

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“Producción y cargado de la proteína de fusión Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A - Proteína Verde Fluorescente en hilos de sutura, para aplicaciones biomédicas”

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en ciencias

Presenta:

IBQ. Anabel Sánchez Martínez

Director de tesis

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla

Codirector de tesis

Dr. Giovanni Palomino Vizcaino

Tijuana, Baja California, México.

Septiembre, 2024.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.365
Tijuana, B.C., a 16 de octubre, 2024

C. Anabel Sánchez Martínez
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente

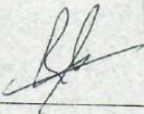
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

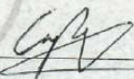
Es propuesto, por los C. Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y
Dr. Giovanni Palomino Vizcaino

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema "Producción y cargado de la proteína de fusión Factor de Crecimiento
Endotelial Vascular A – Proteína Verde Fluorescente en hilos de sutura, para
aplicaciones biomédicas"

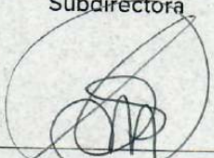
El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. FUNDAMENTO TEÓRICO
- III. METODOLOGÍA
- IV. RESULTADOS
- V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS
- VI. BIBLIOGRAFÍA


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Director De Tesis


Dr. Giovanni Palomino Vizcaino
Co-Director De Tesis



Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Dios, quien me ha dado la fortaleza para superar los obstáculos, la alegría en los momentos más complicados y la fe para confiar en mí misma.

A mi familia, su apoyo incondicional ha sido mi pilar durante todo este proceso. No hay palabras suficientes para agradecerles por todo. A mi madre, gracias por estar siempre dispuesta a escucharme, aconsejarme, corregirme cuando fue necesario y, sobre todo, por abrazarme en los momentos más difíciles.

A mi codirector de tesis, el Dr. Giovanni Palomino Vizcaíno. Por su paciencia, constante apoyo y orientación fueron esenciales para la realización de este trabajo. Sus enseñanzas tan valiosas y consejos, tanto personales como profesionales, me acompañarán siempre en la vida, y estoy profundamente agradecida por haber tenido la oportunidad de conocerlo, gracias por contagiarme de este amor a la ciencia.

A mi director de tesis, el Dr. Héctor Magaña Badilla, por su carisma, enseñanzas y la confianza que depositó en mí. Su capacidad para guiar y motivar es algo que siempre llevaré presente. Ha sido un maestro excepcional, y su influencia permanecerá en mi memoria.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Kenia Palomino Vizcaíno, una gran maestra y persona, siempre dispuesta con un consejo oportuno y apoyo incondicional, tanto en los momentos buenos como en los difíciles.

Al Dr. Román, gracias por su disposición para apoyarnos y por prestarnos su equipo de laboratorio, y a la Dra. Luci de bioterio, por recibarnos cada día con una sonrisa y su contagiosa actitud positiva. Agradezco también a la Dra. Luci de bioquímica, por sus charlas motivadoras y por brindarnos acceso al equipo necesario en su laboratorio. A la Dra. Ofelia, por su generosidad y disposición para permitirnos el acceso a las instalaciones del laboratorio de biología molecular.

Extiendo mi agradecimiento al doctor que nos facilitó el uso del microscopio de fluorescencia, cuyo apoyo fue crucial para la visualización de los resultados experimentales.

Un agradecimiento especial a la Dra. Nidia, una persona siempre alegre, atenta y apasionada por la enseñanza. Gracias por brindarnos acceso al laboratorio de microbiología, donde se lograron los mayores avances de este proyecto.

Agradezco a todos aquellos que, de alguna forma, hicieron posible este proyecto con su tiempo, apoyo y motivación, tanto a nivel profesional como personal. Este trabajo no solo representa un logro académico, sino un gran crecimiento personal que no hubiera sido posible sin el apoyo y dedicación de quienes me acompañaron en este camino, les estaré eternamente agradecida.

Finalmente a ti, Carlitos, gracias por estar siempre a mi lado, por escucharme, tu eterna paciencia, cariño, y por ser mi apoyo en los momentos más difíciles. Gracias de corazón.

Contenido

Resumen.....	7
Capítulo 1. Introducción.....	8
1.1 Objetivo general.....	11
1.2 Objetivos específicos.....	11
1.3 Hipótesis.....	12
1.4. Justificación.....	12
Capítulo 2. Fundamento teórico.....	13
2.1 Clonación de proteínas.....	13
2.2 Métodos de purificación de proteínas.....	14
2.3 Proteína factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A).....	14
2.4 Proteína verde fluorescente (GFP).....	17
2.4.1 Proteína mClover3.....	18
2.5 Recubrimiento de biomateriales con proteínas.....	18
2.5.1 Biomateriales.....	18
2.5.2 Biomateriales recubiertos con proteínas.....	19
2.6 Hilos de sutura quirúrgica.....	19
2.6.1 Sutura Vicryl (Poliglactina 90).....	21
Capítulo 3. Metodología.....	22
3.1 Reactivos biológicos y químicos.....	22
3.1.1 Cepas y plásmidos.....	22
3.1.2 Medio de cultivo.....	24
3.1.3 Oligonucleótidos sintéticos.....	25
3.1.4 Reactivos químicos.....	25
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Recuperación de plásmido.....	26
3.2.2 Producción de células químicamente competentes.....	26
3.2.3 Transformación de células por choque térmico.....	26
3.2.4 Extracción y purificación de plásmido por método lisis alcalina.....	27
3.2.5 Electroforesis en geles de agarosa.....	27
3.2.6 Extracción de proteína.....	28
3.2.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	28
3.2.8 Purificación de la proteína.....	29
3.2.9 Cargado de la proteína en hilos de sutura.....	30
3.2.10 Estudio de liberación-cuantificación de proteína a partir de hilos de sutura...30	
3.2.10.1 Estudio de cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	31
3.2.10.2 Estudio de liberación de proteína por fluorescencia.....	31
3.2.10.3 Determinación de proteína liberada por cm ²	31
Capítulo 4. Resultados.....	32
4.1 Construcción in silico de pC-VEGF.....	32

4.1.1 Diseño de oligonucleótidos para específicos para la amplificación de los genes de VEGF y GFP.....	32
4.2 Recuperación de plásmido.....	34
4.3 Transformación celular.....	34
4.4 Purificación de plásmido.....	35
4.5 Expresión y purificación de GFP.....	36
4.6 Cargado de suturas con GFP.....	37
4.6.1 Evaluación del cargado de suturas con GFP por microscopía de fluorescencia.....	37
4.7 Cuantificación de GFP.....	38
4.7.1 Curva de calibración por el método de Bradford.....	38
4.7.2 Cuantificación de GFP por Bradford.....	39
4.7.3 Escaneo de longitud de onda máxima de emisión y excitación GFP.....	40
4.8 Liberación de proteína.....	41
4.9 Relación entre unidades relativas de fluorescencia de proteína liberada y concentración de proteína en µg/mL.....	43
4.10 Determinación de µg proteína liberada por cm ² de sutura.....	44
4.11 Determinación de % proteína cargada/liberada de sutura.....	45
4.12 Evaluación de liberación de GFP de suturas por microscopía de fluorescencia.....	47
Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas.....	49
5.1 Conclusiones.....	49
5.2 Perspectivas.....	49
Capítulo 6. Bibliografía.....	50

Resumen

En la presente tesis se investigó el desarrollo de suturas quirúrgicas funcionales para reducir infecciones en sitios quirúrgicos y acelerar la cicatrización. Las infecciones posquirúrgicas, son una causa principal de complicaciones postoperatorias y tienen una alta tasa de mortalidad en países en desarrollo. Este estudio explora la posibilidad de mejorar la funcionalidad de las suturas mediante el cargado de proteínas de fusión.

Se utilizaron dos proteínas de interés: la proteína verde fluorescente (GFP), conocida por su capacidad fluorescente, lo que facilita su seguimiento en estudios biológicos, y el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF), que es crucial para la regeneración de tejidos al promover la formación y desarrollo de vasos sanguíneos, esencial para la cicatrización. Se utilizó GFP como modelo para el cargado y liberación de proteínas en suturas. Mediante técnicas biotecnológicas, se clonó, expresó, purificó y cargó GFP en hilos de sutura, y se llevaron a cabo estudios de fluorescencia para evaluar su cargado y liberación *in vitro*.

A pesar de no haber logrado la expresión y purificación de la proteína de fusión VEGF-GFP debido a limitaciones de tiempo, los resultados obtenidos con GFP proporcionando un modelo útil para el desarrollo futuro de suturas terapéuticas que incorporen la capacidad angiogénica de VEGF y la propiedad de fluorescencia de GFP, brindando una herramienta multifuncional para la funcionalización de suturas quirúrgicas.

Capítulo 1. Introducción

Las infecciones del sitio quirúrgico (ISQ), representan una de las complicaciones más comunes asociadas a un procedimiento quirúrgico, adicionalmente este tipo de infecciones alarga los tiempos de recuperación de 7 hasta 20.7 días adicionales incrementando los costos hospitalarios hasta \$113,880.62 pesos mexicanos. Es por esto que los cirujanos, profesionales del control de infecciones y autoridades sanitarias, han dado considerable atención en la prevención de las ISQ, en la Tabla 1 se muestra un resumen de la tasa de infección de sitio quirúrgico de diferentes países, observándose una variabilidad de ISQ según la región y tipo de cirugía. Por ejemplo, Japón presenta tasas altas en cirugías de colon (15%) y rectal (17.8%), mientras que en EE.UU la tasa es mucho más baja (0.9%). En países de ingresos bajos y medios, las tasas promedio de ISQ es de 11%, lo que indica que las medidas de sanidad y cantidad de recursos disponibles son importantes para el control de infecciones de las cirugías para prevenir la frecuencias de ISQ (World Health Organization 2018).

Tabla 1. Resumen de las tasas de ISQ en diferentes países (World Health Organization 2018).

País	Tasa de ISQ % (Intervalo de confianza de 95%)	Año*	Medida utilizada
USA	0.90	2014	Incidencia acumulada (episodios por 100 operaciones)
	Disminución de 17% en ISQ relacionado a los 10 procedimientos seleccionados (2014 frente a 2008)		
Unión Europea	9.50 (Cirugía de colon)	2010 - 2011	Incidencia acumulada (episodios por 100 operaciones)
	3.50 (Injerto de derivación de arteria coronaria)		
	2.90 (Cesárea)		

	1.40 (Colecistectomía)		
	1.00 (Prótesis de cadera;)		
	0.80 (Laminectomía)		
	0.75 (Prótesis de rodilla)		
Inglaterra	Cirugía intestino grueso: 8.3 (7.9-8.7)	2008 - 2013	Densidad de incidencia (episodios por 1000 pacientes-día)
	Cirugía intestino delgado: 4.9 (4.3-5.7)		
	Cirugía de vía biliar, hígado y páncreas: 4.9 (4.1-5.9)		
	COL: 4.6 (3.1-6.6)		
	KPRO: 0.4 (0.3-0.4)		
Australia	2.80	2002-2013	Densidad de incidencia (episodios por 1000 pacientes-día)
Japón	Cirugía de colon: 15.00	2008-2010	Incidencia acumulada (episodios por 100 operaciones)
	Cirugía rectal: 17.80		
República de Corea	Total: 2.10	2010-2011	Incidencia acumulada (episodios por 100 operaciones)
	Gastrectomía: 3.10		
	Artroplastia total de cadera: 2.00		
Uruguay	Apendicectomía: 3.20	2014	Incidencia acumulada (episodios por
	Cirugía cardíaca: 2.50		

	Colecistectomía: 6.20		100 operaciones)
	Cirugía de colon: 15.40		
Chile	Cirugía de derivación coronaria: 3.10	2013	Incidencia acumulada (episodios por 100 operaciones)
	Reemplazo de la articulación de cadera: 1.90		
Países de ingresos bajos y medios-OMS	Promedio: 11%	1995-2017	Incidencia acumulada (episodios por 100 operaciones)
Sureste Asia	7.80 (6.30-9.30)	2000-2012	Revisión de incidencia agrupada

En el 2015, la Red de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (RHOVE), reportó que el 15% de los pacientes en alta hospitalaria experimentaron infecciones de sitio quirúrgico. Además, estas infecciones se ubicaron en el cuarto puesto entre las Infección Asociadas a la Atención de Salud (IAAS) en México, con una tasa de mortalidad general del 2.4 por cada 100 casos. En total, se reportaron un total de 9,301 casos de infecciones de sitio quirúrgico, el 51.4% (4,784) de ellas se presentó en cirugías electivas, el 38.6% (3,592) en cirugías de urgencia, mientras que para el 9.9% (925) se desconoce el origen (Martínez-Garduño et al., 2022).

Por lo anterior, el desarrollo de dispositivos biomédicos con capacidades terapéuticas se considera prioritario. Entre los objetivos que persiguen los investigadores para mejorar las suturas están el prevenir la colonización microbiana y el promover una rápida cicatrización (López et al., 2018).

1.1 Objetivo general

Producir, cargar y liberar la proteína de fusión VEGF-GFP en hilos de sutura, para aplicaciones biomédicas.

1.2 Objetivos específicos

1. Diseñar oligonucleótidos específicos para la amplificación de la proteína VEGF y GFP.
2. Clonar a la proteína de fusión VEGF y GFP en un plásmido de expresión.
3. Expresar en *E. coli* a la proteína fusión VEGF-GFP y analizar por electroforesis en gel de agarosa.
4. Purificar la proteína VEGF-GFP por Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos (IMAC) y analizar por electroforesis en gel de poliacrilamida.
5. Cargar con proteína de fusión VEGF- GFP a los hilos de sutura.
6. Evaluar el cargado de VEGF-GFP por microscopía de fluorescencia.
7. Estudiar el proceso de liberación de VEGF-GFP por fluorescencia.

