

7. ANEXOS

ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Tabla 3. Relación de los objetivos del desarrollo sostenible con el desarrollo de soportes bioactivos para la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales humanas

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				
ODS 2. Hambre cero.				
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				
ODS 5. Igualdad de género.				
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				
ODS 12. Producción y consumo responsables.				
ODS 13. Acción por el clima.				
ODS 14. Vida submarina.				
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				

ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				

Este trabajo tiene contribuye al objetivo 3, salud y bienestar, al buscar nuevas estrategias para avanzar en la regeneración ósea. Además, el uso de materiales piezoeléctricos y nanopartículas también está relacionado con el objetivo 9 llamado industria, innovación e infraestructuras, debido al desarrollo de soportes novedosos en el campo de la medicina regenerativa.

ANEXO II: DECONVOLUCIÓN DE LOS ESPECTROS FTIR ENTRE 1140 y 1300 cm^{-1}

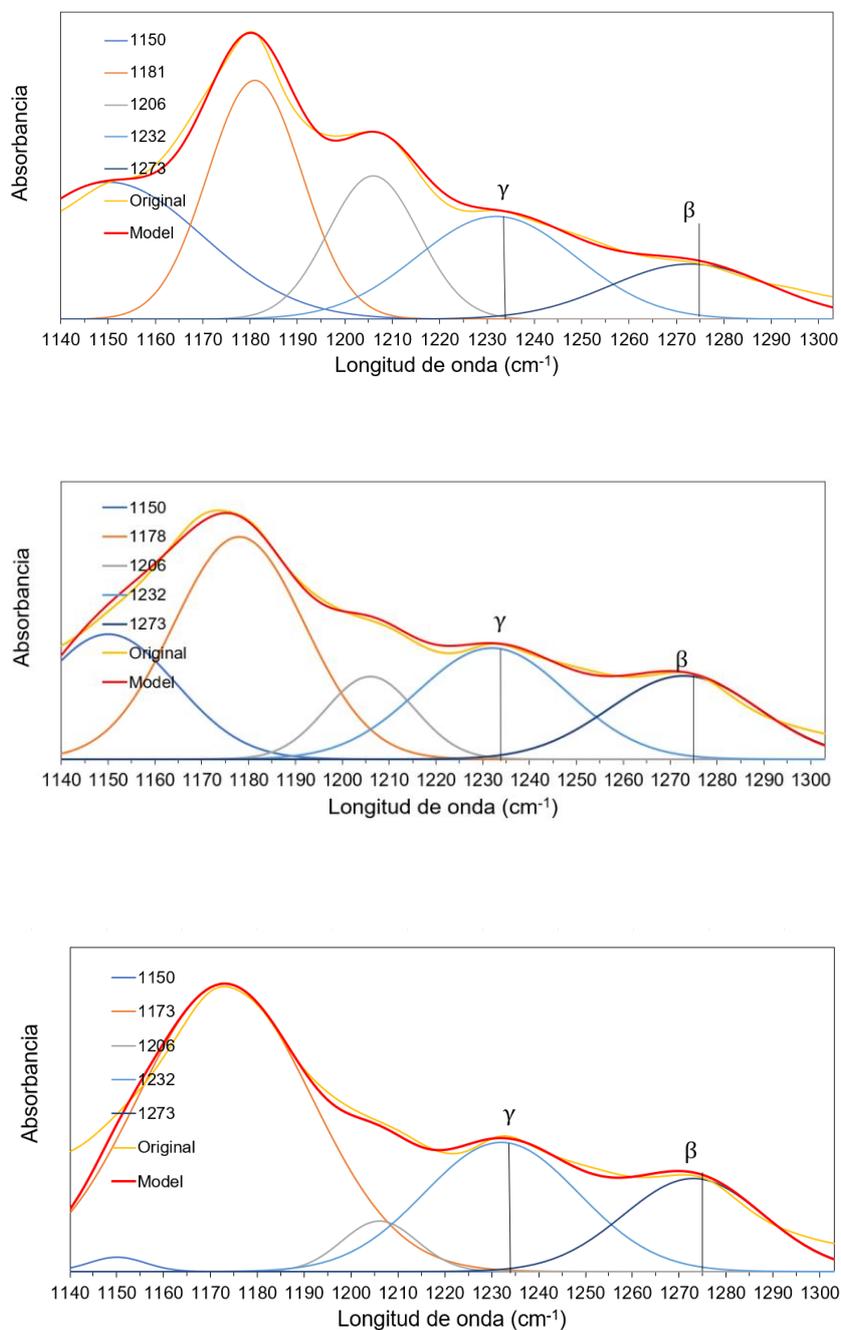


Figura S1. Deconvolución de los espectros FTIR de membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE) entre 1140 y 1300 cm^{-1} . a) Deconvolución de PVDF b) Deconvolución de PVDF-CFO. c) Deconvolución de PVDF-FE. Los picos aislados de las fases β y γ se obtuvieron a partir de los espectros originales (amarillo).

