

Biocompatibilidad de hidrogel de MHV biofuncionalizado con el péptido LL37 en macrófagos murinos

Jorge López-Gutiérrez^a, Mercedes Bermúdez^b, Rosalio Ramos-Payán^b, Geovanni Romero-Quintana^b, Maribel Aguilar-Medina^{b,*}

^aFacultad de Biología, ^bFacultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. CP 80010, Culiacán, Sinaloa, México.

*maribelaguilar@uas.edu.mx

Palabras clave: Biocompatibilidad, Regeneración tisular, Matriz Extracelular, LL-37.

Introducción

La matriz extracelular (MEC) ⁽¹⁾ es una red tridimensional que cumple diversas funciones como la supervivencia y desarrollo celular, proporciona sostén mecánico a los tejidos y es parte del remodelado de órganos, además de que permite la nutrición y la invasión celular. Distintos tipos de MEC pueden solubilizarse y manipularse para formar hidrogeles expandiendo su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, como materiales que rellenan defectos críticos. Se ha observado que estos materiales estimulan los procesos bioquímicos vitales como migración, proliferación, señalización y activación de diferentes tipos celulares, entre ellos los macrófagos, primordiales para dicho proceso ya que propician un nicho adecuado. Además, se han encontrado péptidos antimicrobianos en la MEC en sitios de inflamación y cicatrización de heridas, un ejemplo de ello es el péptido LL-37, cuya expresión y secreción se eleva ⁽²⁾ y funciona como una señal proliferativa y un factor proangiogénico. En los materiales de regeneración tisular, es importante evaluar la citotoxicidad del mismo para evitar reacciones adversas. Por lo tanto; el objetivo de este trabajo fue evaluar la biocompatibilidad de hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina (MHV) biofuncionalizado con el péptido LL37 en macrófagos murinos.

Metodología

Las células fueron cultivadas al 80% de confluencia. Se colocó medio condicionado de MHV biofuncionalizados con el péptido LL-37 (MHV+LL37) y medio condicionado solo MHV, como control se utilizó medio de cultivo DMEM complementado con 10% SFB y 1% Antibiótico-Antimicótico. Posteriormente, se realizaron pruebas por triplicado de citotoxicidad utilizando el kit Cytotoxicity Detection LDH Sigma Promega ⁽³⁾ a las 24 horas, colocando 25x10³ células por pocillo. Para las pruebas de proliferación se utilizó el kit CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay ⁽⁴⁾, se colocaron 15x10³ células por pocillo y se evaluó a las 24, 48 y 72 horas con sus respectivos controles por triplicado. Además, se observó la morfología celular con tinción de Hemocolorante rápido. Asimismo se realizó el ensayo de vida y muerte ⁽⁵⁾ a una concentración celular de 10X10⁴ a las 24 horas de exposición, colocando H₂O₂ como control negativo y se utilizó microscopía confocal para su visualización. También se evaluaron diversas citocinas involucradas en la señalización celular utilizando el Kit BD Cytometric Bead Array CBA Mouse Inflammation ⁽⁶⁾. Los

resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía con análisis post-hoc de Bonferroni utilizando el programa SPSS v20.0.

Resultados y discusión

Al comparar la citotoxicidad entre grupos no se observaron células muertas en ninguno de ellos (p> 0.5). En el ensayo de proliferación, fue muy similar entre los grupos MHV y MHV+LL37, ambos muestran un retraso en la cinética de crecimiento (p> 0.5). El ensayo de proliferación muestra que el grupo DMEM presentó un número mayor de células a las 72 horas. Mientras que en el ensayo de vida y muerte se observaron células activas y vitales en todos los grupos. Además, en el ensayo de matrices de perlas citométricas se observó elevada expresión de TNF e IL-12p70 en MHV+LL37, respecto a MHV y DMEM.

Conclusiones

Los resultados muestran que los materiales evaluados no presentan citotoxicidad, sin embargo, MHV+LL37 disminuye la proliferación a las 48 y 72 horas, sugiriendo alteraciones en el ciclo celular, Se concluye que MHV presentó la mejor biocompatibilidad de los materiales estudiados.

Referencias

1. Torres JSS, Cerón LFZ, López JAV, Amézquita CAN, Sánchez LPM, Bernal SIF. La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. *Morfología*. 2015;7(1).
2. Rivas L, Andreu D. Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿una nueva alternativa en clínica? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2003;21(7):358-65.
3. Arsalane K, Gosset P, Vanhee D, Voisin C, Hamid Q, Tonnel A-B, et al. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1995;13(1):60-8.
4. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of immunological methods*. 1990;131(2):165-72.
5. Sabido O, Figarol A, Klein J-P, Bin V, Forest V, Pourchez J, et al. Quantitative Flow Cytometric Evaluation of Oxidative Stress and Mitochondrial Impairment in RAW 264.7 Macrophages after Exposure to Pristine, Acid Functionalized, or Annealed Carbon Nanotubes. *Nanomaterials*. 2020;10(2):319.
6. Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *The Journal of Immunology*. 2010;184(5):2671-6.