1.3 Hipótesis

Será posible producir, cargar y liberar la proteína de fusión factor de crecimiento endotelial vascular A - proteína verde fluorescente en hilos de sutura, para potenciales aplicaciones biomédicas

1.4. Justificación

El producir una proteína de fusión para uso como proteína modelo en pruebas de cargado y liberación en suturas quirúrgicas representa una estrategia innovadora y de amplia aplicación. Al combinar la actividad angiogénesis de la proteína VEGF para promover la cicatrización de las heridas con la capacidad de fluorescencia de

la proteína GFP, se abre la posibilidad de producir hilos de sutura recubiertos con una proteína recombinante con amplio rango de aplicaciones.

Los hilos quirúrgicos recubiertos con una proteína recombinante para promover la cicatrización, permitiría una evaluación de la liberación de la sutura en entornos biológicos, lo que permite a la investigación científica evaluar su comportamiento *in vivo*, siendo una herramienta para futuras investigaciones.

Capítulo 2. Fundamento teórico

2.1 Clonación de proteínas

La producción de proteínas recombinantes ha sido estudiada por varios años dada su gran aportación y avance a la biotecnología, estas se obtienen a partir de un gen que ha sido clonado en un organismo distinto al original. Un ejemplo muy utilizado de proteína recombinante, tanto en bacterias como en levaduras es la insulina humana la cual es producida en un organismo diferente al humano como *Escherichia coli* (Calvo 2014; Drago et al. 2006).

Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas en bacterias, levaduras, plantas, en células de insectos y de mamíferos (Drago et al. 2006). La elección del sistema biológico en que se produce la proteína se basa en los requerimientos y la aplicación de la proteína recombinante. Siendo la bacteria *E. coli* el sistema más utilizado para producir proteínas, ya que presenta gran eficiencia para la manipulación genética, mayor velocidad específica de crecimiento que las levaduras y células de mamíferos. La secuencia exógena que codifica para la proteína de interés debe incorporarse en un vehículo, regularmente un plásmido, el cual debe ser tomado por la bacteria. Un plásmido es un fragmento de ADN circular que contiene los elementos genéticos necesarios que permiten la expresión de la proteína así como elementos adicionales que permiten discriminar a las bacterias transformadas de las no transformadas empleando un gen de resistencia a antibióticos (Choi et al., 2006; Jonasson et al., 2002).

Entre los parámetros más importantes en la producción exitosa de proteínas en *E. coli* se encuentran: la eficiencia transcripcional y traduccional, la estabilidad del vector de expresión y de los ácidos ribonucleicos (ARN) transcritos, la estabilidad de las moléculas ante el ambiente proteolítico del hospedero, la localización y plegamiento de la proteína (Jonasson et al., 2002).

En *E. coli*, las proteínas pueden ser expresadas en el interior de la célula en el citoplasma celular, donde pueden ser localizadas en el espacio periplasmático o secretadas al medio extracelular. Muchos de los polipéptidos producidos en gran cantidad en *E. coli* pueden formar cuerpos de inclusión (Gómez et al., 1999).

2.2 Métodos de purificación de proteínas

Los métodos más utilizados para la purificación de proteínas se basan en el uso de "etiquetas", estas etiquetas se incorporan a la proteína durante la edición del plásmido de expresión, éstas se pueden añadir en el extremo amino o carboxilo terminal de las proteínas. La etiqueta más utilizada es la cola de seis histidinas (6xHis), la cual permite que por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC), purificar a las proteínas que posean la etiqueta 6xHIS de las que no. La resina

empleada para IMAC está formada de perlas de agarosa a las cuales se les ha unido de forma covalente níquel II la etiqueta de 6xHis puede formar un enlace de coordinación con el Ni^{+2} , lo que retiene a la proteína en la columna. Para liberar a las proteínas unidas a la resina se realiza una competencia con un ligando de níquel, como el imidazol (Ward et al., 2009; Jeremy et al., 2007; Westa et al., 2001).

2.3 Proteína factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A)

La proteína VEGFA es una glicoproteína de 46 kilodaltons, capaz de formar un dímero antiparalela, estabilizado por puentes disulfuro, y presenta 8 isoformas (García et al., 2011). Siendo VEGFA 121 y el VEGFA 165 isoformas solubles y las más abundantes. De las cuales, la isoforma VEGFA 165 es la más estudiada. Es un potente estimulador de la proliferación de células endoteliales, ya que promueve una mayor unión de las células contribuyendo a la angiogénesis; es considerada una proteína ácida, esto le permite llegar a las células endoteliales, en comparación con las isoformas básicas que permanecen secuestradas en la matriz extracelular. Por lo cual, es de interés en la angiogénesis, ya que las isoformas ácidas inician el proceso angiogénico, promoviendo la activación de proteasas que degradan la matriz, y con ello la liberación de las isoformas básicas que se encuentran secuestradas en la matriz extracelular para potenciar la proliferación y migración de células endoteliales (Houck et al., 1991; Ferrara 2004).

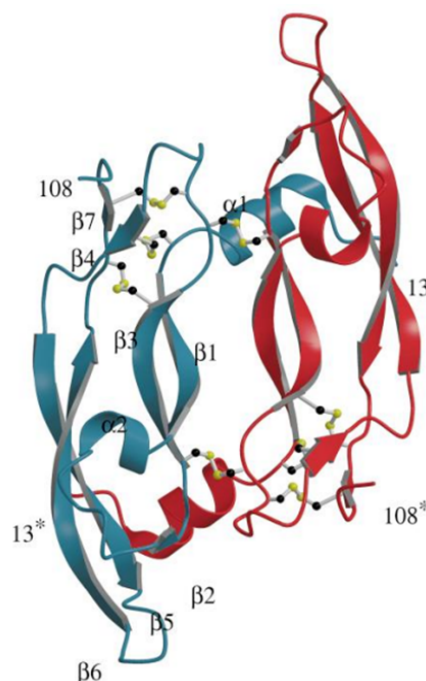


Imagen 1. Estructura del dímero de VEGF-A165. Uno de los monómeros se muestra en rojo y el otro en azul mientras que los puentes disulfuro están en gris con los átomos de azufre en amarillo. Los extremos N- y C- terminales se encuentran marcados con un asterisco (Muller et al., 1997).

Esta proteína es producida por muchos tipos de células incluyendo las células tumorales, macrófagos, plaquetas, queratinocitos, etc. Desempeña un papel fundamental en la cicatrización de heridas y el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (Reichardt 1991).

Pertenece a la familia de las VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) que incluyen a las proteínas homodiméricas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PLGF), siendo el VEGF-A el más estudiado (Redmer et al., 2001). Estas proteínas realizan sus funciones en las células a través de tres receptores con actividad tirosina quinasa: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares (Saavedra et al., 2017).

Cada uno de estos receptores presenta diferentes funciones; VEGFR-1 y VEGFR-2 están involucrados fundamentalmente en la formación de vasos sanguíneos, mientras que VEGFR-3 está relacionado en linfangiogénesis; VEGF-1 se expresa dentro de la placenta, en el sistema de vasos sanguíneos fetales y maternos. Mientras que el VEGF-2 contribuye en la angiogénesis durante el desarrollo y hematopoyesis. Finalmente, VEGF-3 se expresa en las células endoteliales linfáticas estimulando al receptor de la linfangiogénesis (Saavedra et al., 2017).

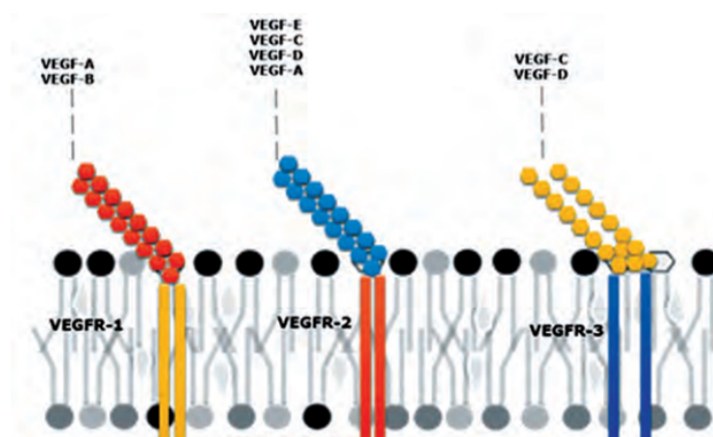


Imagen 2. Esquema de compatibilidad de unión entre factores de crecimiento y sus receptores (Saavedra et al., 2017).

En el contexto de la regeneración tisular, VEGF-A adquiere relevancia por su capacidad de inducir la angiogénesis en áreas lesionadas o deficientemente vascularizadas. La formación de nuevos vasos sanguíneos juega un papel esencial al proporcionar oxígeno y nutrientes a los tejidos dañados, lo que acelera los procesos de cicatrización y promueve la recuperación tisular (Aranda 2013).

2.4 Proteína verde fluorescente (GFP)

La GFP es una proteína que se encuentra en la medusa *Aequorea victoria*, emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible y fue descubierta en la década de 1960 por el científico Osamu Shimomura (Shimomura et al., 1962). Utilizando herramientas biotecnológicas, el gen que codifica para la GFP ha sido clonado y utilizado frecuentemente como marcador fluorescente, por lo tanto, se ha convertido en una herramienta en la investigación por su aplicación *in vivo*, tanto para la visualización de la expresión génica hasta el seguimiento de la migración celular (Hend et al., 2023; Franco et al., 2009; Shaner et al., 2005).

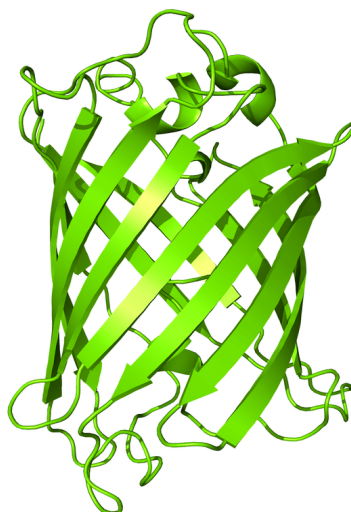


Imagen 3. Proteína verde fluorescente (GFP). PDB 2B3P.

La GFP tiene un peso molecular de 26,9 KDa y consta de 238 aminoácidos que conforman 11 cadenas β que forma un cilindro y una hélice α la cual contiene un cromóforo en el centro de la estructura, el cual es un grupo químico que absorbe y emite luz, este cromóforo es el que le proporciona la capacidad fluorescente (Stepanenko et al., 2013; Hend et al., 2023).

La GFP no necesita de aditivos para emitir fluorescencia, solo necesita de luz UV o luz azul que impacte sobre el cromóforo para excitar y que transforme la energía emitiendo luz en longitud de onda verde. La proteína presenta dos picos de excitación, entre 395 nm y 480 nm, siendo la banda de emisión máxima en 509 nm dentro de la zona verde del espectro electromagnético (Perez et al., 2009).

2.4.1 Proteína mClover3

La proteína mClover3 es una proteína verde fluorescente mejorada de la proteína Clover, derivada de la familia de proteínas GFP. Esta variante ha sido diseñada para proporcionar mayor rendimiento en aplicaciones de imagen en células vivas y en experimentos que involucren la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Además, mClover3 presenta un máximo de absorbancia a 506 nm y un máximo de emisión a 518 nm. (Bajar et al., 2016).

Entre las características que distinguen a mClover3, está la fotoestabilidad. En condiciones *in vitro*, la vida media de fotoblanqueo es de 80 segundos, lo que la hace adecuada para experimentos prolongados en células vivas. Además, mClover3 mantiene un brillo relativo del 85%, situándose como una de las proteínas verde fluorescentes más brillantes disponibles en biología celular. En términos de sensibilidad al pH, mClover3 presenta un pKa de 6.5. Esto implica que presenta mayor fluorescencia en valores de pH superior a 6.5 y disminuye en valores inferiores. (Bajar et al., 2016).

2.5 Recubrimiento de biomateriales con proteínas

2.5.1 Biomateriales

La definición de biomaterial ha avanzado a lo largo de los años para englobar las diversas aplicaciones que le pueden dar, siendo en 2018 que biomaterial adquirió una nueva definición: *“Un material diseñado para tomar una forma que puede dirigir, a través de las interacciones con los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o diagnóstico”* (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2019).

Los cuales se clasifican de acuerdo a cuatro generaciones:

a) Primera

Materiales naturales e inertes en un sistema vivo. Ej. Madera, implantes metálicos o poliméricos.

b) Segunda

Polímeros y compuestos de laboratorio bioactivos. Ej. Silicona, polímeros sintéticos.

c) Tercera

Materiales funcionalizados que pueden estimular a nivel molecular los tejidos biológicos. Ej. Biomateriales con superficies funcionalizadas.

d) Cuarta

Biomateriales funcionalizados e inteligentes que proporcionan diagnósticos y terapias novedosas a través de estimulaciones a células específicas. Ej. Biomateriales a base de polipirrol (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2019).

2.5.2 Biomateriales recubiertos con proteínas

En el campo de la ingeniería biomédica, los biomateriales recubiertos con proteínas representan una herramienta clave para optimizar las propiedades bioactivas de los materiales. El recubrimiento del biomaterial implica un proceso de adsorción o enlace covalente de proteínas específicas (como factores de crecimiento, anticuerpos y enzimas) en la superficie del material, para promover la interacción deseada con el entorno biológico circundante (Fuchs et al., 2012; Wei et al., 2014).

Entre las aplicaciones de estos biomateriales se incluyen los sistemas de liberación de fármacos, la mejora de biocompatibilidad, la regeneración tisular y el diagnóstico. Estos avances abren un amplio rango de beneficios, como la asociación de medicamentos para una liberación controlada en sistemas biológicos durante la reparación de tejidos (Fuchs et al., 2012; Wei et al., 2014).

2.6 Hilos de sutura quirúrgica

La sutura es parte vital de los procedimientos quirúrgicos ya que está diseñada para cerrar heridas y promover una correcta cicatrización, al igual que cumple con características biológicas (histocompatibilidad, reabsorción y adherencia bacteriana), físicas y mecánicas aprobadas para su uso en personas (Chen et al., 2015). Las características fisicoquímicas de los hilos propician la contaminación microbiana, siendo este uno de los riesgos más comunes durante el proceso de cicatrización de las heridas (Katz et al., 1981).