ANEXO III: OBTENCIÓN MANUAL DE LAS MÁSCARAS A PARTIR DE LAS IMÁGENES DEL CITOESQUELETO

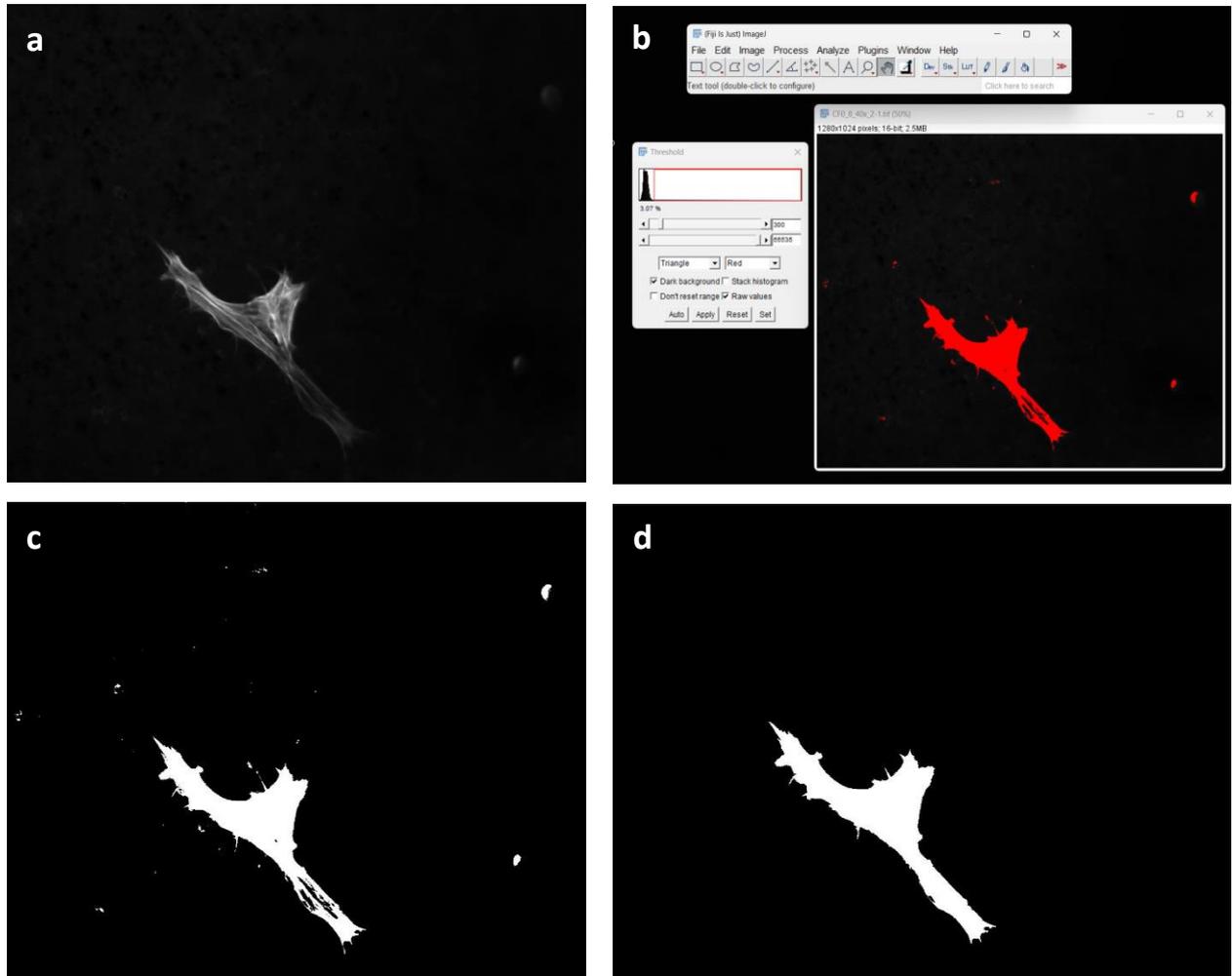


Figura S2. Ejemplificación de la obtención de máscaras binarias de las células a partir del citoesqueleto de actina de una célula de poli(fluoruro de vinilideno) con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y su limpieza para poder obtener después las medidas morfométricas. a) Imagen del citoesqueleto de actina obtenida con el microscopio de fluorescencia. b) Captura de pantalla del ajuste manual del umbral de grises para segmentar la imagen. c) Máscara binaria resultante del ajuste del umbral de grises. d) Máscara final limpia y perfeccionada, obtenida al correr la macro del Anexo IV, y a partir de la cual se obtienen las medidas morfométricas.

