sonicación lleva una adición de inhibidores de proteasas como PMSF y benzamidina, que van a evitar que nuestra molécula polimérica sea degradada durante el proceso de lisis. Una vez terminado el proceso de sonicación, todo el lisado celular es sometido a centrifugación para de esta manera eliminar los restos celulares que no son de interés y obtener solo el polímero, que lo encontraremos en la parte del sobrenadante debido a su solubilidad a temperaturas bajas. La presencia o ausencia de polímero de los restos celulares debe comprobarse mediante SDS-PAGE.

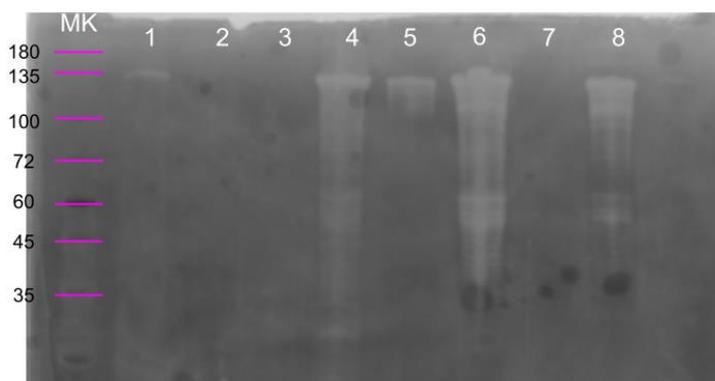
### 4.3. Purificación del polímero

La purificación de los ELP es un proceso mediante el cual hay una transición molecular en sus cadenas poliméricas que puede desencadenar en cambios en su estructura, este fenómeno es conocido como transición inversa con la temperatura (ITT), característico de este tipo de polímeros. Este proceso puede tener lugar por cambios en la temperatura, cambios en el pH o por adiciones de sal (Girotti *et al.*, 2022).

En esta transición de fases la molécula pasa de estar en una fase desordenada a ordenada debido a un aumento de la temperatura por encima de la temperatura de transición, se forman agregados debido a la generación de uniones hidrofóbicas en la molécula dando lugar a la formación de giros tipo  $\beta$ , que se estabilizan mediante estas interacciones. Por lo que, el agregado que se forma es sometido a centrifugación y a varios ciclos de calentamiento y solubilización por frío. A partir de ello se obtiene el polímero puro que es sometido a diálisis y posterior liofilización para obtener el polímero puro. A partir de este, se realizan las correspondientes caracterizaciones físico-químicas para su uso posterior en aplicaciones biomédicas.

El rendimiento del polímero TGF $\beta$ (EIS)<sub>2</sub>RGD<sub>6</sub>V<sub>5</sub>H<sub>6</sub> en su 1<sup>a</sup> producción fue de 49,43 mg/L mientras que, en la 2<sup>a</sup> producción fue de 7,09 mg/L. La diferencia que hay entre las dos producciones puede deberse a un fallo en el proceso de purificación del polímero en el que, debido a la no adición de sales durante el proceso para ayudar a la precipitación del polímero, la molécula no ha precipitado completamente y se ha perdido parte de la misma en la fracción soluble que más tarde se ha eliminado tras la

centrifugación. Por lo que se ha ido perdiendo parte del polímero durante el proceso. Por ello, la presencia o ausencia de polímero de los restos celulares debe comprobarse mediante SDS-PAGE, por lo que se ha realizado un seguimiento del proceso mediante esta técnica (Figura 5), en la que se puede observar bandas correspondientes al polímero en partes del proceso donde no debería encontrarse.



**Figura 5:** Análisis del proceso de purificación del polímero, donde: (1) pellet ácido, (2) sobrenadante 1ª purificación a 30°C, (3) resuspendido 1ª purificación, (4) pellet 2ª purificación a 4°C, (5) sobrenadante 2ª purificación a 30°C, (6) sobrenadante 3ª purificación a 4°C, (7) sobrenadante 3ª purificación a 30°C y (8) pellet final.

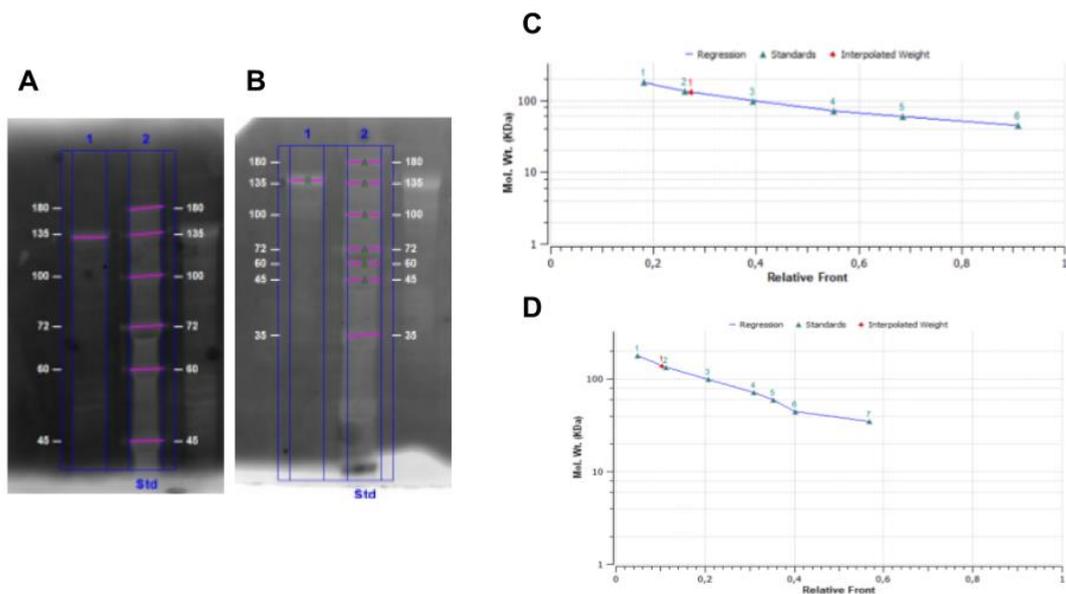
#### 4.4. Caracterización del polímero

Tras la finalización de la etapa de purificación, en el presente trabajo se han llevado a cabo la realización de diversas pruebas de caracterización del polímero TGFβ(EIS)<sub>2</sub>RGD<sub>6</sub>V<sub>5</sub>H<sub>6</sub> tales como SDS-PAGE, MALDI-TOF, DLS y RMN