Existen diferentes tipos de hilos de sutura quirúrgica, que se clasifican de acuerdo a sus características:

a) Absorbibles y no absorbibles

Son consideradas absorbibles [Polyglactin 910 (Vicryl), Poliglecaprone 25 (Monocryl), Polydioxanone (PDS)] si en la sutura disminuye la fuerza tensil en un periodo de semanas o meses. En cambio, las suturas no absorbibles [Nylon (Ethilon, Dermlon), Polypropylene (Prolene, Surgipro)] son usadas para periodos largos de tiempo (Rose et al., 2023).

b) Sintéticos y naturales

Las suturas sintéticas [Polyglactin 910 (Vicryl), Poliglecaprone 25 (Monocryl), Polydioxanone (PDS), Nylon (Ethilon, Dermlon), Polypropylene (Prolene, Surgipro)] se degradan por hidrólisis causando menor inflamación en el tejido que las suturas naturales (Plain Gut, Chromic Gut, Silk, Steel) las cuales se degradan por proteolisis (Rose et al., 2023).

c) Monofilamento y multifilamento

Las suturas de estructura monofilamento [Nylon (Ethilon, Dermlon), Polypropylene (Prolene, Surgipro), Polydioxanone (PDS), Poliglecaprone 25 (Monocryl)], están compuestas por un solo filamento, tienen tendencia a regresar a su forma original y causan menor respuesta inflamatoria en comparación con la sutura de multifilamento [Polyglactin 910 (Vicryl), Silk, Nylon (Nuralon), Polyester (Tricon)] que está compuesta por múltiples filamentos en forma trenzada, es más resistente y pueden ser recubiertas con antibióticos u otros compuestos que le confieran otras características. (Rose et al., 2023)

2.6.1 Sutura Vicryl (Poliglactina 90)

La sutura Vicryl, también conocida como Poliglactina 910, es una sutura absorbible sintética compuesta por un copolímero de glicólido y lactida. Su estructura multifilamento trenzada le confiere a la sutura resistencia y flexibilidad. La absorción de Vicryl se produce mediante hidrólisis, con una pérdida de fuerza tensil a las dos semanas y una absorción completa en un periodo de tiempo de 56 a 70 días, en condiciones de pH 7.4 a 37 °C (Ortiz de Elguea-Lizarraga et al., 2021).

En estudios comparativos, la sutura Vicryl tiene un comportamiento biológico compatible con células de mamíferos. Es eficaz en provocar una respuesta inflamatoria inicial temprana y en estimular el tejido epitelial, aumentando el crecimiento de fibroblastos (Gartti-Jardim et al., 2013).

Se ha demostrado que Vicryl puede ser funcionalizada con recubrimientos antimicrobianos. Un ejemplo es el recubrimiento con quitosano cuaternizado (HACC), que inhibió de manera significativa la formación de biofilm de bacterias patógenas como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Además de sus propiedades antimicrobianas, la sutura mantuvo la biocompatibilidad en el tejido biológico (Yang et al., 2017).

Capítulo 3. Metodología

3.1 Reactivos biológicos y químicos

3.1.1 Cepas y plásmidos

Cepas

La cepa de *Escherichia coli* NEB®5α (New England Biolabs®) y se emplea como hospedero para la producción de plásmidos y expresión proteica respectivamente.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* y su genotipo.

Cepa de <i>E. coli</i>	Genotipo o descripción
Neb®5α	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

Plásmidos

Para la realización del proyecto, se utilizaron los plásmidos a continuación:

a. pNCS-mClover3

El vector de expresión utilizado en este proyecto fue el plásmido pNCS-mClover3 (#74236) obtenido de Add Gene. El plásmido tiene un tamaño de 3630 pb, incorpora un gen de resistencia a la ampicilina, un promotor T7 lo que facilita su expresión sin necesidad de inductor y expresa al gen mClover3 fluorescente en bacterias con un número de copias alto (Bajar et al., 2016).

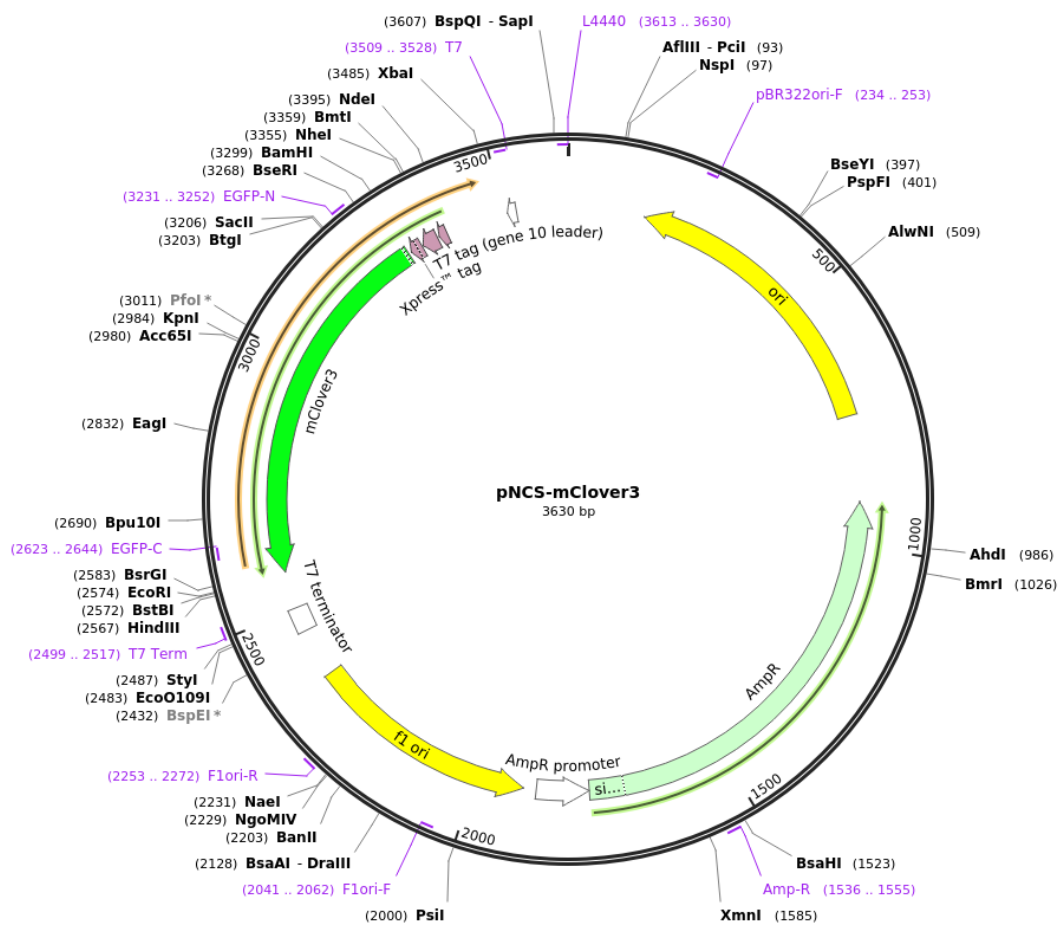


Imagen 4. Esquema del plásmido pNCS-mClover3.

b. pET-VEGF

Plásmido de expresión en bacterias que contiene gen que codifica para la proteína VEGFA el cual fue producido por el autor Taktak-BenAmar et al., (2017) “Expression, purification and functionality of bioactive recombinant human vascular endothelial growth factor VEGF165 in *E. coli*”. El plásmido cuenta con el gen de resistencia a la ampicilina y etiquetas de histidina.

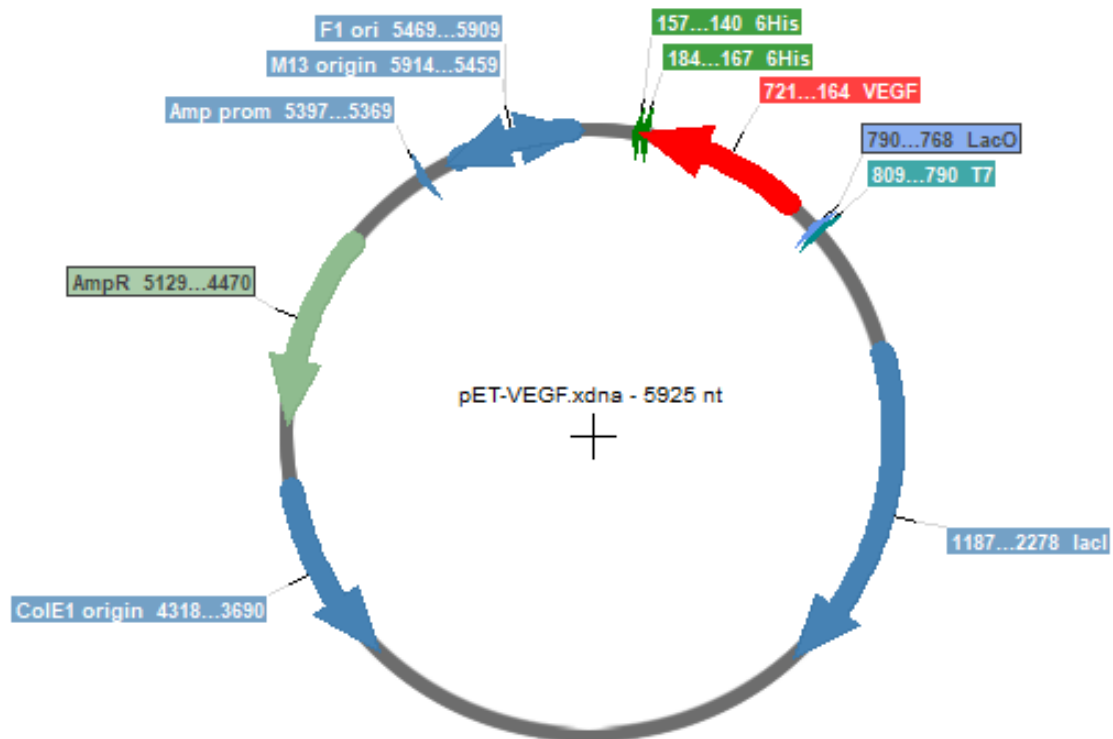


Imagen 5. Esquema del plásmido pET-VEGF propuesto in silico para la subclonación de VEGFA en pET-21a (Taktak-BenAmar et. al., 2017).

3.1.2 Medio de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo, se emplea medio de cultivo líquido y sólido Luria-Bertani (LB) [1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 0.5% de NaCl] y STAB [1% triptona, 0.5 g/L extracto de levadura, 1% NaCl], procediendo a esterilizar a 121 °C, 15 psi durante 15 minutos (Block 2001).

a) LB + Ampicilina (Medio Luria-Bertani con Ampicilina)

Medio LB con ampicilina a una concentración de 200 µg/mL a partir de solución madre de 50 mg/mL.

3.1.3 Oligonucleótidos sintéticos

Todos los oligonucleótidos usados fueron sintetizados por la compañía T4 Oligo (ADN Artificial S. de R.L. de C.V.)

Tabla 3. Oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótido 5' (superposición/complementario) 3'
pET-VEGF <i>fwd</i>	ggtcggggtggcggcggtatctATGGCAGAAGGAGGAGGG
pET-VEGF <i>rev</i>	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC
pNCS-mClover3 <i>fwd</i>	aagaaggagatatacatatgCGGGATCTGTACGACGATG
pNCS-mClover3 <i>rev</i>	CTTGACAGCTCGTCCATG
Espaciador <i>fwd</i>	gcatggacgagctgtacaagGGTGGCGGCGGATCTGGTG
Espaciador <i>rev</i>	AGATCCGCCGCCACCCGA

3.1.4 Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados: Tris (tris- [hidroxietil]-aminometano), Amp (ampicilina), acrilamida (2-propenamida), bis-acrilamida (N,N - metilen-bis-acrilamida), TEMED (N,N,N',N-tetra-metilen-etilendiamina), RNasa (ribonucleasa A), KH₂PO₄ (fosfato de potasio monobásico), NaOH (hidróxido de

sodio), Glicina, Tween® 20 (monolaurato de polioxi etilen sorbitan), bromuro de etidio y se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich.

De la compañía Fermont se adquirieron los siguientes reactivos EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), CaCl_2 (cloruro de calcio), NaCl (cloruro de sodio), APS (persulfato de amonio), glicerol, ácido bórico y acetato de sodio.

El isopropanol, KCOOH (formiato de potasio), SDS (dodecilsulfato de sodio), albúmina de suero bovino (BSA), Na_2HPO_4 (fosfato dibásico de sodio), azul brillante Coomassie G-250, imidazol, azul de bromofenol y xileno, fueron adquiridos de diversos proveedores.

3.2 Métodos

3.2.1 Recuperación de plásmido

Con técnica aséptica, sobre caja petri estéril, recortar el papel filtro con plásmido en trozos de $1 \times 1 \text{ mm}^2$, después colocar los trozos en microtubo de 1.5 mL utilizando pinzas estériles para posteriormente agregar H_2O destilada libre de nucleasas, agregar el agua suficiente como para cubrir el papel filtro que se encuentra dentro del microtubo y finalmente incubar a 4°C toda la noche.

3.2.2 Producción de células químicamente competentes

En condiciones asépticas realizar la siembra de bacteria transformada en 5 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) con una colonia aislada e incubar 16 hrs a 37°C y con agitación de 200 rpm toda la noche. Posteriormente, inocular 5 mL de medio LB líquido con 10 μL del precultivo e incubar durante 4 horas a 37°C en agitación de 200 rpm.

Al finalizar la incubación, dividir el volumen del cultivo en 4 microtubos y obtener el paquete celular centrifugando a 10,000 rpm durante 3 minutos, decantar el sobrenadante de cada microtubo. Resuspender el precipitado de cada microtubo en 250 μL de solución fría de 0.1 M CaCl_2 y mezclar el contenido de los 4 microtubos para obtener uno solo, homogeneizar y centrifugar a 10,000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente descartar el sobrenadante, mantener el microtubo en hielo y

resuspender el precipitado en 1 mL de solución fría de 0.1 M CaCl_2 , proceder a incubar en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, centrifugar a 10,000 rpm durante 3 minutos, descartar el sobrenadante. Resuspender con 200 μL de solución fría de 0.1 M CaCl_2 . Finalmente, transferir 50 μL de la solución a cada microtubo estéril.