ANEXO IV: CONSTRUCCIONES MACROS DEL ANÁLISIS DE IMAGEN

a

```
1 //Abrimos La carpeta con Las imagenes
2 dir=getDirectory("Choose a directory");
3
4 //Nos guardamos Las imagenes en una lista
5 list=getFileList(dir);
6
7 //Recorremos La lista con un bucle
8 for(i=0;i<list.length;i++){
9
10     //Solo se abriran Los archivos que sean una imagen tif
11     if(endsWith(list[i],"tif")){
12         open(dir+File.separator+list[i]);
13
14         //Segmentación de Las imágenes de Los núcleos
15         setAutoThreshold("Li dark");
16         setOption("BlackBackground", true);
17         run("Convert to Mask");
18     }}
19
20 //Se ordenan Las imagenes en La pantalla
21 run("Tile");
```

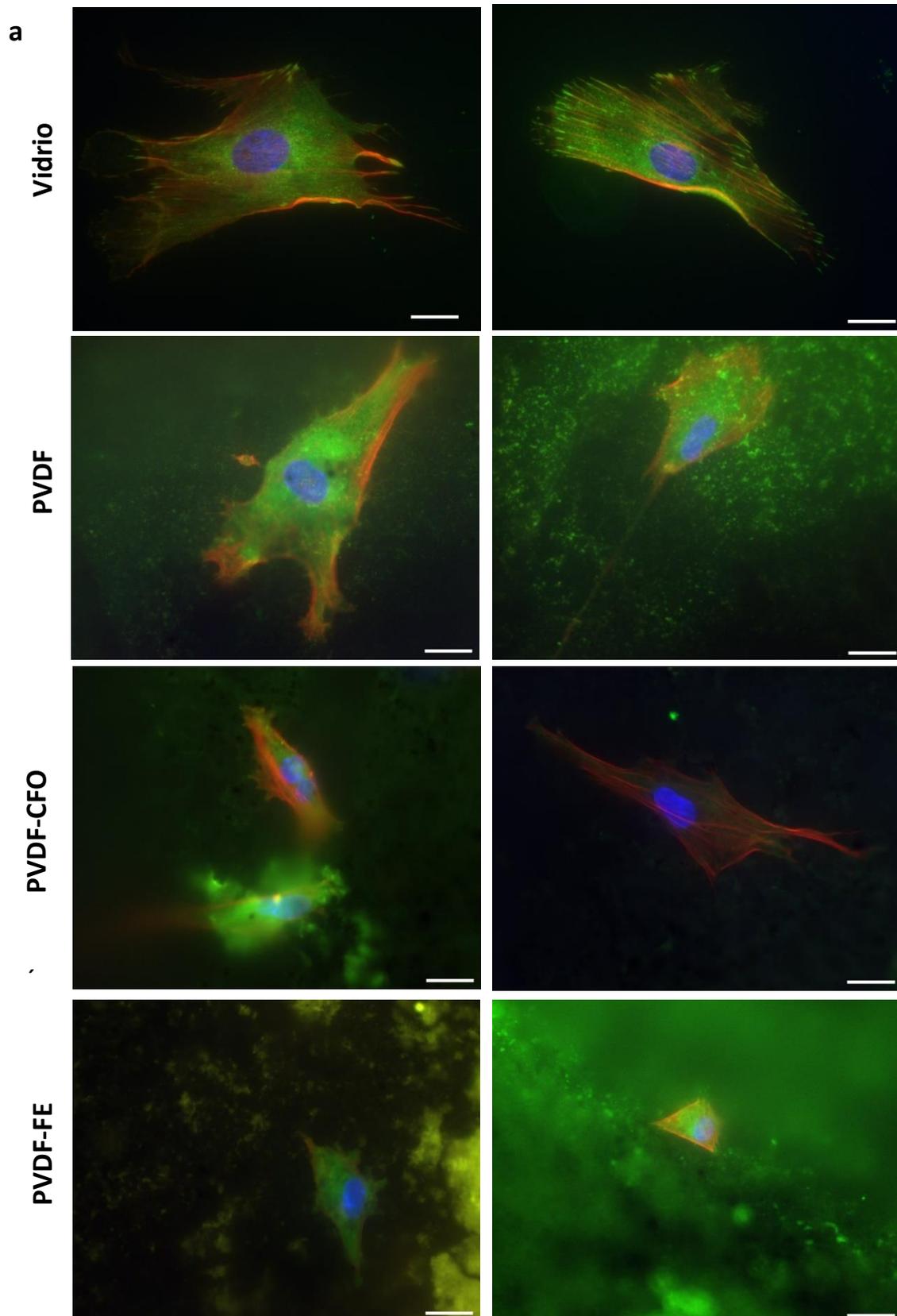
b

```
1 //Definimos Las medidas que vamos a tomar en Las celulas despues
2 run("Set Measurements...", "area shape display redirect=None decimal=3");
3
4 //Activamos La opcion fondo negro
5 run("Options...", "iterations=1 count=1 black do=Nothing");
6
7 //Abrimos La carpeta con Las imagenes
8 dir=getDirectory("Choose a directory");
9
10 //Guardamos Las imagenes en una lista
11 list=getFileList(dir);
12
13 //Recorremos La lista con un bucle
14 for(i=0;i<list.length;i++){
15
16     //Solo se abriran Los archivos que sean una imagen tif
17     if(endsWith(list[i],"tif")){
18         open(dir+File.separator+list[i]);
19
20         //Nos guardamos el nombre de La imagen en una variable
21         imageName=getTitle();
22     }
23     //Establecemos La escala de Las imagenes
24     run("Set Scale...", "distance=1 known=0.202 unit=um");
25
26     //Se miden Las celulas de cada imagen, filtrando el tamaño del area (Area>300um2)
27     //Se determinó el tamaño de filtrado midiendo previamente Las células más pequeñas
28     //Es el tamaño suficiente para eliminar el ruido inespecífico sin que se descarte ninguna de nuestras células
29     run("Analyze Particles...", "size=300-Infinity show=Masks display include include");
30 }
31
32 //Se ordenan Las imagenes en La pantalla
33 run("Tile");
34
35 //Guardamos La tabla de resultados de Las medidas en La carpeta con Las imagenes
36 saveAs("Results", dir+File.separator+"ResultsTable.csv");
```