##### 4.4.1. Evaluación del contenido en polímero de las diferentes fracciones de purificación

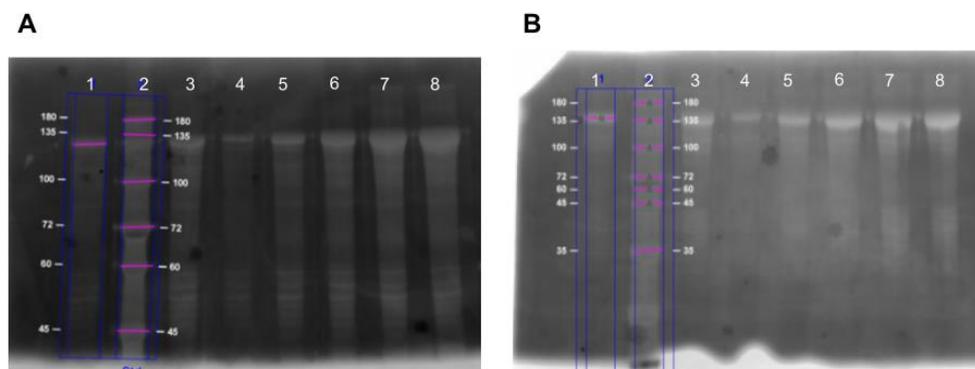
El análisis por electroforesis SDS-PAGE fue llevado a cabo a lo largo de todo el proceso de bioproducción para poder de esta manera caracterizar e identificar el polímero en cada paso del procedimiento.

En este caso, en la Figura 6 se puede observar el resultado final de ambas producciones. Por un lado, en la 1ª producción se ha obtenido un peso molecular aparente de 131,60 kDa, que viene determinado a partir del marcador de peso molecular mediante la curva de regresión lineal. Y, por otro lado, vemos la 2ª producción donde se ha obtenido un peso molecular de 140,46 kDa. En ambos casos se puede observar que el peso molecular experimental es mayor al teórico (124,45 kDa), esto puede deberse a un retraso electroforético en el transcurso de la electroforesis, típico en este tipo de polímeros, provocado por la hidrofobicidad que presenta la molécula a causa del bloque SILK y el bloque I que presenta esta molécula en su estructura.



**Figura 6:** Movilidad electroforética del polímero TGF $\beta$ (EIS) $_2$ RGD $_6$ V $_5$ H $_6$ , 1<sup>a</sup> producción (A,C) y 2<sup>a</sup> producción (B,D).

En el caso de la 1<sup>a</sup> producción se pueden observar la presencia de bandas a una altura de entre 45-60 kDa y 72-100 kDa, que pueden coincidir con una degradación del polímero ocasionada durante el proceso de purificación del mismo. Sin embargo, estas bandas no se observan en la 2<sup>a</sup> producción.



**Figura 7:** Electroforesis SDS-PAGE de ambas producciones, (A) 1<sup>a</sup> producción y (B) 2<sup>a</sup> producción. Siendo las concentraciones: (1) 1  $\mu$ g, (2) Marker, (3) 2,5  $\mu$ g, (4) 0,5  $\mu$ g, (5) 2  $\mu$ g, (6) 4  $\mu$ g, (7) 6  $\mu$ g y (8) 8  $\mu$ g.

Además, se realizó una electroforesis con diferentes concentraciones para encontrar una concentración óptima para poder separar las moléculas de interés y analizar su pureza. Una concentración óptima va a permitir una separación clara y eficiente de las moléculas, minimizando la superposición de bandas. De esta manera se preparó una dilución del polímero de 2 mg/mL, a partir de la cual, se fueron generando otras diluciones a diferentes concentraciones (Figura 7). El análisis del grado de pureza en las diferentes calles con el programa ImageLab nos arroja una pureza media del 89 y 93% respectivamente en ambas producciones.

#### 4.4.2. Espectrometría de masas: MALDI-TOF

Tras la realización de la espectrometría de masas se comprobó si el peso molecular experimental coincidía con el peso teórico. En el caso de la 1<sup>a</sup> producción el