3.2.3 Transformación de células por choque térmico

En condiciones asépticas, agregar 100 ng del plásmido a 50 μL de células químicamente competentes. Posteriormente incubar a 42 °C durante 3 minutos y 3 minutos en hielo. Añadir 1 mL de medio LB e incubar por 45 minutos a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, recuperar el paquete celular por centrifugación a 10,000 rpm durante 1 minuto, descartar el sobrenadante y resuspender. A continuación, inocular en medio LB sólido con ampicilina (200 $\mu\text{g/mL}$) e incubar durante la noche a 37 °C. Es necesario incluir un control de no transformación y de viabilidad celular.

3.2.4 Extracción y purificación de plásmido por método lisis alcalina

Inocular la cepa transformada en 3.5 mL de medio LB con antibiótico apropiado e incubar a 37 °C, a 220 rpm por 12-14 hrs. Posteriormente, centrifugar el cultivo a 10,000 rpm por 30 segundos y descartar el sobrenadante. Resuspender el paquete celular en 200 μL de solución P1 [50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ RNasa], de ser necesario emplear vortex e incubar a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, agregar 400 μL de solución de lisis alcalina P2 [200 mM NaOH, 1 % SDS], mezclar por inversión y agregar 300 μL de solución P3 [3 M KCOOH], por goteo y mezclar invirtiendo el microtubo e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos y recuperar el sobrenadante sin acarrear restos y colocarlo en un microtubo. Adicionar dos volúmenes de etanol y mezclar por inversión, incubar a 4 °C de 12-14 hrs. Centrifugar a 13,000 rpm por 45 minutos, descartar sobrenadante y añadir 1 mL de etanol al 70 %, mezclar por inversión y centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, descartar el sobrenadante. Resuspender en 50-100 μL de agua libre de nucleasas para utilizar el plásmido. Para almacenarlo a largo plazo agregar 1 mL de etanol y almacenar a - 80 °C.

3.2.5 Electroforesis en geles de agarosa

Preparar gel de agarosa al 1 % siguiendo el protocolo propuesto por el equipo de cámara de electroforesis EDVOTEK® EDGETM. Proceder con cubrir el gel de agarosa con 150 mL de buffer TBE 1X [89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3], preparar las muestras mezclando 5 µL de Buffer para muestra de ácidos nucleicos [50 mM Tris-HCl pH 8, 25 % glicerol, 5 mM EDTA, 0.2 % azul de bromofenol, 0.2 % Xileno] con 5 µL de muestra y cargar 10 µL de la muestra preparada en pocillo de gel. Correr la muestra a un voltaje de 100 voltios durante 30 minutos. Teñir el gel de agarosa en solución de bromuro de etidio [0.1 mg/mL] durante 1 hora y colocar de nuevo el gel en cámara de electroforesis aplicando voltaje de 100 voltios durante 5 min. Analizar resultados con filtro de luz ultravioleta.

3.2.6 Extracción de proteína

En condiciones asépticas, inocular 50 mL de medio LB más antibiótico con una colonia aislada de la cepa transformada, incubar a 37 °C con 250 rpm durante 6 hrs. Posteriormente, verter el precultivo en 200 mL de medio LB más antibiótico e incubar de 14-16 hrs a 37 °C y 250 rpm. Al finalizar la incubación, medir la densidad óptica a 600 nm, centrifugar el cultivo a 5,000 rpm por 3 minutos y descartar el sobrenadante. Resuspender el paquete celular en buffer de lisis [300 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl] y sonicar sobre hielo. Centrifugar el lisado total a 10,000 rpm a 4 °C durante 45 minutos, al finalizar, recuperar el ss (fracción soluble) y el pp (fracción insoluble).

Adicionar 50 µL buffer de carga desnaturizante y reductor Laemmli, incubar a 100 °C por 10 minutos y colocar las muestras en hielo por 10 minutos. Analizar por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.2.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Preparar las dos fases del gel de poliacrilamida. Proceder a verter el gel separador 12 % [1.5 M Tris-HCl a pH 8.8, 10 % SDS, 10 % persulfato de amonio, 30 % acrilamida/bisacrilamida (29:1), TEMED] en soporte de placas de vidrio en cámara

de electroforesis y dejar polimerizar 15 minutos. Posteriormente, añadir gel apilador 4 % [0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS, 10 % persulfato de amonio, 30 % acrilamida/Bisacrilamida (29:1), TEMED], colocar peine molde para muestras y dejar polimerizar 15 min. Retirar el peine molde y colocar buffer de corrida 1X [250 mM Tris pH 8.3, 1.92 M glicina] hasta llenar la cámara de electroforesis.

Las condiciones de corrida fueron con un voltaje inicial de 80 voltios hasta que el frente de corrida de azul de bromofenol alcance la base del gel apilador, seguido de un cambio de voltaje a 125 voltios hasta que el frente de azul de bromofenol llegue a la mitad del gel separador. A continuación, retirar el gel de la cámara de electroforesis y teñir el gel con solución de tinción A [0.003 % Coomassie brilliant blue R-250, 10 % isopropanol, 10 % ácido acético glacial] durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación constante, posteriormente cambiar la solución por solución de tinción B [0.003 % Coomassie brilliant blue R-250, 10 % ácido acético glacial] durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Desteñir el gel con solución de distinción [10 % ácido acético] durante la noche a temperatura ambiente y agitación constante hasta obtener el contraste deseado.

3.2.8 Purificación de la proteína

La purificación se realiza mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos cargados con Ni^{2+} , utilizando las “etiquetas” de poli-histidinas presentes en la estructura de la proteína. Los iones de níquel de la resina se unen selectivamente a las histidinas de las proteínas con esta etiqueta, creando un complejo de histidina-níquel. Para eluir a las proteínas unidas a la resina, se utiliza un buffer con alta concentración de imidazol, el cual compite con la afinidad del níquel por la histidina (Westra et al., 2001).

Por lo tanto, para purificar la ss obtenida de la extracción de proteína, se debe utilizar la cromatografía de afinidad de iones metálicos. Utilizar 1 mL de resina Ni^{2+} (cOmplete His-Tag Purification Columns), la cual se coloca en un tubo centrifuga de 15 mL. Equilibrar la resina con 10 volúmenes de buffer de Tris [20 mM Tris pH 8] y proceder a agitar a 4 °C. Antes de su uso, centrifugar la resina a 2,800 rpm durante 2 minutos.

Agregar 0.1 mM EDTA a la ss a purificar y mezclar, posteriormente, incubar durante 40 horas a 4 °C con agitación. Centrifugar la resina con ss a 2,800 rpm durante 2 minutos, recuperar el sobrenadante como fracción no unida y almacenar a 4 °C. Realizar dos lavados con 10 volúmenes de buffer Tris, incubar durante 10 minutos a 4 °C con agitación. Centrifugar la resina con buffer a 2,800 rpm durante 2 minutos, recuperar el sobrenadante como Lavado 1 y Lavado 2, almacenar a 4 °C. Realizar eluciones con 500 µL con buffer de elución [500 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaPO₄ pH 8, 0.1 % Tween 20] incubando en agitación durante 10 minutos a 4 °C y centrifugado 2,800 rpm durante 2 minutos. Recolectar las eluciones en microtubos estériles de 1.5 mL y almacenar a 4 °C hasta su posterior análisis. Finalmente, realizar un lavado a la resina con buffer de lavado [0.5 M NaOH, 2 M NaCl], incubar en agitación durante 10 minutos a 4 °C. Centrifugar la resina con buffer a 2,800 rpm durante 2 minutos, retirar sobrenadante y almacenar la resina con 10 volúmenes de buffer Tris a 4 °C.

Identificar y analizar las fracciones recolectadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Cargar 30 µL de lisado total, fracción soluble e insoluble; 50 µL de fracción no unida, primer lavado, segundo lavado, y todos los eluidos obtenidos para comprobar la presencia y la pureza de la proteína de interés.

Posteriormente, juntar las eluciones más concentradas y someter a diálisis con el propósito de eliminar el imidazol entre otros contaminantes. Como buffer de diálisis utilizar 1 L de PBS 1X [0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 0.0018 M K₂HPO₄, pH 7.4] y colocar las eluciones en una membrana semipermeable Spectra/Por® 4 MWCO: 12-14 kDa durante 24 horas en inmersión con el buffer de diálisis.

3.2.9 Cargado de la proteína en hilos de sutura

El cargado de los hilos se realiza al prehidratar dos suturas Vicryl de 10 cm de longitud, sumergir cada sutura por separado en 500 µL de agua destilada estéril durante 1 hora a 4 °C y con agitación constante a 20 rpm. Posteriormente, secar la sutura en una caja Petri durante 10 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, colocar una sutura prehidratada en un tubo cónico de 15 mL, agregar 500 µL de solución de proteína e incubar durante la noche a 4 °C con agitación constante de 20 rpm. Finalmente, dejar secar la sutura en caja Petri a temperatura ambiente. Evaluar el cargado de la proteína en sutura por microscopía de fluorescencia y utilizar como control negativo una sutura pre-hidratada con agua.

3.2.10 Estudio de liberación-cuantificación de proteína a partir de hilos de sutura

Colocar 2 cm de la sutura cargada con proteína en un pozo de una microplaca de 96 pozos. Adicionar 100 µL de buffer PBS 1X [0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 0.0018 M K₂HPO₄, pH 7.4] a cada pozo. Incubar a 37 °C, con agitación de 120 rpm y tomar lecturas cada 15 min durante 24 horas para obtener una cinética de liberación de proteína de los hilos de sutura.

3.2.10.1 Estudio de cuantificación de proteína por el método de Bradford

Este método se basa en la interacción de los aminoácidos presentes en las proteínas con un colorante generando así un complejo proteína-colorante. El análisis se fundamenta en la observación del cambio de color del azul brillante Coomassie G-250 cuando se une a la proteína a $\lambda = 595$ nm (Bradford 1976).

Realizar una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA). Posteriormente, analizar las muestras añadiendo la solución azul brillante Coomassie G-250 e incubar a 37 °C por 20 minutos. Finalmente, analizar absorbancias a 595 nm y extrapolar resultados con la ecuación de la recta.

3.2.10.2 Estudio de liberación de proteína por fluorescencia

En el estudio de liberación de proteína por fluorescencia se analiza la liberación de GFP desde un dispositivo médico en condiciones *in vitro* registrando lecturas de fluorescencia a λ excitación de 520 nm y λ emisión 477 nm en determinado tiempo.

3.2.10.3 Determinación de proteína liberada por cm^2

Para determinar la proteína liberada en las suturas por cm^2 , calcular el área de la superficie expuesta para conocer el valor de proteína en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de la sutura y considerar el volumen del líquido de liberación.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Construcción *in silico* de pC-VEGF

Como primera etapa del proyecto, se realizó una revisión bibliográfica para seleccionar las secuencias a emplear. Los plásmidos seleccionados fueron pET-VEGF para la producción de la proteína VEGF, y pNCS-mClover3, para la producción de la proteína mClover3. Por otro lado, se seleccionó la siguiente secuencia espaciadora: (Glicina-Glicina-Glicina-Glicina-Serina)₄. Este espaciador proporciona la flexibilidad y espacio necesario para mantener la estructura y función de las proteínas. La secuencia de las proteínas de interés fue identificada utilizando el software Serial Cloner (Chan et. al., 2005; Traub et. al., 2013).

4.1.1 Diseño de oligonucleótidos para específicos para la amplificación de los genes de VEGF y GFP

Para diseñar los oligonucleótidos para amplificar los genes de VEGF y GFP, se empleó el software en línea NEBuilder® Assembly Tool (<https://nebuilder.neb.com>).

Una vez en la página, ingresamos en el apartado de “New fragment” e introducimos la secuencia del vector de expresión pET-VEGF, plásmido al que deseamos ensamblar el gen GFP y el espaciador. Marcamos las casillas correspondientes para indicar que es un vector y que es circular. Posteriormente, seleccionamos el método de linealización por PCR y delimitamos la secuencia de interés, comenzando en la

base 5253 y finalizando en la base 5207. Seleccionamos “autogenerar primers”. Dentro de esta limitación se encuentra el fragmento a amplificar de la secuencia VEGF de 5880 pb.

Para ingresar el gen de GFP como nuevo fragmento a ensamblar, agregamos la secuencia del plásmido pNCS-mClover3 (#74236) que contiene la secuencia de la proteína GFP. Nuevamente, marcamos las casillas correspondientes para indicar que es un vector y que es circular. Seleccionamos el método de linealización por PCR y delimitamos la secuencia de interés, comenzando en la base 301 y finalizando en la base 1050, y marcamos la casilla “autogenerar primers”. Dentro de esta limitación se encuentra el fragmento a amplificar de la secuencia GFP de 750 pb.

Como último fragmento a ensamblar, introducimos la secuencia del espaciador compuesto por (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄ en "Nuevo fragmento". Marcamos las casillas correspondientes de vector, circular y seleccionamos el método de linealización por PCR. Delimitamos la secuencia de interés, comenzando en la base 1 y finalizando en la base 60, seleccionamos “autogenerar primers”. Se obtuvo un tamaño de fragmento de 60 pb que codifica para el espaciador.