Figura S3. Macros utilizadas para procesar automáticamente las imágenes de inmunofluorescencia. a) Macro desarrollado para segmentar las imágenes de los núcleos de las células. Se utilizó el autoumbrales "Li dark", comprobando previamente que era adecuado para todos los núcleos. b) Macro desarrollado para los parámetros morfológicos del citoplasma de las células, a partir de imágenes del citoesqueleto. El tamaño utilizado como filtro ($300 \mu\text{m}^2$) es el mismo para todas las células analizadas en vidrio, PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

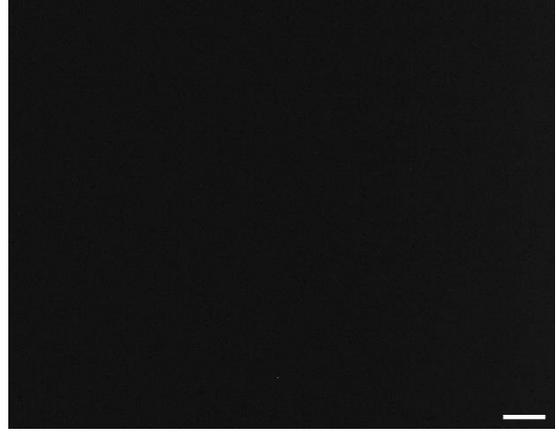
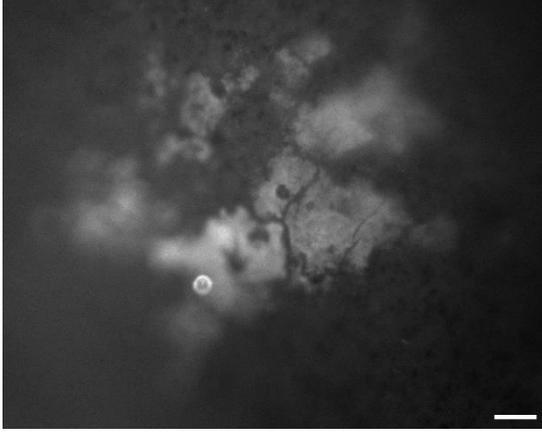
ANEXO V: IMÁGENES DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las imágenes en color se consiguieron mediante la fusión de la vinculina (verde), la actina (rojo) y el núcleo (azul).