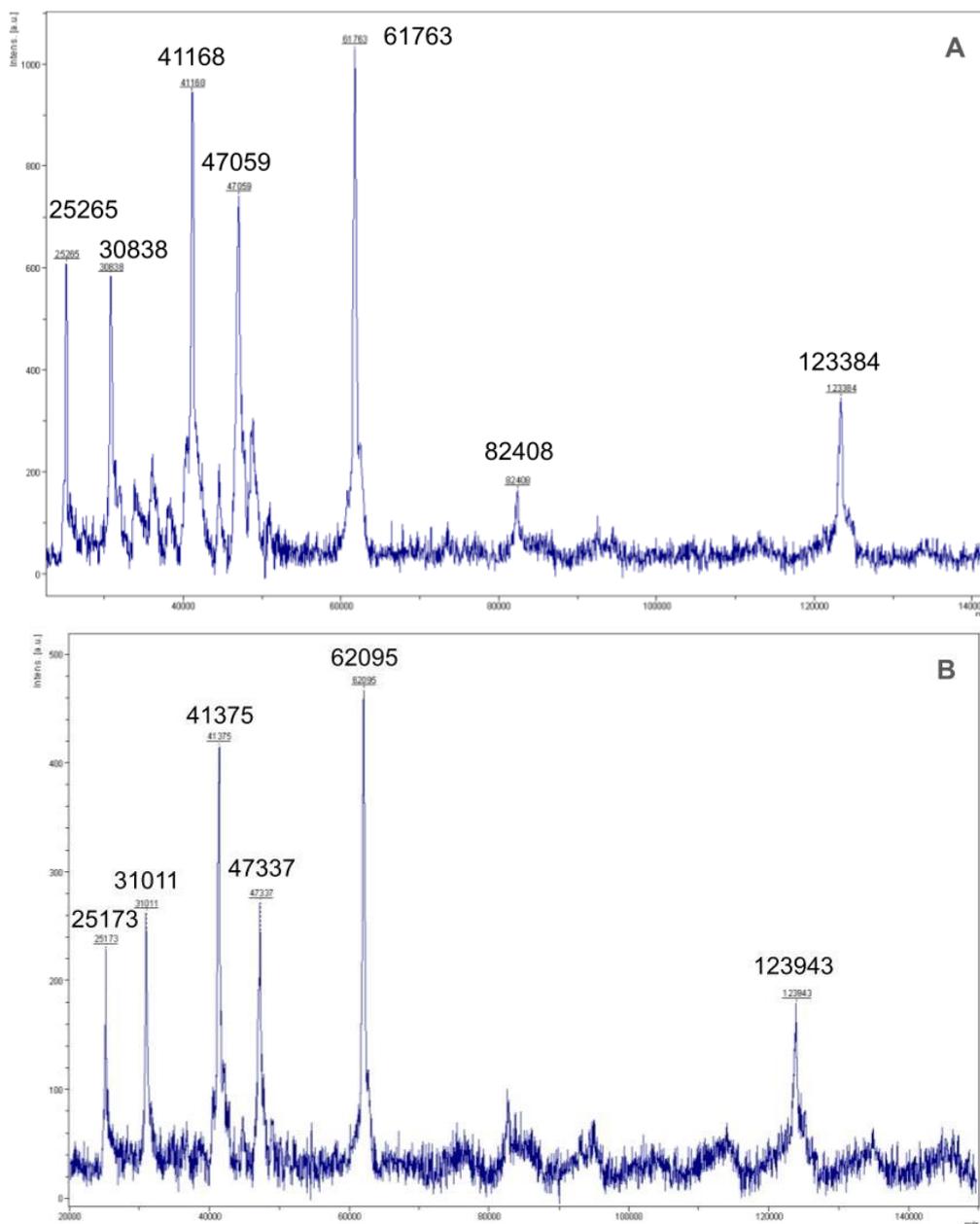
pico que corresponde al peso molecular de nuestro polímero es el monocargado ( $z=1$ ) (Figura 8A), en este caso el peso molecular medio es de  $123390,66 \pm 11,54$  Da. Este dato correspondería con el peso molecular teórico con un 0,85 % de desviación respecto al valor teórico. Y, en el caso de la 2ª producción (Figura 8B), el pico monocargado correspondiente a nuestro polímero tendría una masa molecular media de  $123945,33 \pm 23,58$  Da, que se corresponde con el peso molecular teórico con un 0,40 % de desviación. En lo referente a la 1ª producción, entre el peso experimental y el peso teórico hay una diferencia de 1kDa aproximadamente. Esto indica que posiblemente se haya producido una pérdida de aminoácidos en el proceso de producción del polímero. Podría tratarse de aminoácidos básicos, ya que son de fácil degradación por acción de proteasas endógenas de la bacteria parecidas a la tripsina. Suponemos que puede haber sucedido justo en el primer bloque, TFG- $\beta$ , el cual es un bloque principal de la presente investigación. Además, como se puede observar en la imagen de la 1ª producción, hay diversos picos con diferentes valores, donde vamos a encontrar el peso dicargado ( $z=2$ ) con un peso de 61763 m/z (Da), también el tricargado ( $z=3$ ) con un peso de 41168 m/z (Da), y por último, el tetracargado ( $z=4$ ) con un peso de 30838 m/z (Da). Por otro lado, se pueden observar dos valores que son 47059 m/z y 82408 m/z que corresponderían con impurezas, las cuales se pueden observar en la Figura 4A.

En cuanto a la 2ª producción hay diversos picos con diferentes valores, donde vamos a encontrar el peso dicargado ( $z=2$ ) con un peso de 62095 m/z (Da), también el tricargado ( $z=3$ ) con un peso de 41375 m/z (Da), y por último, el tetracargado ( $z=4$ ) con un peso de 31011 m/z (Da). Por otro lado, se pueden observar un valor correspondiente a 47337 m/z (Da) que podría corresponderse a una impureza pero en la Figura 4B no hay constancia de ninguna banda con un peso similar, por lo que podría ser debido a una degradación.

#### **4.4.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Se ha llevado a cabo un ensayo de RMN de protón del polímero TGF $\beta$ (EIS)<sub>2</sub>RGD<sub>6</sub>V<sub>5</sub>H<sub>6</sub>, con el objetivo de comprobar su composición química y averiguar si el número de protones teóricos que presentan los aminoácidos del polímero en su estructura concuerda con la señal que asigna el RMN (Figura 9).