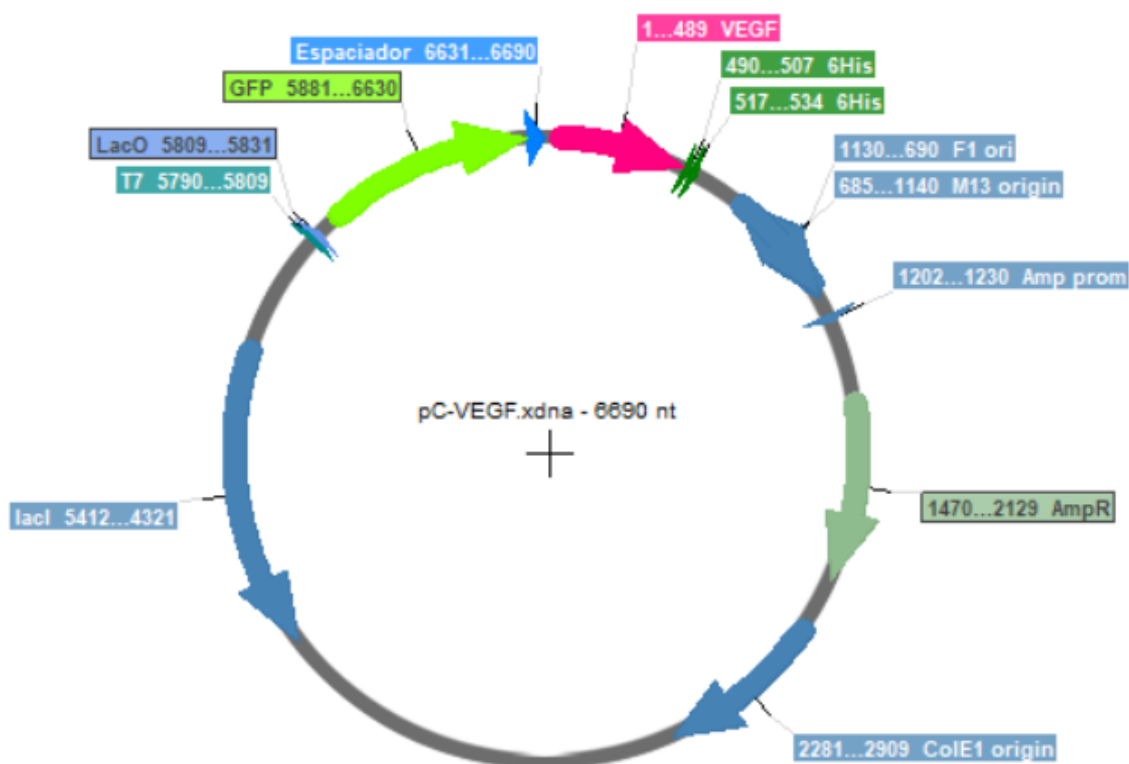


Imagen 6. Propuesta de construcción *in silico* pC-VEGF.

Finalmente, se obtuvo una secuencia total de 6690 pb, junto con los oligonucleótidos necesarios para realizar el ensamblaje y producir la proteína de fusión VEGF-Espaciador-GFP.

Tabla 4. Oligonucleótidos para el ensamblaje.

Oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótido 5' (superposición/complementario) 3'
pET-VEGF <i>fwd</i>	ggtcgggtggcggcggtatctATGGCAGAAGGAGGAGGG
pET-VEGF <i>rev</i>	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTTC
pNCS-mClover3 <i>fwd</i>	aagaaggagatatacatatgCGGGATCTGTACGACGATG
pNCS-mClover3 <i>rev</i>	CTTGACAGCTCGTCCATG
Espaciador <i>fwd</i>	gcatggacgagctgtacaagGGTGGCGGCGGATCTGGTG
Espaciador <i>rev</i>	AGATCCGCCGCCACCCGA

4.2 Recuperación de plásmido

Se recuperó por separado el plásmido pNCS-mClover3 y pET-VEGF del papel filtro utilizando agua libre de nucleasas y se incubaron a - 4 °C durante la noche.

4.3 Transformación celular

Empleando células químicamente competentes de *Escherichia coli* con 5 µL del plásmido pNCS-mClover3 o pET-VEGF, se introdujo el plásmido por choque térmico y se evaluó su transformación incubando las células durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se procedió a realizar un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en cada placa como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Conteo en placa de unidades formadoras de colonias (UFC).

Nombre	Medio LB con Ampicilina (200 µg/mL)	UFC
Control negativo	-	0
Control de viabilidad	-	Incontable
Control de no transformación	✓	0
pNCS-mClover3	✓	349
pET-VEGF	✓	29

En el “control de viabilidad” se sembraron células no transformadas que se sometieron al mismo proceso de choque térmico que las células transformadas. El resultado de crecimiento incontable en la placa permite concluir que las células se mantienen viables con respecto al proceso de transformación expuesto.

En el “control no transformadas”, se sembraron células no transformadas en medio LB con antibiótico, las cuales fueron sometidas al mismo proceso de transformación. La ausencia de crecimiento (0 UFC) indica que las células no poseen el gen de resistencia a la ampicilina.

Por otro lado, el crecimiento de 29 UFC para “pET-VEGF” y de 349 UFC para “pNCS-mClover3” en medio LB con ampicilina demuestra que las bacterias fueron transformadas con el plásmido, adquiriendo también el gen de resistencia.

4.4 Purificación de plásmido

Para la purificación del plásmido pNCS-mClover3 y pET-VEGF, se obtuvo una concentración de plásmido de 27.1 mcg/mL y 22.5 mcg/mL respectivamente, calculado a partir de la absorbancia obtenida de 0.542 por espectrofotometría de luz UV a 260 nm.

Para visualizar el material en gel de agarosa al 1 %, fue teñido con bromuro de etidio 0.1 µg/mL. Como resultado de la electroforesis, se observaron bandas nítidas y definidas del plásmido pNCS-mClover3 y pET-VEGF.

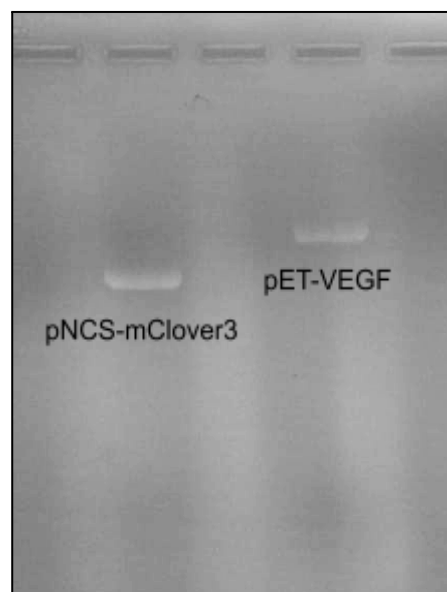
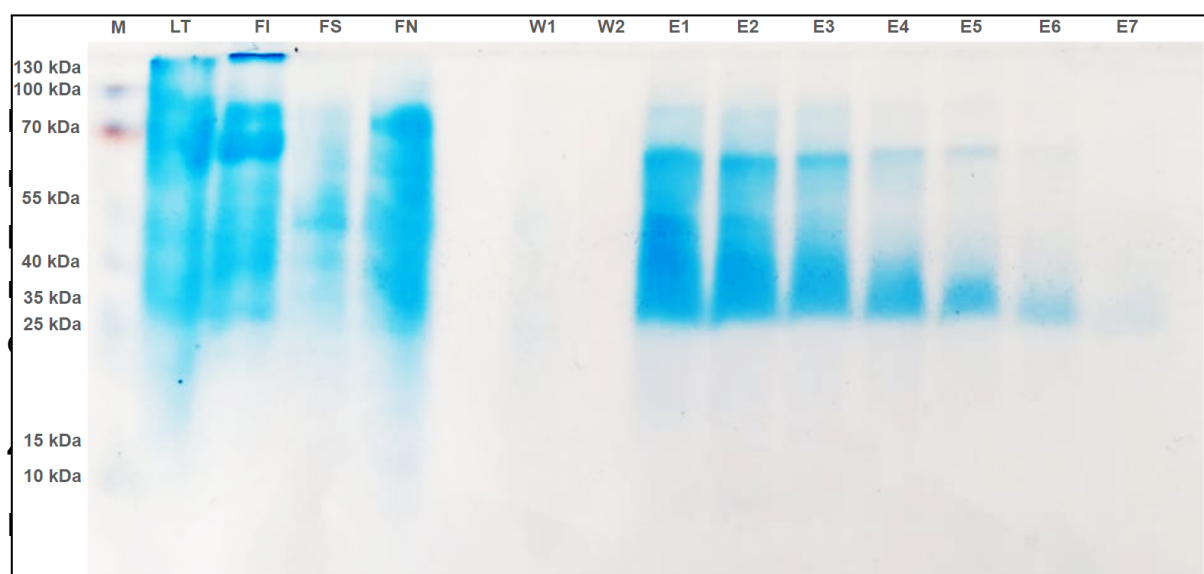


Imagen 7. Electroforesis en gel de agarosa. Migración de plásmido pNCS-mClover3 y pET-VEGF.

4.5 Expresión y purificación de GFP

Las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 12 % y teñido con azul de Coomassie. Los carriles corresponden a: (M) Marcador de peso molecular, (LT) Lisado Total, (FI) Fracción Insoluble, (FS) Fracción soluble, (FN) Fracción no unida, (W1) Lavado 1, (W2) Lavado 2, (E1) Elución 1, (E2) Elución 2, (E3) Elución 3, (E4) Elución 4, (E5) Elución 5, (E6) Elución 6, (E7) Elución 7.



a una concentración de 1,014.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 459,005 unidades relativas de fluorescencia. Posterior al recubrimiento, la solución restante se cuantificó

obteniendo una concentración de 1,605.8 $\mu\text{g/mL}$ y 490,882 unidades relativas de fluorescencia. Esto permitió calcular un valor teórico de 8.67 $\mu\text{g/mL}$ de proteína cargada en la sutura.

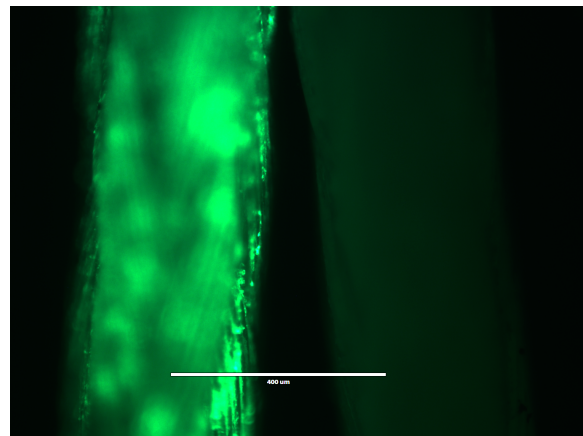
4.6.1 Evaluación del cargado de suturas con GFP por microscopía de fluorescencia

La evaluación del cargado de proteína en suturas se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia invertido con filtro GFP para visualizar la fluorescencia de mClover3. Las suturas cargadas fueron comparadas con un control negativo el cual fue pre-hidratado con agua destilada.

A)



B)



C)



D)

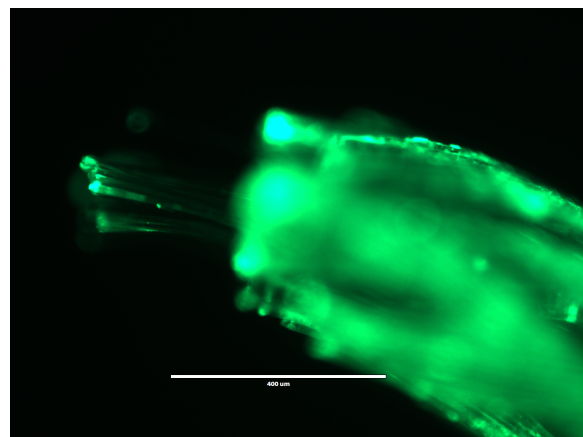


Imagen 9. Evaluación de cargado de proteína en suturas por microscopía de fluorescencia.

En la imagen 9A se muestra la micrografía en campo claro de la sutura Vicryl cargada con mClover3 y la sutura sin proteína como control negativo.

En la imagen 9B, se observa la micrografía de las suturas de la imagen A aplicando un filtro de fluorescencia. Se observa fluorescencia en la sutura de la izquierda correspondiente a Vicryl cargada con mClover3, el control negativo no presenta fluorescencia.

En la imagen 9C y 9D se observa un extremo de la sutura Vicryl cargada con mClover3 mostrando una micrografía en campo claro (Imagen 9C) y una micrografía con filtro de fluorescencia (Imagen 9D).

4.7 Cuantificación de GFP

4.7.1 Curva de calibración por el método de Bradford

Para cuantificar la proteína liberada se empleó el método de Bradford, para esto se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés).

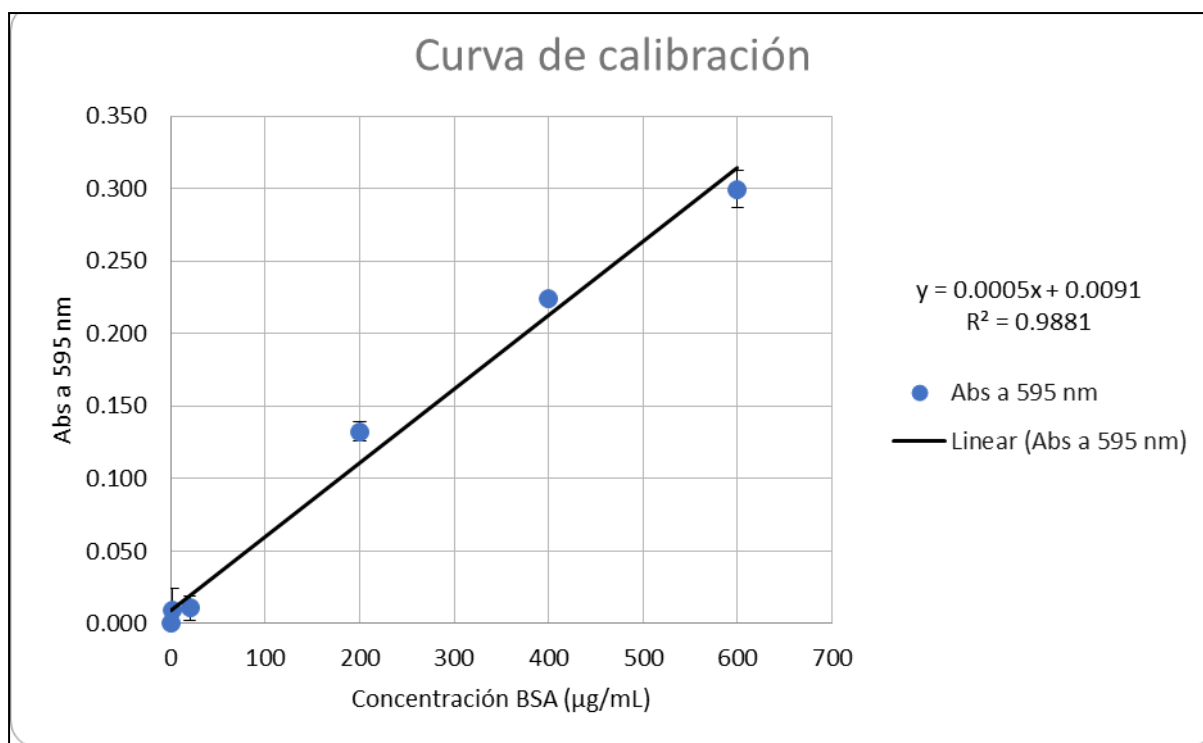


Gráfico 1. Curva de calibración por el método de Bradford.