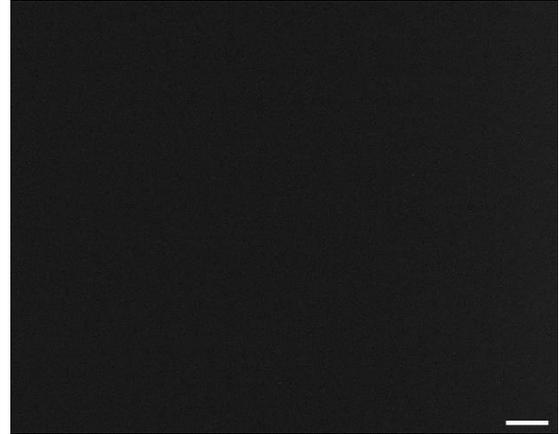


b

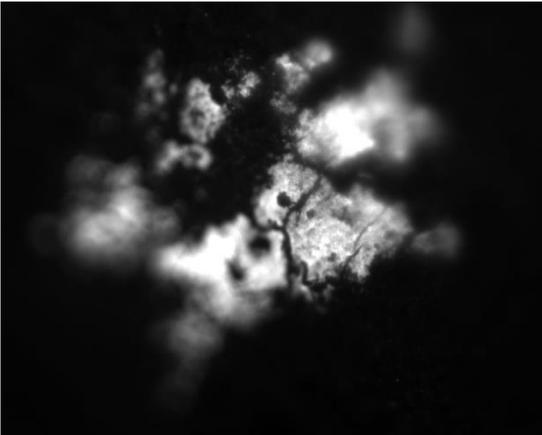
Canal de los núcleos



Canal de la actina



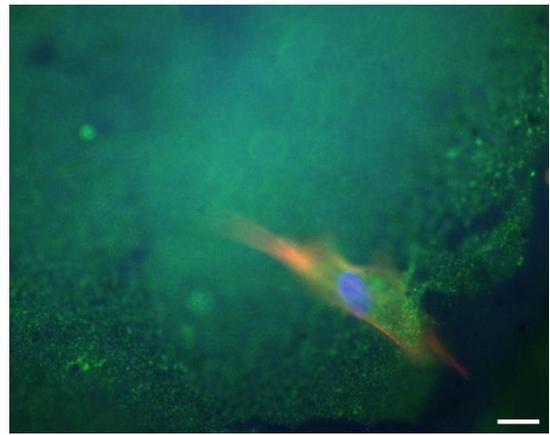
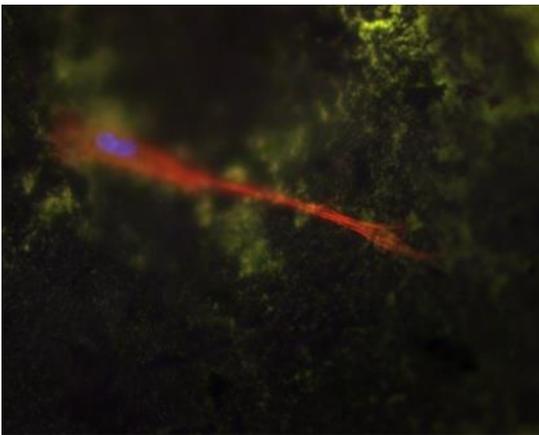
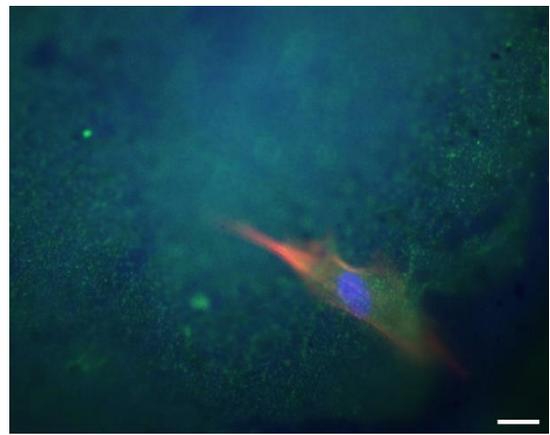
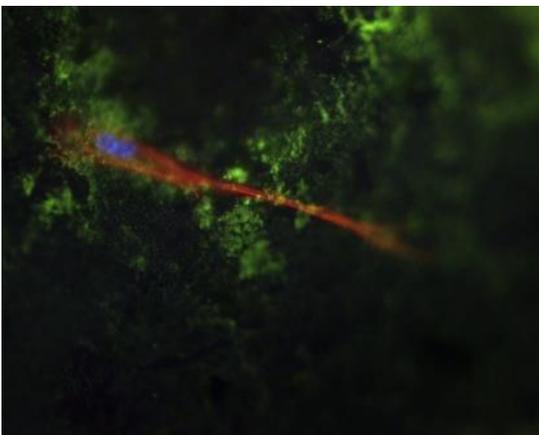
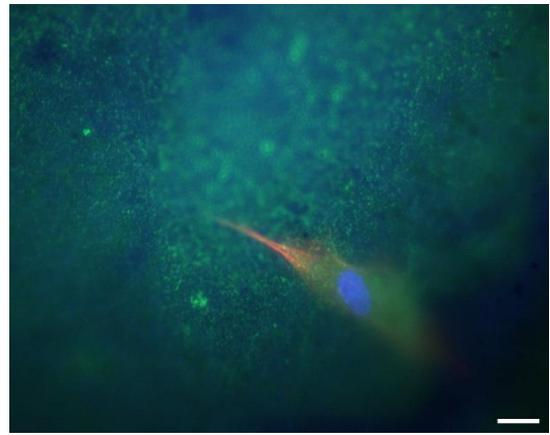
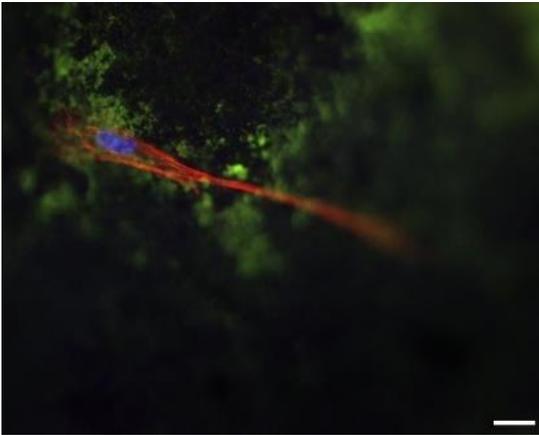
Canal de la vinculina