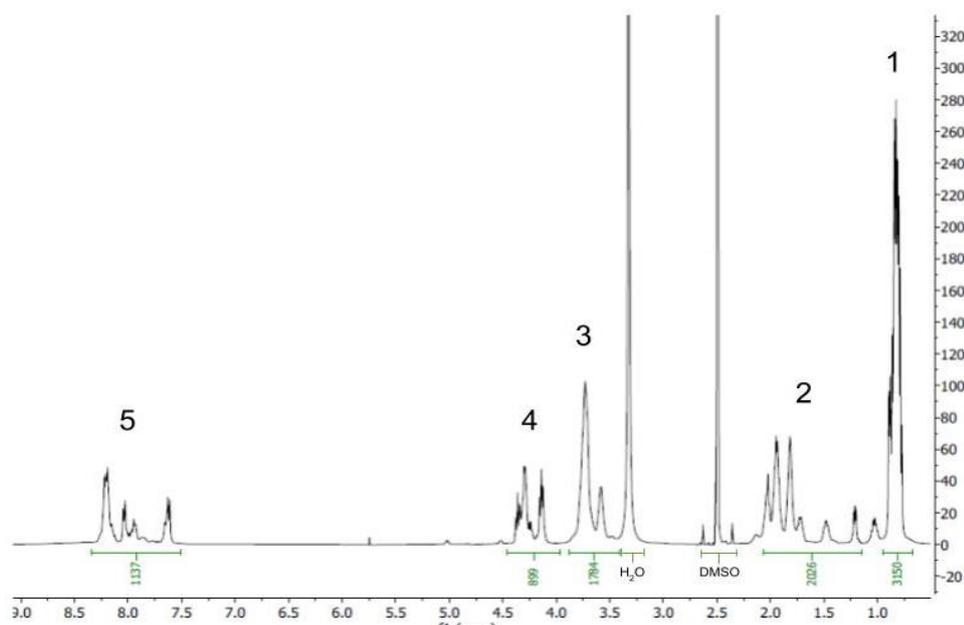
La técnica se ha realizado en DMSO-D<sub>6</sub> como disolvente y 10 mg/ml del polímero disuelto. El DMSO es usado como disolvente por numerosas ventajas entre las que destaca: (1) pico de referencia interno, en el que el grupo metilo de este compuesto no va a interferir con el resto de las señales orgánicas de la muestra, por lo que sirve como calibrador del RMN, (2) ausencia de protones resonantes y (3) viscosidad moderada, entre otras.



**Figura 8:** Espectro de masas del polímero TGFβ(EIS)<sub>2</sub>RGD<sub>6</sub>V<sub>5</sub>H<sub>6</sub>, (A) 1<sup>a</sup> producción y (B) 2<sup>a</sup> producción.

Una vez se ha obtenido el espectro, las señales son integradas a partir del Software MestReNova 12.0. En este caso, para comenzar con la integración hay que tener en cuenta que los grupos metilo presentan 3 protones, por lo que su señal va a ser el triple que un grupo CH que solo presenta un protón, así que, a la hora de realizar la integración hay que multiplicar el valor de los grupos metilo por 3, al igual que con el grupo CH<sub>2</sub>, se debería multiplicar por 2 debido a que su señal es el doble dado a por los dos protones que presenta. Por lo que, para comenzar con la integración de señales, hay que tomar como referencia el primer pico (pico 1) que presenta un valor de entre 0,25-1 ppm, el cual corresponde con los grupos metilo (CH<sub>3</sub>), y al que hay que asignarle un valor de 3150 (Tabla 4) según la composición teórica del polímero. A partir de esto, el programa reasigna los valores a los picos restantes, los cuales deberían coincidir con los valores experimentales calculados (Tabla 4). Por otro lado, los picos mayoritarios

que se pueden apreciar en el espectro corresponden con el disolvente usado (DMSO) y el agua residual.



**Figura 9:** Espectro de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) del polímero  $\text{TGF}\beta(\text{EIS})_2\text{RGD}_6\text{V}_5\text{H}_6$ .

**Tabla 4:** Número de protones teóricos y experimentales en referencia a la estructura del polímero

Picos	Grupos	aa	Valor teórico	Integral	Valor experimental	Desviación %
1	CH <sub>3</sub>	A, I, L, M, T y V	1050	3150	3150	0
2	CH <sub>2</sub>	R, N, D, E, Q, H, I, L, K, M, y P	735	1965	2026	3,10
	CH	I, L y V	495			
3	CH <sub>2</sub> α	R, G, K, M, P y S	903	1818	1784	1,87
	CH unido a heteroátomo	F, y H	12			
4	CH α	A, R, N, D, E, Q, H, I, L, K, M, P, S, T, y V	893	893	899	0,67
5	NH peptídico	A, R, N, D, G, E, Q, H, I, L, K, M, S, T, y V	1233	1233	1137	7,78

De manera que, en la Tabla 4 hay representaciones de diferentes grupos de protones que provienen de diferentes aminoácidos. En este caso, el pico 1 que está conformado por el grupo CH<sub>3</sub>, siendo el mayoritario, viene dado por alanina, isoleucina,

leucina, metionina y valina. El pico 2, formado por los grupos CH<sub>2</sub> y CH, donde el primero de ellos lo componen todos los aminoácidos excepto alanina, glicina, serina, treonina y valina mientras que, el segundo grupo solo lo conforman la isoleucina, leucina y valina. El pico 3, contiene los grupos CH<sub>2</sub>  $\alpha$  y CH unido a heteroátomos, donde en el primer grupo encontraremos a la arginina, cisteína, glicina, lisina, metionina, prolina y serina mientras que en el segundo grupo encontramos a la fenilalanina, histidina, tirosina y triptófano. El pico 4, contiene al grupo CH  $\alpha$ , donde se encuentran todos los aminoácidos excepto la glicina. Y por último, el pico 5 contiene el grupo NH del enlace peptídico, donde encontramos a todos los aminoácidos excepto a la prolina. Por otro lado, como se puede apreciar en la Tabla 4, hay diferencias entre los valores teóricos y experimentales dentro de los propios grupos, sin llegar a pasar el 10 % de desviación, por lo que podría considerarse una buena correlación considerando que la composición experimental de los grupos químicos es compatible con la teórica.