Ecuación de la curva:

$$BSA (\mu g/mL) = \frac{Absorbancia - 0.0091}{0.0005}$$

Donde *Absorbancia* es un valor de absorción recuperada del lector de microplacas a la longitud de onda de 595 nm.

4.7.2 Cuantificación de GFP por Bradford

Se cuantificó por Bradford la solución de liberación de las suturas Vicryl de 10 cm, cargadas con 500 μL de mClover3 a una concentración inicial de 1,614.5 μg/mL y, como control negativo, suturas Vicryl no cargadas. Posterior al proceso de recubrimiento, la solución de mClover3 fue cuantificada obteniendo una concentración de 1,605.8 μg/mL; esto permitió calcular un valor teórico de 8.67 μg/mL de proteína cargada en la sutura.

4.7.3 Escaneo de longitud de onda máxima de emisión y excitación GFP.

Se realizó un escaneo de fluorescencia para seleccionar la longitud de onda máxima de emisión y excitación de la proteína mClover3. Se determinó la longitud de onda máxima 477 nm para excitación y 520 nm para emisión.

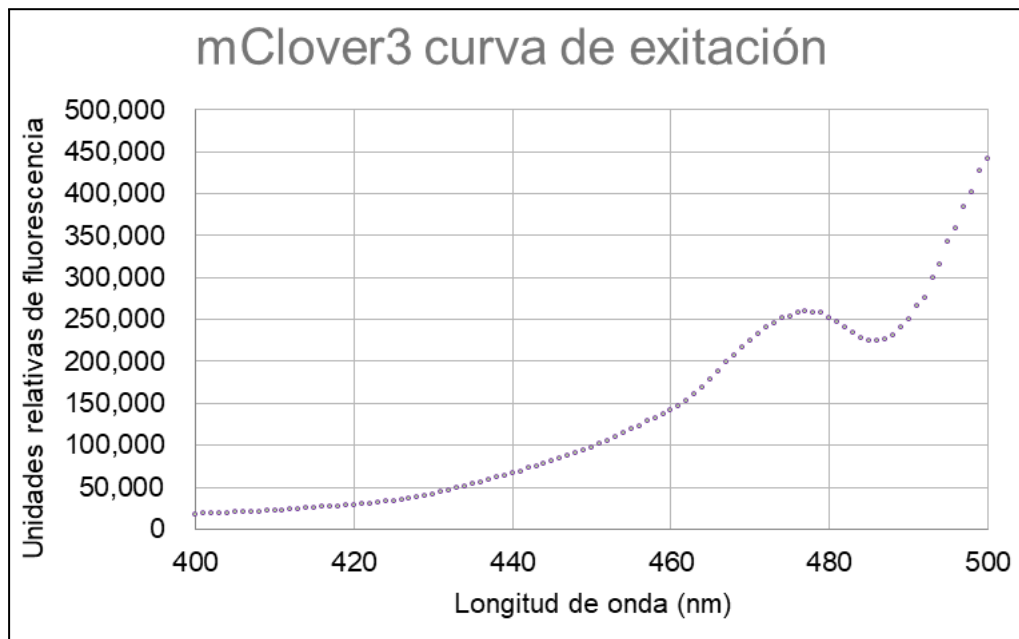


Gráfico 2. Barrido mClover3 excitación.

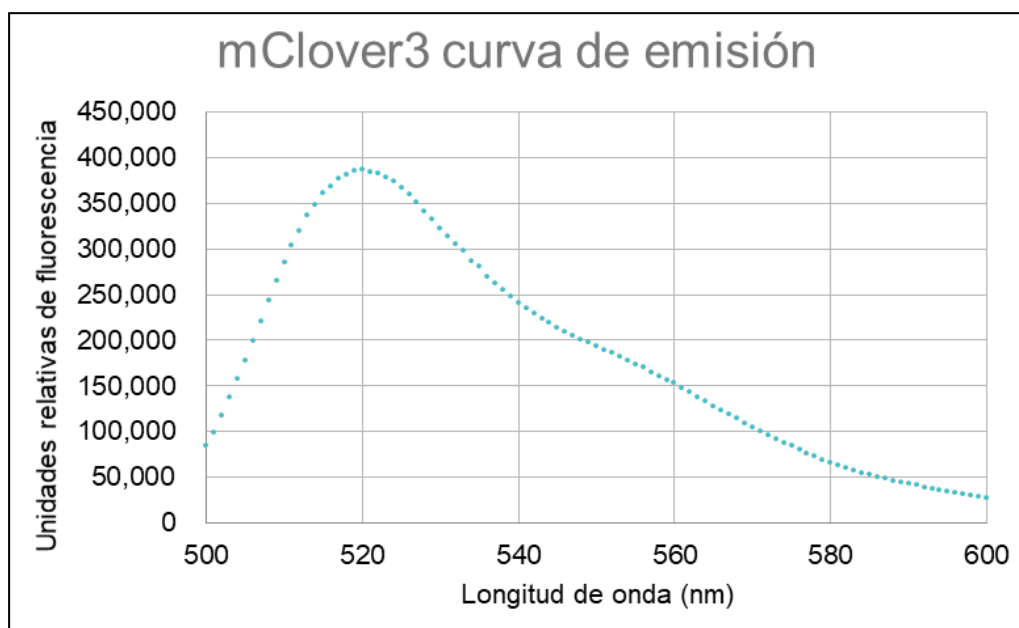


Gráfico 3. Barrido mClover3 emisión.

4.8 Liberación de proteína

Para evaluar la liberación de mClover3 posterior a 3 días, se utilizaron segmentos de 2 cm de las suturas cargadas. La liberación de proteína desde estos segmentos fue cuantificada en $\mu\text{g/mL}$, empleando suturas Vicryl no recubiertas como control negativo. El Gráfico 4 muestra las concentraciones de proteína liberada en las suturas después de 3 días.

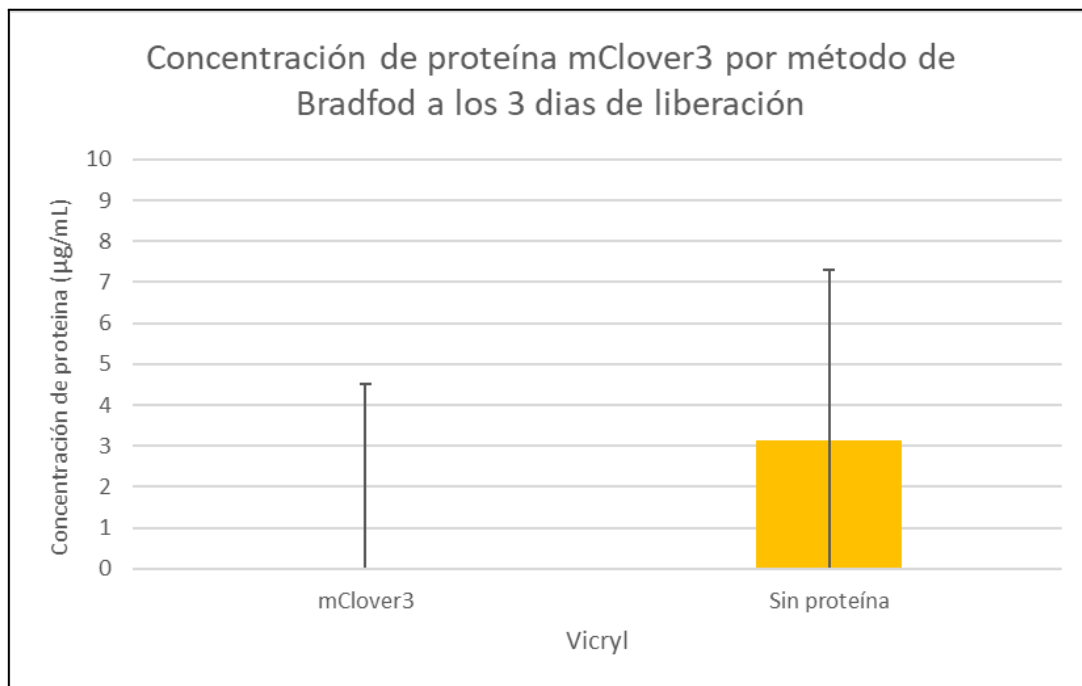


Gráfico 4. Cuantificación proteína GFP por método de Bradford a los 3 días de liberación.

En el eje de X, la sutura cargada con mClover3 mostró una concentración de $0 \pm 4.71 \mu\text{g/mL}$, indicando una desviación estándar muy alta. En la sutura como control negativo, se obtuvo una concentración de $3.13 \pm 4.16 \mu\text{g/mL}$ de proteína, lo cual podría deberse a un proceso de degradación de la propia sutura.

Por otro lado, dado que los resultados presentan una alta dispersión y las concentraciones están cerca del límite inferior de detección del método, no es posible determinar con precisión la cuantificación de proteína liberada por el método de Bradford.

Dado que los resultados obtenidos con el método de Bradford no fueron precisos, se evaluó la liberación de proteína utilizando unidades relativas de fluorescencia. Para ello, se analizaron segmentos de 2 cm de las suturas recubiertas con mClover3, empleando nuevamente las suturas no recubiertas como control negativo. El Gráfico 5 presenta la cinética de liberación de proteína durante 72 horas.

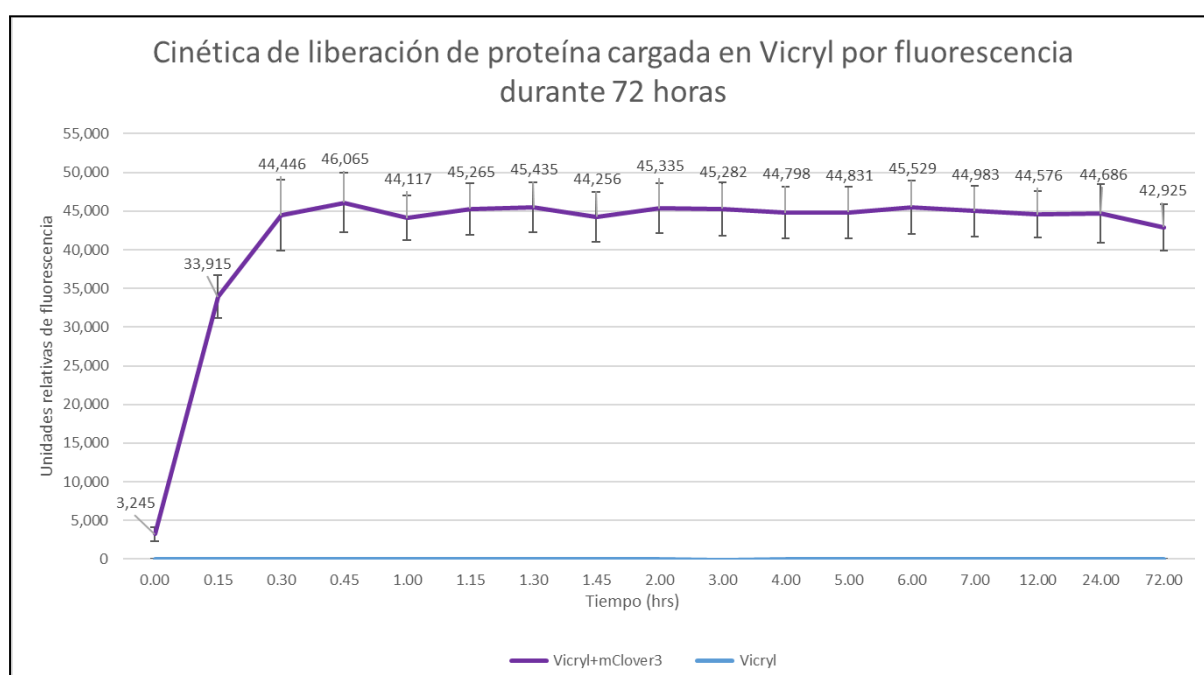


Gráfico 5. Cinética de liberación de proteína cargada en Vicryl por fluorescencia durante 72 horas.

El eje de X muestra los tiempos de liberación de proteína de suturas cargadas con mClover3 y el control negativo (sutura sin cargar con GFP) durante 72 horas. Se muestra un intervalo de tiempo inicial de 15 min durante las primeras 2 horas de liberación. Posteriormente, se registró la liberación de proteína a intervalos de 1 hora hasta las 7 horas. Se continuó la cinética a las 12 horas, 24 y 72 horas.

El eje de Y refleja las unidades relativas de fluorescencia obtenidas. En la sutura cargada con mClover3, el tiempo 0 registró una lectura de $3,245 \pm 916$ unidades relativas de fluorescencia, a los 15 min a $33,915 \pm 2,800$, posteriormente la medición se mantuvo en un promedio de $44,835 \pm 3,401$ unidades relativas de fluorescencia hasta las 72 horas.

4.9 Relación entre unidades relativas de fluorescencia de proteína liberada y concentración de proteína en µg/mL

La relación entre las unidades relativas de fluorescencia liberada y su cuantificación de proteína en µg/mL, se calculó utilizando los datos de proteína cuantificada de mClover3 (708.73 µg/mL) y las unidades relativas de fluorescencia (urf) obtenida de la misma solución (441,169 urf) realizando la siguiente fórmula:

$$\mu g/mL \text{ de proteína en } 1 \text{ urf} = \frac{1 \text{ urf} * 708.73 \mu g/mL}{441,169 \text{ urf}}$$

Dando como resultado un total de 0.00161 µg/mL de proteína en 1 urf.