c

PVDF-CFO

PVDF-FE



d

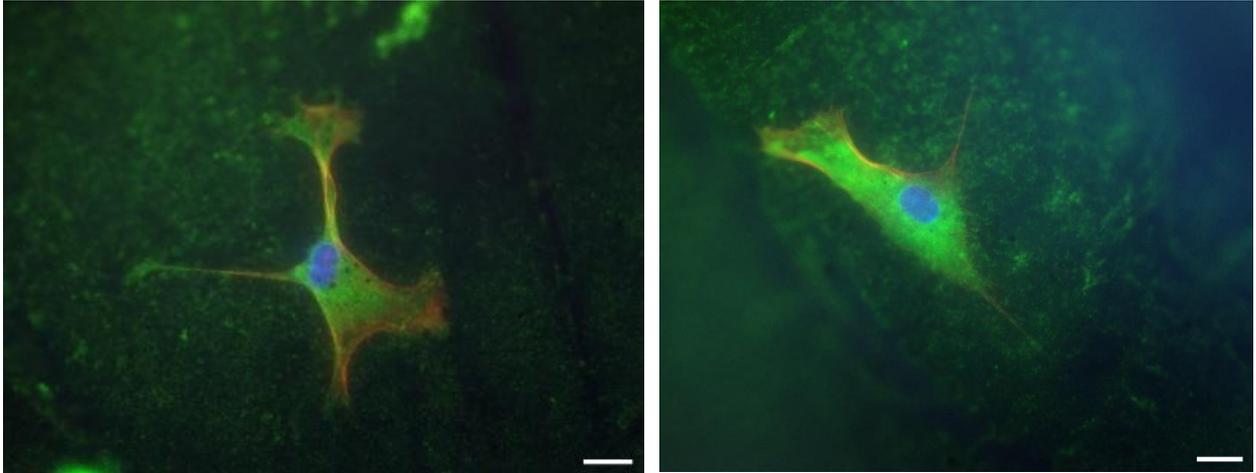


Figura S4. Imágenes de inmunofluorescencia de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) en vidrio, en membranas de polifluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE), procesadas mediante el programa de análisis de imagen FIJI. a) Células representativas de cada soporte: vidrio, PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE b) Izquierda: autofluorescencia de la membrana de PVDF-CFO, donde el color blanco corresponde a la sección no teñida y la sección negra corresponde a una zona teñida con Sudan Black; derecha: zona teñida completamente con Sudan Black c) Izquierda: tres planos diferentes de una misma célula sembrada en PVDF-CFO; derecha: tres planos diferentes de una misma célula sembrada en PVDF-FE. d) Ejemplificación de la adaptación de las células a la nanotopografía del soporte con dos células sembradas en PVDF. En todos los casos la barra de escala corresponde a 20 μ m.

En la figura S4a se puede ver claramente dónde se encuentran las adhesiones focales de la célula al vidrio, pero en los materiales no se distingue. Además, destaca la ausencia de señal inespecífica por autofluorescencia en los vidrios, mientras que, en el PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE es tan elevada que en ocasiones la célula no se ve bien.

La figura S4b muestra dos zonas distintas de una misma membrana de PVDF-CFO. Se observa la autofluorescencia en el canal del núcleo, la actina y la vinculina y cómo el Sudan Black cumple su función al cubrirla.

La figura S4c muestra la profundidad de las células en los soportes, los diferentes planos z en los que se enfoca una misma célula. Esto se debe a la topografía de la superficie de las membranas sobre la cual las células se anclan. La figura S4d es un claro ejemplo de cómo las células presentan formas atípicas para disponer sus puntos de anclaje y tratar de adaptarse a la superficie.