#### **4.4.4. Determinación del tamaño de partícula y curva de temperatura mediante DLS**

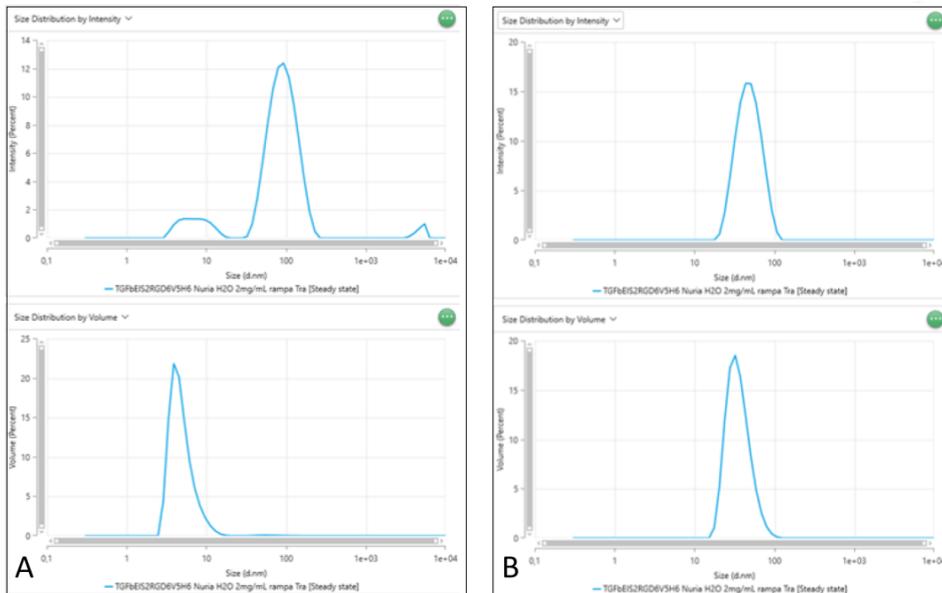
Hasta el momento se ha realizado una caracterización química de la molécula y ahora continuaremos con una caracterización física en la que se observará cómo se comporta la molécula con los cambios de temperatura en una escala nanoscópica.

La dispersión dinámica de la luz o DLS, es una técnica física utilizada para la determinación del tamaño de partícula en suspensión, así como la temperatura de transición del polímero. Al realizar la medición del diámetro hidrodinámico de las partículas de la muestra, si presentan un índice de polidispersidad (PDI) cercano a 0,1 indicaría que la partícula se encuentra monodispersa mientras que, si es cercano a 1 las partículas estarían polidispersas. En el caso de la muestra presentar valores cercanos a 0,1 mostraría una distribución uniforme del tamaño de las partículas. Por otro lado, el potencial Z al igual que la dispersión dinámica de la luz, es un parámetro físico a partir del cual se evalúa la carga superficial de las partículas a partir del cual se va a predecir la estabilidad de la dispersión. En el caso de esta técnica, valores altos ( $\pm 20$ mV) indicarían una dispersión estable ya que se considera que hay una repulsión electrostática suficiente entre las nanopartículas para que no se agreguen.

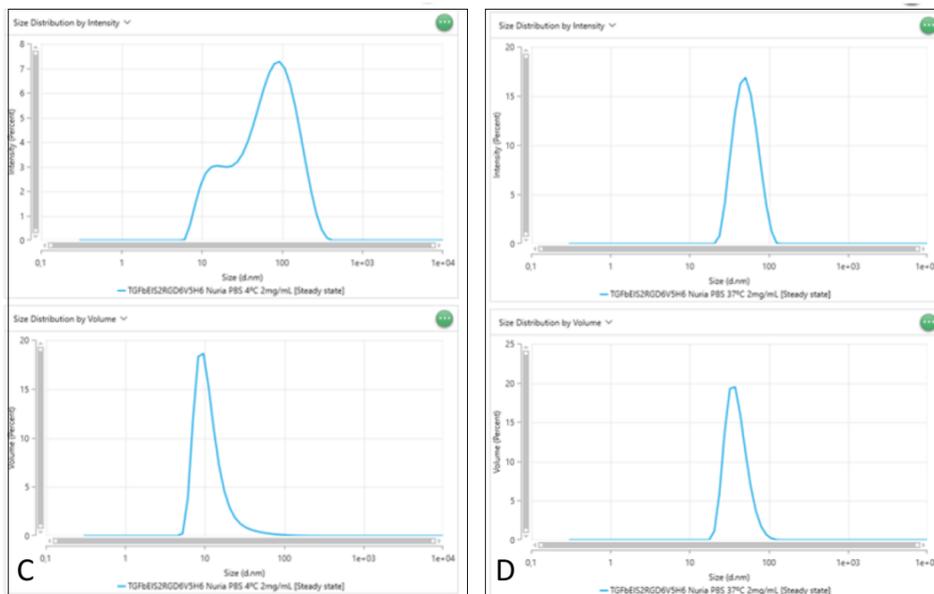
En este caso, para realizar la determinación del tamaño de la partícula, se ha usado se han usado dos dispersantes que son agua desionizada y PBS. Con el PBS lo que queremos observar son condiciones más fisiológicas ya que se encarga de controlar el pH y aporta una condición osmótica, y hace que la muestra sea más hidrofóbica porque apantalla la carga de las partículas. En este caso, se ha usado 2 mg/ml del polímero en disolución y ha sido filtrado para eliminar todas aquellas partículas no deseadas que pudiesen interferir en la determinación del tamaño de las partículas del polímero. Para comenzar con las medidas, en primer lugar, se ha realizado una medida a 4°C con agua (Figura 10A), donde se puede observar una primera distribución por intensidad (superior) con 3 picos: un primer pico (8-10nm) de tamaño reducido con moléculas no agregadas, un segundo pico ( $\approx 100$ nm) de gran intensidad y mayor estado de agregación y un tercer pico mucho menos intenso, pero con un diámetro en la escala micro. Por lo que tenemos es una molécula con 3 estados diferentes al mismo tiempo. Sin embargo, cuando analizamos esta misma muestra en la distribución por volumen (gráfica inferior) se puede observar un único pico. En este caso, este pico corresponde con el componente de menor tamaño de la 1ª gráfica, lo que nos indica que la dispersión se magnifica cuanto mayor es el tamaño de la partícula y que en estas condiciones (H<sub>2</sub>O/4°C) el estado más representado (99.57%) es el de la molécula no agregada. Por otro lado, cuando se realiza la medida a 37°C y se analizan las gráficas (Figura 10B), se observa un solo pico, en ambas distribuciones, lo que nos estaría indicando que la molécula se agrega cuando es calentada en una nanopartícula única de diámetro medio 44.7nm. En este ensayo, el índice de polidispersidad (PDI) de la medida en agua a 4°C es de 0,56 lo que indicaría que la molécula se encuentra polidispersa pero sin embargo,

en el caso de la medida a 37°C, el PDI es de 0,10 indicando que la molécula se encuentra monodispersa. Prosiguiendo con el experimento, la siguiente medida se realizó en PBS. En la medida que se realizó a 4°C (Figura 10C) se pueden observar dos picos solapados (10-100nm) que cuando se analiza la distribución por volumen (gráfica inferior), tan solo encontramos el pico correspondiente al de menor diámetro. En el caso de la medida a 37°C (Figura 10 D) se vuelve a observar un único pico que indicaría que la molécula se ha segregado en una nanopartícula de diámetro medio 48.9nm. Esto confirma una correcta agregación de la molécula con el cambio de temperatura en ambos medios.