En base a este dato, se calculó la cantidad de proteína liberada de la sutura en µg/mL utilizando la fluorescencia obtenida de las mismas.

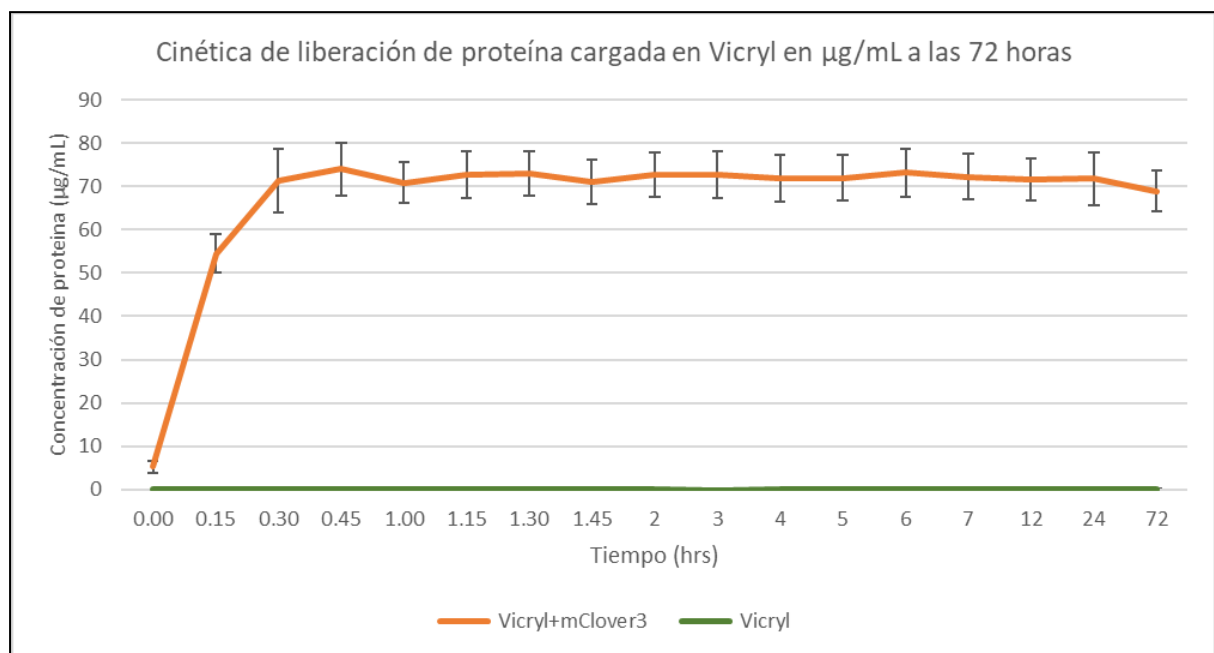


Gráfico 6. Cinética de liberación de proteína cargada en Vicryl en µg/mL a las 72 horas.

El eje X del Gráfico 6 muestra las lecturas realizadas durante un periodo de 3 días de liberación de proteína desde segmentos de 2 cm de la sutura Vicryl recubierta con mClover3, así como el control negativo sin proteína. El eje Y muestra la concentración de proteína en µg/mL, calculada a partir de las unidades relativas de

fluorescencia obtenidas durante la liberación de proteína. Posterior a los 30 minutos, se observó una concentración promedio de $72 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$ en las suturas recubiertas, mientras que el control negativo no presentó proteína detectable.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que por este método es posible determinar la concentración de proteína liberada.

4.10 Determinación de μg proteína liberada por cm^2 de sutura

Para calcular la cantidad de proteína liberada por cm^2 , se utilizó el área de la sutura y la concentración de proteína liberada en $\mu\text{g/mL}$. Por lo que se procede a calcular el área de la sutura con la siguiente fórmula:

$$\text{Área del cilindro} = 2\pi rh$$

Donde r es el radio de la sutura (dado que el diámetro es de 0.02 cm, el radio es 0.01 cm) y h la longitud de la misma (2 cm). Por lo tanto, los datos se desglosan de la siguiente manera:

$$\text{Área de sutura} = 2\pi * 0.01 \text{ cm} * 2 \text{ cm}$$

$$\text{Área de sutura} = 0.1257 \text{ cm}^2$$

El volumen de liberación (0.1 mL) se utilizó para calcular la cantidad proteína en μg de las muestras multiplicando los $\mu\text{g/mL}$ liberados de GFP con el volumen de liberación, para posteriormente multiplicar por el área de sutura obteniendo los siguientes resultados graficados.

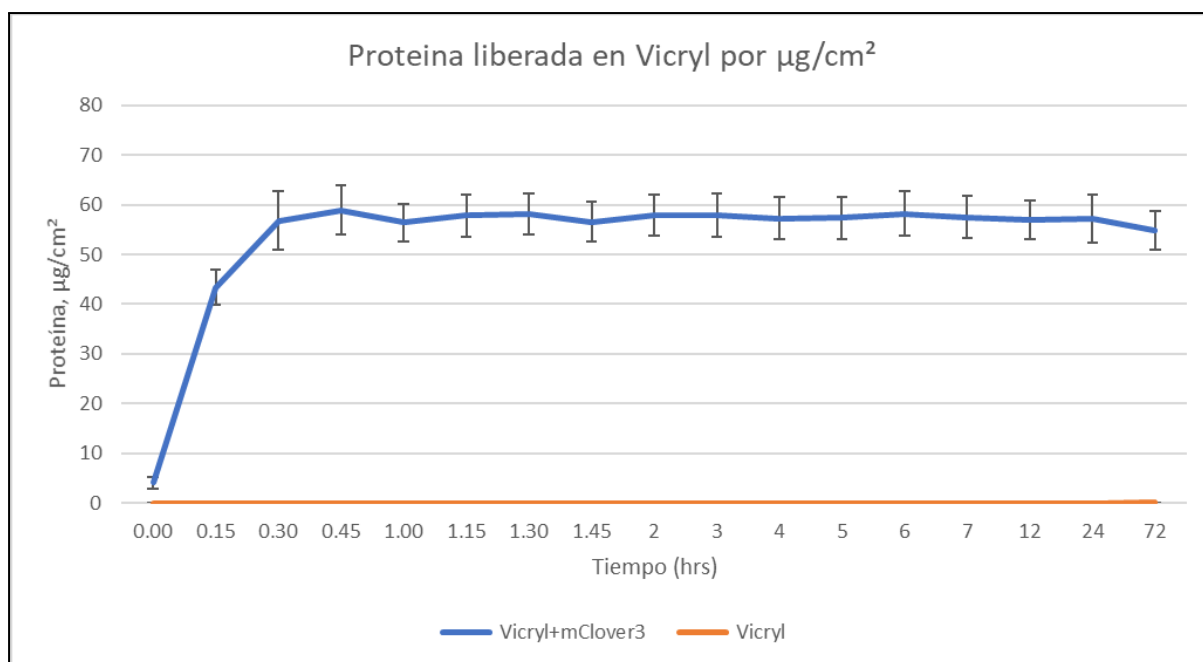


Gráfico 7. Liberación de proteína cargada en Vicryl en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ por 72 horas.

El eje X del Gráfico 7 representa las lecturas realizadas durante un periodo de 3 días de liberación de proteína desde segmentos de 2 cm de la sutura Vicryl recubierta con mClover3, así como el control negativo sin proteína. El eje Y muestra la concentración de proteína en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, calculada a partir del área de la sutura y volumen de liberación de la proteína. Se observó una concentración promedio de $53.4 \pm 4.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en las suturas recubiertas, mientras que el control negativo no presentó proteína detectable.

4.11 Determinación de % proteína cargada/liberada de sutura

Para calcular el porcentaje de proteína cargada/liberada de la sutura, se utilizaron los valores de proteína liberada en μg , la concentración inicial de mClover3 en μg y el volumen de carga utilizado en la sutura.

La concentración inicial de GFP se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Concentración inicial GFP} &= (\text{GFP } \mu\text{g}/\text{mL})(\text{Volumen de cargado}) \\ \text{Concentración inicial GFP} &= (1,614.8 \mu\text{g}/\text{mL})(0.5 \text{ mL}) = 807.2 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Una vez obtenida la concentración inicial, se procedió a calcular el porcentaje de proteína cargada/liberada de cada muestra de sutura Vicryl con GFP.

$$\% GFP = \frac{Vicryl\ GFP\ \mu g}{Concentración\ inicial\ GFP} * 100$$

$$\% GFP = \frac{Vicryl\ GFP\ \mu g}{807.2\ \mu g} * 100$$

Posteriormente, se aplicó esta fórmula para obtener los datos que se muestran en el Gráfico 8, que representa la liberación de proteína cargada en la sutura Vicryl en porcentaje a lo largo de 72 horas.

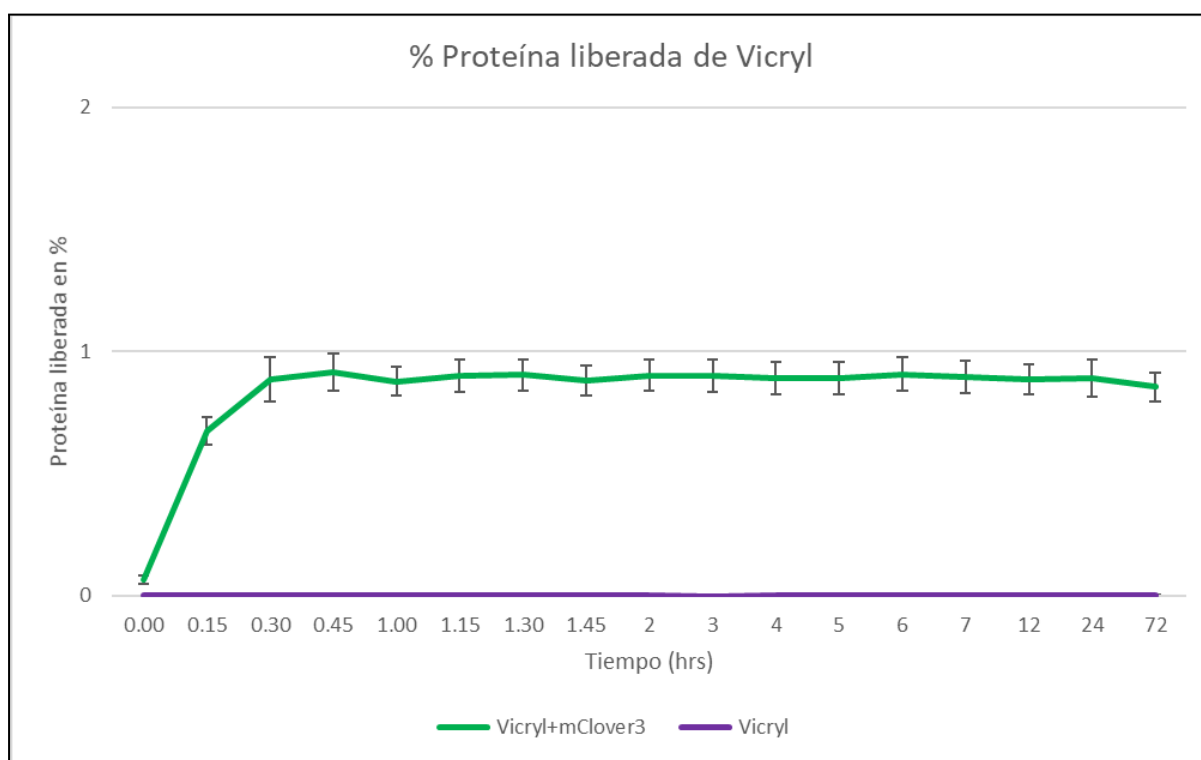


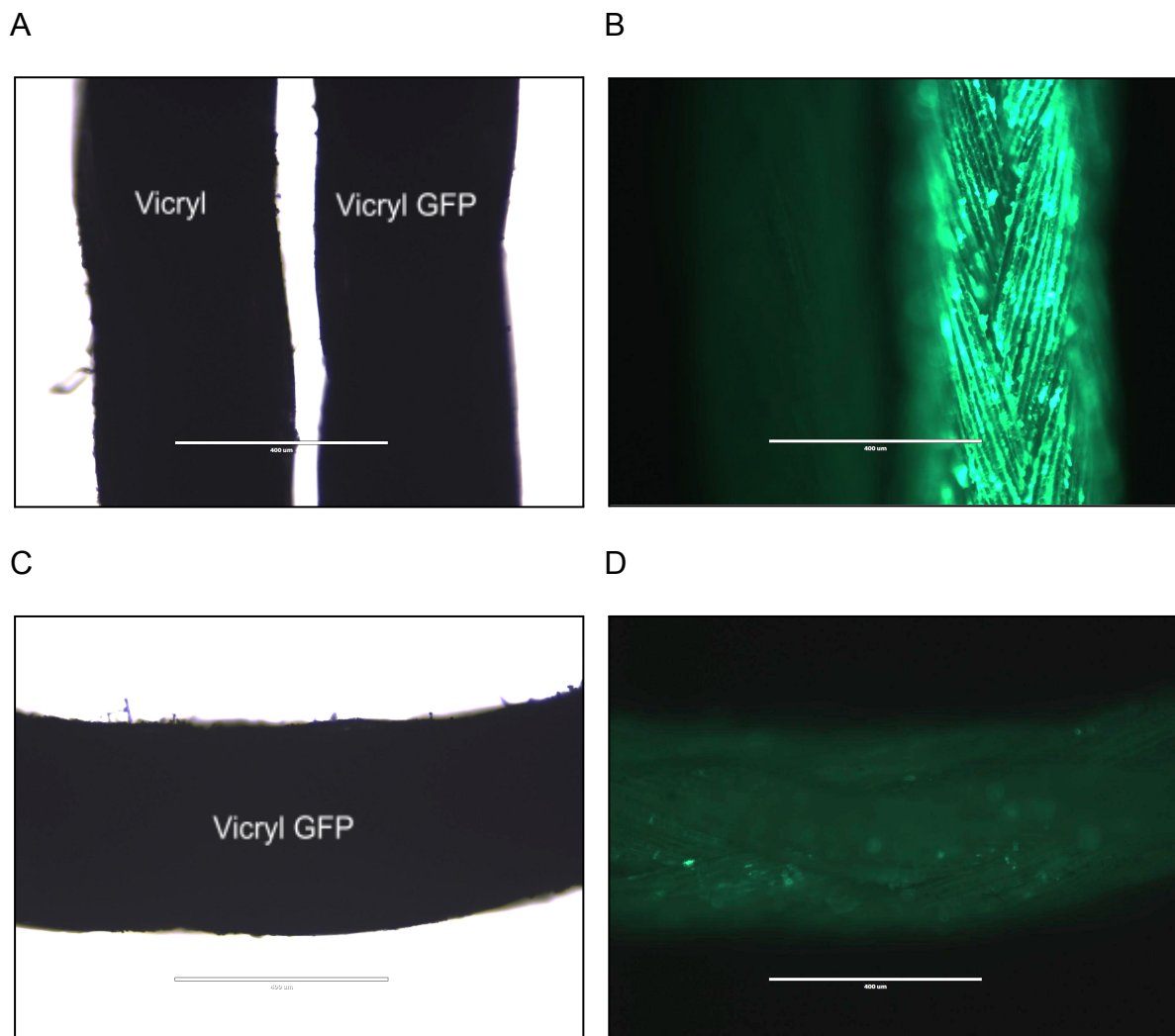
Gráfico 8. Liberación de proteína cargada en Vicryl en % por 72 horas.