ANEXO VI: PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS ADICIONALES

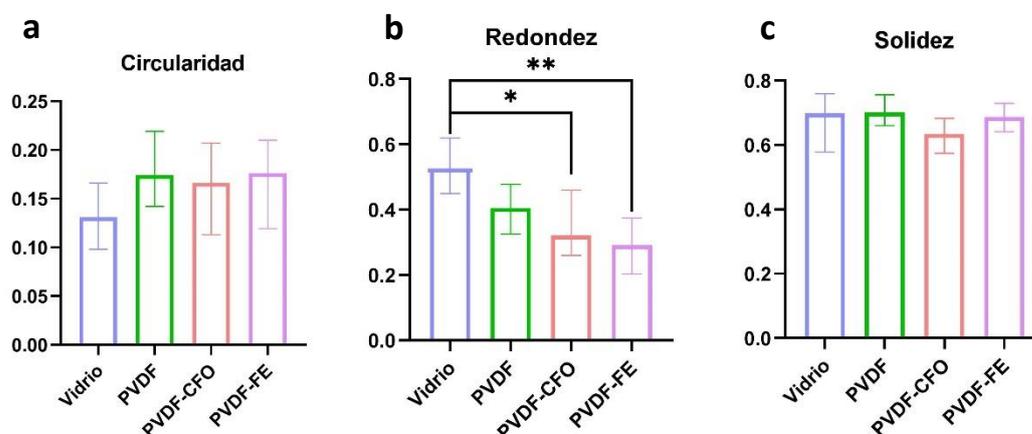


Figura S5. Histograma de la circularidad, redondez y solidez de la adhesión inicial a las 24 horas de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) en vidrio, en membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE). a) Circularidad de las hMSC. b) Redondez de las hMSC. c) Solidez. En el gráfico están representadas las medianas y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba de Kluskal-Wallis con corrección por Dunn, donde * está asociado a un p-valor < 0,05 y ** con un p-valor < 0,01. Se usaron al menos 25 células para realizar la estadística.

A continuación, se disponen las ecuaciones para el cálculo de las medidas de relación de aspecto, circularidad, redondez y solidez. La información de los parámetros se ha obtenido de la guía de usuario de ImageJ (imagej.nih.gov/ij/docs/guide/)

$$\text{Relación de aspecto} = \frac{\text{Eje mayor}}{\text{Eje menor}} \quad \text{Ec. 4}$$

$$\text{Circularidad} = 4\pi \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2} \quad \text{Ec. 6}$$

$$\text{Redondez} = 4 \frac{\text{Área}}{\pi \text{Eje mayor}^2} \quad \text{Ec. 5}$$

$$\text{Solidez} = \frac{\text{Área}}{\text{Área convexa}} \quad \text{Ec. 7}$$

Ec. 4. Relación de aspecto: informa sobre la elongación del objeto, teniendo en cuenta el eje mayor y el menor. A menor relación, más alargadas son las células ya que la diferencia de la medida de los ejes es mayor.

Ec. 5. Circularidad: a igualdad de áreas, el objeto menos circular tiene más perímetro, por lo que el valor será mayor.

Ec. 6. Redondez: disminuye si los objetos son alargados, de ahí que los valores sean mucho menores en las células sembradas en PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

Ec. 7. Solidez: evalúa si el objeto tiene hendiduras o prolongaciones; para adherirse a cualquier soporte las células las presentan, por eso no vemos diferencias significativas.

ANEXO VII: PLACAS P48 DEL ENSAYO MTS

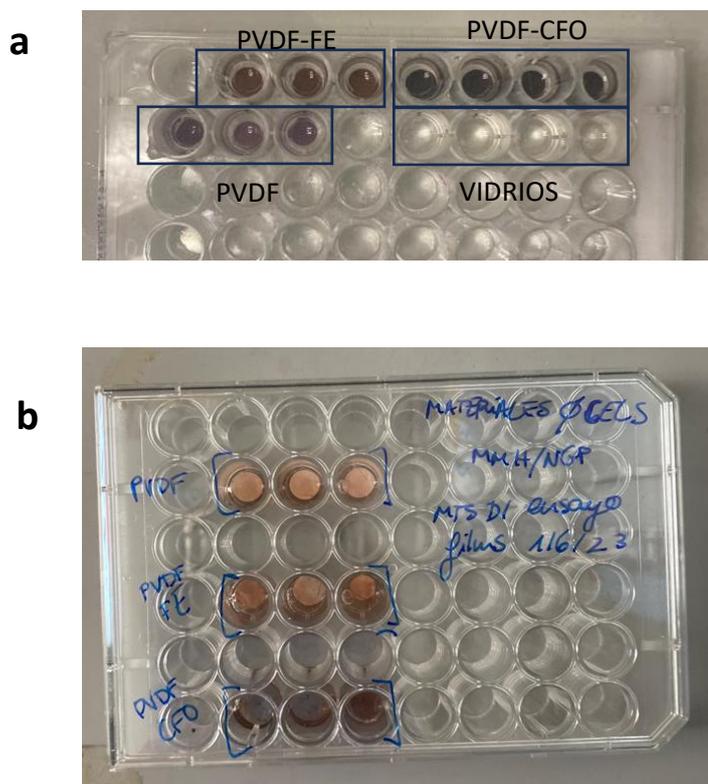


Figura S6. Placas utilizadas del ensayo MTS a día 1 con las membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO), de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE) y con los vidrios. a) Placa con 48 pocillos después del ensayo MTS a día 1 con PVDF, PVDF-CFO, PVDF-FE y vidrios sembrados con hMSC. Las membranas ya no tienen rojo fenol ni reactivo MTS y después del ensayo se guardaron en DPBS. b) Placa con 48 pocillos antes de retirar el medio sin rojo fenol para analizar su señal para el MTS a día 1 con PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE (indicados en la tapa de la placa) sin células cultivadas. Después del ensayo se guardaron en DPBS.