### AGUA



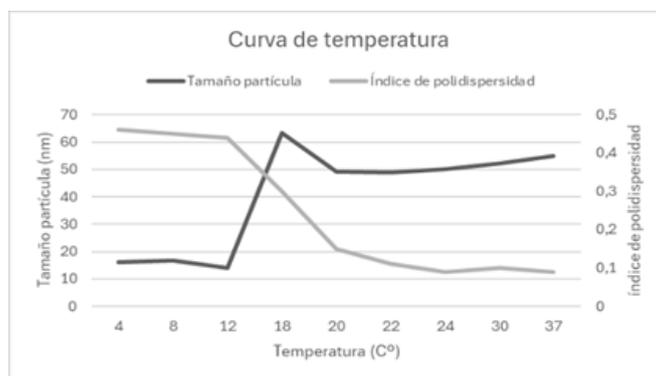
### PBS



**Figura 10:** Determinación del tamaño de partícula mediante DLS. Muestra en dos dispersantes diferentes, por un lado muestra en agua a 4°C (A) y muestra a 37°C (B). Y por otro lado, muestra en PBS a 4°C (C) y a 37°C (D). En cada bloque se muestra la distribución por intensidad en la parte superior y por volumen en la inferior.

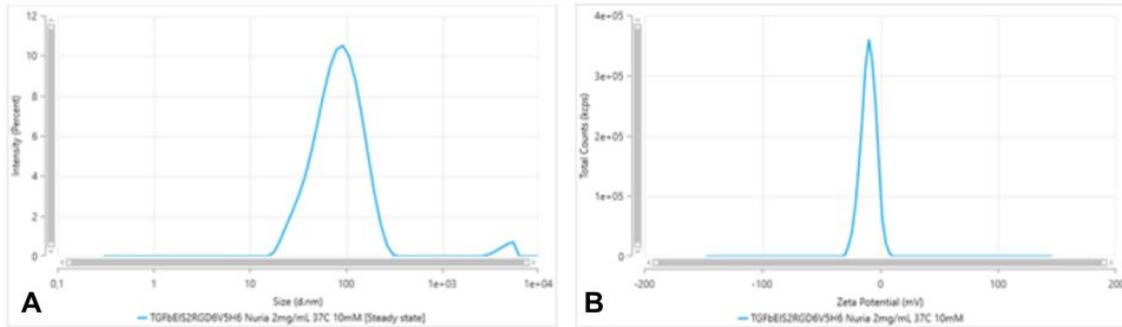
En lo referente al PDI, a 4°C es de 0,44 donde la molécula se presenta polidispersa y, sin embargo, a 37°C el índice es de 0,09 que indicaría una partícula monodispersa. Por lo que tras la realización de ambos experimentos se ha observado que el comportamiento que presenta el polímero es característico de los ELPs, donde a bajas temperaturas se encuentra en un estado relajado y extendido con un tamaño de partícula nanométrico correspondiente a la molécula mientras que, a unas temperaturas superiores a la temperatura de transición experimenta un cambio de estado a agregado y ordenado con un tamaño de partícula mayor.

Además, se realizó una rampa de temperatura en PBS, donde se hacían medidas cada dos minutos a temperaturas crecientes para de esta manera comprobar en qué momento ocurría esa transición de un estado relajado y extendido a un estado agregado y ordenado. Como se puede observar en la Figura 11, entre los 12-18°C hay un cambio en la molécula con un aumento en el tamaño de la muestra que correspondería con la transición hacia el estado de agregación. La temperatura de transición en polímeros con estructura similar suele estar sobre los 15°C por lo que se considera que el resultado obtenido es congruente. Y, por otro lado, se añadió a estos parámetros la variación del PDI (Figura 11), donde se puede observar como cuando ocurre esa transición el índice de polidispersidad disminuye, coincidiendo con una muestra que se considera monodispersa.



**Figura 11:** Análisis por DLS y rampa de temperatura de la muestra en PBS donde se estudia (trazo negro) el cambio en el estado del diámetro de las partículas y (trazo gris) la variación del índice de polidispersidad.

Por otro lado, se realizó la medida del potencial Z para analizar la carga superficial de la nanopartícula resultante. En este caso se usó la misma muestra que la del experimento anterior pero, esta vez el dispersante utilizado fue agua más 10 mM de NaCl y la temperatura fue de 37°C. En este tipo de medida las partículas son sometidas a un campo eléctrico en el que se va a analizar su movimiento en función de sus cargas superficiales y su tamaño. En la figura 12A se muestra el análisis previo del tamaño de la partícula para comprobar que obtenemos un tamaño similar respecto a los experimentos anteriores, en este caso con un pico mayoritario que indicaría que la molécula se encuentra en su estado de agregación. Mientras que en la Figura 12B que se corresponde con el potencial Z, se observa un solo pico que corresponde con una carga de -10, lo que indica que su carga superficial es negativa debido a los carboxilatos de los bloques hidrofílicos que están expuestos, en este caso del glutamato. Como se ha comentado anteriormente, un valor cercano a  $\pm 20$  indicaría que estamos frente a una partícula estable, por lo que en este caso no estaríamos cerca de un comportamiento estable. En el caso de esta molécula, como presenta el bloque Silk, no se llegaría a obtener una estabilidad completa porque estos bloques tienden a agregarse entre ellos. Por lo que, tras la realización del experimento se comprueba que su comportamiento es el esperado.



**Figura 12:** Análisis por DLS del tamaño de partícula (A) y medida de las interacciones electrostáticas entre partículas (potencial Z) (B).