El eje X del Gráfico 8 corresponde a las lecturas tomadas durante un periodo de 72 horas de liberación de proteína desde segmentos de 2 cm de la sutura Vicryl recubierta con mClover3, incluyendo un control negativo sin proteína.

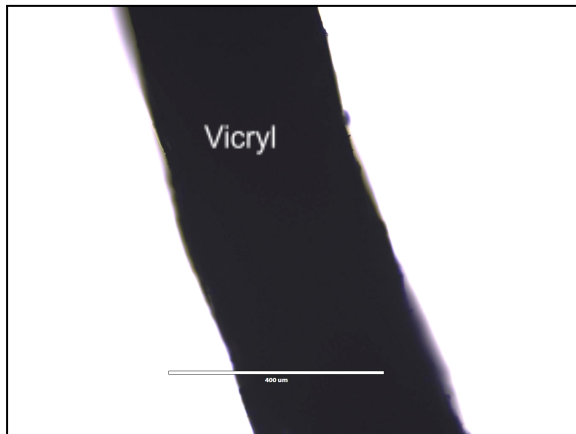
El eje Y muestra la concentración de proteína en porcentaje. Se observó una liberación promedio de 0.9 ± 0.1 % en las suturas recubiertas, mientras que el control negativo no presentó valores detectables.

4.12 Evaluación de liberación de GFP de suturas por microscopía de fluorescencia

Se evaluaron las suturas Vicryl se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia invertido con filtro GFP (470 nm excitación, 525 nm emisión) para visualizar la fluorescencia de mClover3 adherida después del proceso de liberación. Como resultado, se presenta en la Imagen 10 el análisis realizado.



E



F

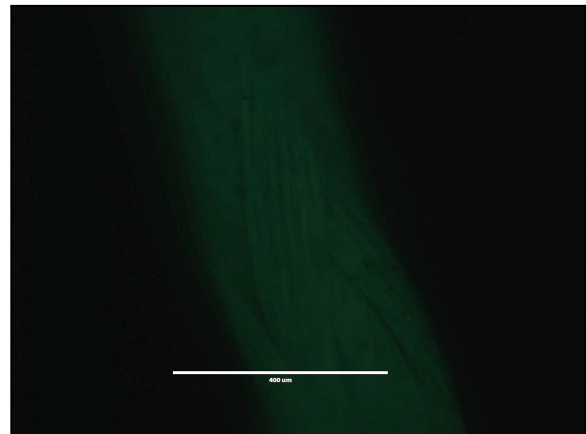


Imagen 10. Evaluación de liberación de proteína en suturas por microscopía de fluorescencia.

En la Imagen 10A, se muestra micrografía en campo claro de la sutura cargada con GFP y una sutura control. Mientras que en la Imagen 10B muestra las suturas bajo el filtro de fluorescencia GFP, en donde es posible observar una señal en la sutura cargada con GFP, pero no en la sutura control.

La Imagen 10C muestra la micrografía en campo claro a la sutura cargada y liberada durante 3 días. En la Imagen 10D, se observa la misma sutura bajo el filtro de fluorescencia GFP, mostrando una disminución significativa de proteína, lo que impide detectar la fluorescencia. Sin embargo, se identificaron pequeños remanentes de GFP entre el trenzado de la sutura.

La Imagen 10E muestra la micrografía en campo claro a la sutura control posterior a las condiciones controladas de liberación durante 3 días. En la Imagen 10F, se observa la misma sutura bajo el filtro de fluorescencia GFP, mostrando la ausencia de fluorescencia.

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

Se visualizó el cargado de la proteína en los hilos mediante microscopía de fluorescencia. El cargado confirmó la capacidad de la sutura para albergar proteínas manteniendo su propiedad fluorescente.

La cuantificación basada en fluorescencia permitió una evaluación de la cantidad de proteína cargada y liberada, obteniéndose un total de 0.9 % de mClover3.

5.2 Perspectivas

La proteína mClover3 se libera de manera rápida de las suturas. Este comportamiento sugiere que para aplicaciones biológicas prolongadas sería recomendable desarrollar un método que permita una liberación controlable, por ejemplo, un entrecruzamiento químico podría ser una técnica viable para retardar la liberación y prolongar la actividad en el sitio de implantación.

Capítulo 6. Bibliografía

1. Aranda M. J. M. (2013). “La Terapia de Presión Negativa, una herramienta eficaz en el tratamiento de las heridas”. Revista de la Sociedad Española de Heridas, Tomo 4, No. 13.
2. Taktak-BenAmar, A., Morjen, M., Ben Mabrouk, H. et al. (2017) “Expression, purification and functionality of bioactive recombinant human vascular endothelial growth factor VEGF165 in *E. coli*”. *AMB Express* 7, 33.
3. Bajar BT, Wang ES, Lam AJ, Kim BB, Jacobs CL, Howe ES, Davidson MW, Lin MZ, Chu J. (2016) “Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting”. *Sci Rep.* 6:20889.
4. Block SS, editor. (2001) “Disinfection, Sterilization, and Preservation”. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia.
5. Bradford MM. (1976) “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal Biochem.* 72:248-54.
6. Calvo López, T. (2014). “Purificación y caracterización de la proteína fusión ScSsu72 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”. Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Murcia.
7. Chan, C., Sandhu, J., Guha, A., Scollard, D. A., Wang, J., Chen, P., Bai, K., Lee, L., & Reilly, R. M. (2005). “A human transferrin-vascular endothelial growth factor (hTf-VEGF) fusion protein containing an integrated binding site for ¹¹¹In for imaging tumor angiogenesis”. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(10), 1745-1752.
8. Chen X, Hou D, Tang X, Wang L. (2015) “Quantitative physical and handling characteristics of novel antibacterial braided silk suture materials”. *J Mech Behav Biomed Mater*, 50:160-70.
9. Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). “Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*”. *Chemical Engineering Science*, vol. 61, pp. 876-885.
10. Drago Serrano, M. E., & Sainz Espuñes, T. D. (2006). “Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes”. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(1), 38-44.

11. Ferrara N. (2004) "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress". *Endocrine Reviews*, 25(4):581-611.
12. Franco, A. Y., & Longart, M. (2009). "Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso." *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2),84-96.
13. Fuchs, T. F., Surke, C., Stange, R., Quandt, S., Wildemann, B., Raschke, M. J., & Schmidmaier, G. (2012). "Local delivery of growth factors using coated suture material". *The Scientific World Journal*, 2012, Article 109216.
14. García-Aranda, M. I., & Ángel, A. (2011). "Análogos de VEGF y VAMMIN: Nueva aproximación en la búsqueda de inhibidores de angiogénesis (Tesis doctoral)". Universidad Complutense de Madrid, España.
15. Gartti-Jardim EC, de Souza AP, Carvalho AC, Pereira CC, Okamoto R, Magro Filho O. (2013) "Comparative study of the healing process when using Vicryl®, Vicryl Rapid®, Vicryl Plus®, and Monocryl® sutures in the rat dermal tissue". *Oral Maxillofac Surg*, 17(4):293-8.
16. Ghasemi-Mobarakeh, L, Kolahreez, D., Ramakrishna, S., Williams, D. (2019). "Key terminology in biomaterials and biocompatibility". *Current Opinion in Biomedical Engineering* 2.10:45-50.
17. Gómez R, Madrazo J, González L, China G, Musacchio A, Rodríguez A, et al. (1999) "Caracterización estructural y funcional de la proteína recombinante P64k de *Neisseria meningitidis*". *Biotecnología Aplicada*, 16(2):83-7
18. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, et al. (2015) "Comparación entre sutura recubierta con antibacterial versus cierre tradicional en la incidencia de complicaciones en apendicectomías y colecistectomías laparoscópicas". *Rev Mex Cir Endoscop*. 16(1-4):31-36.
19. Hend A. Anter, Sherif Moussa Hussein, Fafy A. Mohammed (2023) "Green Fluorescent Protein: discover, structure, purification, applications, and future prospects". *Journal of Scientific Research in Science*.
20. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. (1991) "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA". *Mol Endocrinol*, 5(12):1806-14.
21. Jeremy Mark Berg, Lubert Stryer, John L. Tymoczko (2007) "Bioquímica". 6ta Edición. Editorial Reverte. Barcelona.

22. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. (2002) "Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*". *Biotechnol Appl Biochem*, 35(2):91-105.
23. Katz, S., Izhar, M., & Mirelman, D. (1981). "Bacterial adherence to surgical sutures: A possible factor in suture-induced infection". *Annals of Surgery*, 194(1), 35-41.
24. Li, Lei & Jiang, Weihong & Lu, Yinhua. (2018) "A Modified Gibson Assembly Method for Cloning Large DNA Fragments with High GC Contents". In *Methods in Molecular Biology: Synthetic Metabolic Pathways* (Vol. 1671, pp. 203-209) 10.1007/978-1-4939-7295-1_13.
25. López-Saucedo, F., Flores-Rojas, G. G., López-Saucedo, J., Magariños, B., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., & Bucio, E. (2018) "Antimicrobial silver-loaded polypropylene sutures modified by radiation-grafting". *European Polymer Journal*, 100, 290-297.
26. Martínez-Garduño M., García-Ferrer V., Gómez-Torres D., Ángeles-Ávila G., (2022) "Cuidado de enfermería para la prevención de infección en sitio quirúrgico en un hospital público de segundo nivel". Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Enfermería y Obstetricia; Toluca, México. Hospital Regional Toluca del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios; Toluca, México.
27. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM. (1997) "The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding". *Structure*, 5(10):1325-38.
28. Ortiz de Elguea-Lizarraga, J. I., Segura-Ibarra, V., Vazquez-Armendariz, J., Garcia-Garcia, A. L., Diaz-Elizondo, J. A., Rodriguez, C., & Flores-Villalba, E. (2021). "Biomechanical evaluation of suture materials used for abdominal fascial closure". *Materials Research Express*, 8(11).
29. Pérez Millán, María Inés, & Becú-Villalobos, Damasia. (2009) "La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia". *Medicina (Buenos Aires)*, 69(3), 370-374.
30. Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. (2001) "Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum". *Biol Reprod*, 65(3):879-89.

31. Reichardt LF, Tomaselli KJ. (1991) "Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development". *Annu Rev Neurosci*, 14:531-70.
32. Rose J, Tuma F. (2023) "Sutures And Needles. In: StatPearls [Internet]". Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;
33. Saavedra Torres, J. S., Zúñiga Cerón, L. F., Freyre Bernal, S. I., Wilson Muñoz Ordoñez, G., & Salguero, C. (2017) "El rol de VEGF en la angiogénesis fisiológica y tumoral". *Med*, 39(3), 190-209.
34. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. (2005) "A guide to choosing fluorescent proteins". *Nat Methods*, 2(12):905-9.
35. Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962) "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*". *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59: 223-239.
36. Stepanenko OV, Stepanenko OV, Kuznetsova IM, Verkhusha VV, Turoverov KK. (2013) "Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore formation". *Int Rev Cell Mol Biol*, 302:221-78.
37. Traub S, Morgner J, Martino MM, Höning S, Swartz MA, Wickström SA, Hubbell JA, Eming SA. (2013) "The promotion of endothelial cell attachment and spreading using FNIII10 fused to VEGF-A165". *Biomaterials*, 34(24):5958-68.
38. Ward, W. W., & Swiatek, G. (2009) "Protein purification". *Current Analytical Chemistry*, 5(2), 85-105.
39. Wei Q, Becherer T, Angioletti-Uberti S, Dzubiella J, Wischke C, Neffe AT, Lendlein A, Ballauff M, Haag R. (2014) "Protein interactions with polymer coatings and biomaterials". *Angew Chem Int Ed Engl*. 53(31):8004-31.
40. Westra DF, Welling GW, Koedijk DG, Scheffer AJ, The TH, Welling-Wester S. (2001) "Immobilised metal-ion affinity chromatography purification of histidine-tagged recombinant proteins: a wash step with a low concentration of EDTA". *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 25;760(1):129-36.
41. World Health Organization (2018) "Global guidelines for the prevention of surgical site infection". 2da ed. Integrated Service Delivery. Switzerland.
42. Yang, Y., Yang, S. B., Wang, Y. G., Zhang, S. H., Yu, Z. F., & Tang, T. T. (2017). "Bacterial inhibition potential of quaternised chitosan-coated VICRYL absorbable suture: An in vitro and in vivo study". *Journal of orthopaedic translation*, 8, 49-61.