Tabla 4. Ensayo MTS a día 1 con la absorbancia media y la desviación típica de las membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO), de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE, de los vidrios y de las membranas sin células, utilizadas de blanco.

	blanco PVDF	blanco PVDF-CFO	blanco PVDF-FE	PVDF	PVDF-CFO	PVDF-FE	Vidrio
Absorbancia	0.222 ± 0.004	0.218 ± 0.006	0.231 ± 0.006	0.106 ± 0.005	0.102 ± 0.007	0.106 ± 0.002	0.341 ± 0.029

Las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE a simple vista son de color blanco, negro y marrón, respectivamente (Figura S6b) pero en la 6a se aprecia como las membranas de PVDF han absorbido el reactivo MTS hasta teñirse de rojo oscuro, parecido al marrón. En las de PVDF-FE y PVDF-CFO no se llega a apreciar porque su propio color es oscuro. La señal en estas membranas no fue igual a la de las membranas sin células y, por tanto, sí había células y el reactivo se ha quedado dentro de la membrana.

ANEXO VIII: ENSAYO TINCIÓN ALIZARINA ROJA

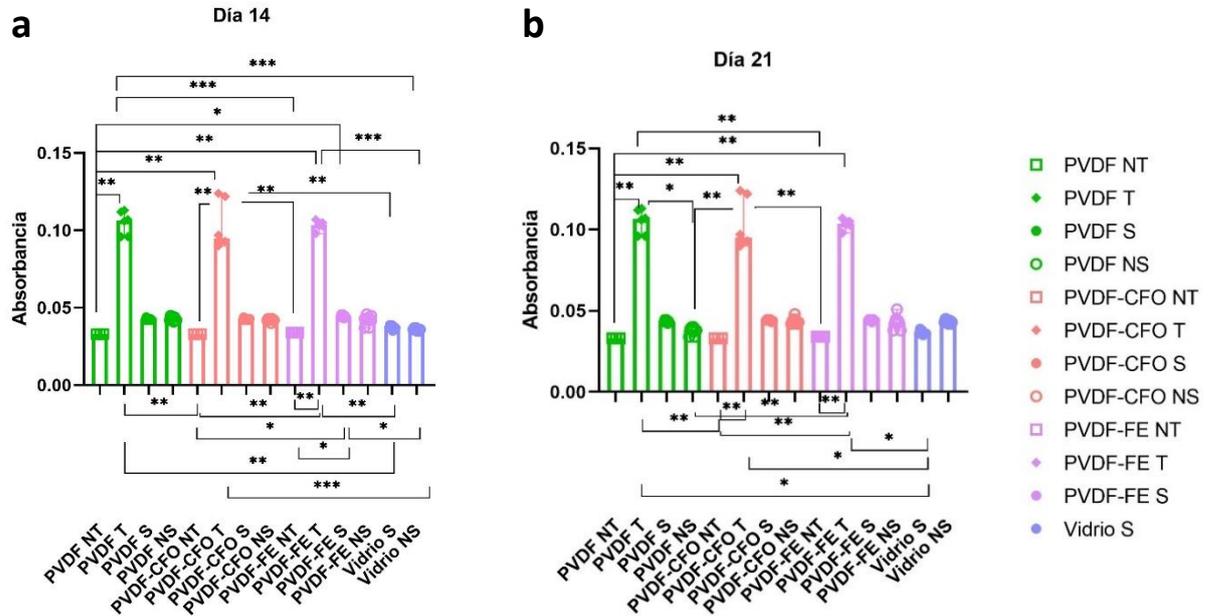


Figura S7. Histograma de la detección de la tinción rojo alizarina a días 14 y 21. Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) se cultivaron en vidrios, membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE). Las células se cultivaron en los soportes bajo estimulación magnética durante 272 horas (S) y sin estimulación magnética (NS). Se añadieron al ensayo membranas sin cultivar que se tiñeron (T) o no (NT). a) Tinción rojo alizarina a día 14. b) Tinción rojo alizarina a día 21. En el gráfico están representadas las medianas y las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba de Kluskal-Wallis con corrección por Dunn donde * está asociado a un p-valor < 0,05, ** a p-valor < 0,01 y * a p-valor < 0,001. Se usaron al menos 3 réplicas biológicas de cada soporte.**