#### 4.4.5. Gelificación del polímero

Tras los estudios del biopolímero a escala molecular y nano, en este caso se pretende realizar un estudio a escala macroscópica. Como se ha descrito, este tipo de polímero complejo presenta diversos bloques en su estructura, en el que el bloque  $(EIS)_2$  se corresponde con el bloque anfipático en el cual se puede observar gracias al cambio de temperatura que produce la formación de agregados y el bloque S (Silk) que es el encargado de formar hojas plegadas  $\beta$  dando lugar a la estabilización del mismo. Para que se puedan llegar a formar hidrogeles hace falta concentraciones suficientemente altas, ya que como hemos visto anteriormente, a una concentración de 2 mg/mL obtenemos una partícula en una escala nanoscópica mientras que, al aumentar la concentración, como es el caso, a 100 mg/mL se debe observar el efecto de la interacción de los correspondientes bloques a escala macroscópica.

Como se observa en la Figura 13, cuando el polímero se encuentra a 4°C, por debajo de la temperatura de transición, no se produce la formación del hidrogel y la muestra líquida traslúcida desciende por el tubo. Mientras que cuando la solución polimérica se calienta por encima de su temperatura de transición (37°C) se forma un hidrogel visible de tono blanquecino y semiopaco que resiste el efecto de la gravedad y se mantiene estable a temperatura ambiente.



**Figura 13:** Estudio de la gelificación del polímero  $TGF\beta(EIS)_2RGD_6V_5H_6$  a dos temperaturas.

## 5. Conclusiones

En base a la información recogida, analizada y discutida en el presente trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La bioproducción y posterior purificación del polímero  $\text{TGF}\beta(\text{EIS})_2\text{RGD}_6\text{V}_5\text{H}_6$  alcanzó niveles altos de pureza pero rendimientos deficientes en las dos producciones realizadas. Esto puede ser debido al proceso de purificación utilizado en el que se pierden una alta proporción del polímero y que requiere su puesta a punto.
- La caracterización química del biopolímero nos permite afirmar que la masa molecular y composición química experimental del polímero obtenido en la segunda producción es muy similar a la teórica por lo que puede considerarse que el biomaterial obtenido cumple con las características químicas deseadas.
- Mediante la técnica DLS se ha confirmado el comportamiento inteligente de la molécula donde por encima de su temperatura de transición adopta un estado de autoensamblado debido a las interacciones hidrofóbicas intermoleculares y que posiblemente se estabilicen con la formación de hojas plegadas  $\beta$  del bloque Silk
- Se ha comprobado también que el polímero  $\text{TGF}\beta(\text{EIS})_2\text{RGD}_6\text{V}_5\text{H}_6$  es capaz de generar de manera espontánea hidrogeles en un medio acuoso a una concentración de 100 mg/mL a temperatura fisiológica.
- El polímero  $\text{TGF}\beta(\text{EIS})_2\text{RGD}_6\text{V}_5\text{H}_6$  presenta características idóneas para la formación de hidrogeles y su posterior uso en biomedicina, como es el caso de la LME, gracias a las siguientes características: (1) biocompatibilidad y biodegradabilidad, (2) elevada elasticidad y capacidad de deformación, (3) capacidad de autoensamblaje, (4) biofuncionalidad, y (5) capacidad de encapsulación.

## 6. Bibliografía

- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in neurology*, 10, 282. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
- Anjum, A., Yazid, M. D., Fauzi Daud, M., Idris, J., Ng, A. M. H., Selvi Naicker, A., Ismail, O. H. R., Athi Kumar, R. K., & Lokanathan, Y. (2020). Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7533. <https://doi.org/10.3390/ijms21207533>.
- Assunção-Silva, R. C., Gomes, E. D., Sousa, N., Silva, N. A., & Salgado, A. J. (2015). Hydrogels and Cell Based Therapies in Spinal Cord Injury Regeneration. *Stem cells international*, 2015, 948040. <https://doi.org/10.1155/2015/948040>
- Chambre, L., Martín-Moldes, Z., Parker, R. N., & Kaplan, D. L. (2020). Bioengineered elastin- and silk-biomaterials for drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 160, 186–198. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.10.008>
- Coenen, A. M. J., Bernaerts, K. V., Harings, J. A. W., Jockenhoewel, S., & Ghazanfari, S. (2018). Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers. *Acta biomaterialia*, 79, 60–82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.027>
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in immunology*, 37(9), 608–620. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
- Deyling, J. K., Turk, E. M., & Holland, N. B. (2018). Preparing Genes for Repetitive Elastin-Like Polypeptides Using Gibson Assembly. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1798, 265–275. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7893-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7893-9_20)
- Dimitrijevic, M. R., Danner, S. M., & Mayr, W. (2015). Neurocontrol of Movement in Humans With Spinal Cord Injury. *Artificial organs*, 39(10), 823–833. <https://doi.org/10.1111/aor.12614>
- F.J. Arias, M. Santos, A. Ibáñez-Fonseca, M<sup>a</sup>J. Piña and S. Serrano-Dúcar. (2018). “Elastin-like recombinamers as smart drug delivery systems” *Current Drug Targets* 19, 360-379. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160201114617>
- Fernández-Colino, A., Arias, F. J., Alonso, M., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2014). Self-organized ECM-mimetic model based on an amphiphilic multiblock silk-elastin-like corecombinamer with a concomitant dual physical gelation process. *Biomacromolecules*, 15(10), 3781–3793. <https://doi.org/10.1021/bm501051t>
- Frandsen, J. L., & Ghandehari, H. (2012). Recombinant protein-based polymers for advanced drug delivery. *Chemical Society reviews*, 41(7), 2696–2706. <https://doi.org/10.1039/c2cs15303c>
- Girotti, A., González-Valdivieso, J., Alonso-Sampedro, I., Escalera-Anzola, S., Ramos-Díez, S., & Arias, F. J. (2022). Elastin-like Polymers as Nanovaccines: Protein Engineering of Self-Assembled, Epitope-Exposing Nanoparticles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2465, 41–72. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2168-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2168-4_3)
- González, P., González-Fernández, C., Maqueda, A., Pérez, V., Escalera-Anzola, S., Rodríguez de Lope, Á., Arias, F. J., Girotti, A., & Rodríguez, F. J. (2022). Silk-Elastin-like Polymers for Acute Intraparenchymal Treatment of the Traumatically Injured Spinal Cord: A First Systematic Experimental Approach. *Pharmaceutics*, 14(12), 2713. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122713>
- Hu, X., Wang, X., Rnjak, J., Weiss, A. S., & Kaplan, D. L. (2010). Biomaterials derived from silk-tropoelastin protein systems. *Biomaterials*, 31(32), 8121–8131. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.044>

- Jeong, H. J., Yun, Y., Lee, S. J., Ha, Y., & Gwak, S. J. (2021). Biomaterials and strategies for repairing spinal cord lesions. *Neurochemistry international*, 144, 104973. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.104973>
- Katoh, H., Yokota, K., & Fehlings, M. G. (2019). Regeneration of Spinal Cord Connectivity Through Stem Cell Transplantation and Biomaterial Scaffolds. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 248. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00248>
- Kowalczyk, T., Hnatuszko-Konka, K., Gerszberg, A., & Kononowicz, A. K. (2014). Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers. *World journal of microbiology & biotechnology*, 30(8), 2141–2152. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1649-5>
- Lee, H. J., Ryu, J. S., & Vig, P. J. (2019). Current strategies for therapeutic drug delivery after traumatic CNS injury. *Therapeutic delivery*, 10(4), 251–263. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0006>
- M. Santos, S. Serrano-Dúcar, J. González-Valdivieso, R. Vallejo, A. Girotti, P. Cuadrado, F.J. Arias. (2019). “Genetically Engineered Elastin-based Biomaterials for Biomedical Applications”. *Current Medicinal Chemistry*, 26, 7117-7146. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180508094637>
- Megeed, Z., Cappello, J., & Ghandehari, H. (2002). Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 54(8), 1075–1091. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00063-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00063-7)
- Ohnmar, H., Das, S., & Naicker, A. S. (2009). An interesting case of autonomic dysreflexia. *La Clinica terapeutica*, 160(5), 371–373. PMID: 19997683.
- Ozaki, C., Somamoto, S., Kawabata, S., & Tabata, Y. (2014). Effect of an artificial silk elastin-like protein on the migration and collagen production of mouse fibroblasts. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 25(12), 1266–1277. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.926580>
- Reguera, Javier. (2003). Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros con creciente funcionalidad. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid
- Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Keeley, F. W., & Sharpe, S. (2017). Direct observation of structure and dynamics during phase separation of an elastomeric protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), E4408–E4415. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701877114>
- Richard Wang, Jazmin Ozsvar, Giselle C Yeo, Anthony S Weiss, Hierarchical assembly of elastin materials, *Current Opinion in Chemical Engineering*, Volume 24, 2019, Pages 54-60, ISSN 2211-3398, <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.01.004>.
- Ruff, K. M., Roberts, S., Chilkoti, A., & Pappu, R. V. (2018). Advances in Understanding Stimulus-Responsive Phase Behavior of Intrinsically Disordered Protein Polymers. *Journal of molecular biology*, 430(23), 4619–4635. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.031>
- Sarkar, A., Connor, A. J., Koffas, M., & Zha, R. H. (2019). Chemical Synthesis of Silk-Mimetic Polymers. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(24), 4086. <https://doi.org/10.3390/ma12244086>
- Silva, D., Sousa, R. A., & Salgado, A. J. (2021). Hydrogels as delivery systems for spinal cord injury regeneration. *Materials today. Bio*, 9, 100093. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100093>
- Sporn M. B. (1999). TGF-beta: 20 years and counting. *Microbes and infection*, 1(15), 1251–1253. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)00260-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)00260-9)
- Turtle, J. D., Henwood, M. K., Strain, M. M., Huang, Y. J., Miranda, R. C., & Grau, J. W. (2019). Engaging pain fibers after a spinal cord injury fosters hemorrhage and expands the area of secondary injury. *Experimental neurology*, 311, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.018>
- Urry, D. W., Hugel, T., Seitz, M., Gaub, H. E., Sheiba, L., Dea, J., Xu, J., & Parker, T. (2002). Elastin: a representative ideal protein elastomer. *Philosophical*

- transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1418), 169–184. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1023>
- Vaz, E. R., Fujimura, P. T., Araujo, G. R., da Silva, C. A., Silva, R. L., Cunha, T. M., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Ferreira, M. J., Cunha-Junior, J. P., Taketomi, E. A., Goulart, L. R., & Ueira-Vieira, C. (2015). A Short Peptide That Mimics the Binding Domain of TGF- $\beta$ 1 Presents Potent Anti-Inflammatory Activity. *PLoS one*, 10(8), e0136116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136116>
- Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2009). Tropoelastin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(3), 494–497. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.03.017>
- Xiao, Y., Ling, S., & Pei, Y. (2021). Structure of Elastin. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2347, 27–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1574-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1574-4_3)
- Yeo, Giselle & Mithieux, Suzanne & Weiss, Anthony. (2018). The Elastin Matrix in Tissue Engineering and Regeneration. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. 6. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2018.02.007>

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>BPB</b>	Azul de bromofenol
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>cfu</b>	Unidad formadora de colonia
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de cobre (II)
<b>Da</b>	Dalton
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de la luz
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELP</b>	Polímero tipo elastina
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>ITC</b>	Ciclos de transición inversa
<b>ITT</b>	Transición inversa con la temperatura
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>LME</b>	Lesión de la médula espinal
<b>M</b>	Molar
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>PDI</b>	Índice de polidispersidad
<b>pDNA</b>	DNA plasmídico
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilsulfonilmetano
<b>PSA</b>	Persulfato amónico
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>SELP</b>	Polímeros tipo seda elastina
<b>SLP</b>	Polímeros similares a la seda
<b>TEMED</b>	Tetrametilendiamina
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>VGEF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>μL</b>	Microlitro