

35605475:Desarrollo_de_memb ranas_electroactivas_para_la_e stimulación_de_células_madre_ mesenquimales_en_cultivo_Ma riaMarinJimenez.pdf

por María Marín Jiménez

Fecha de entrega: 13-jul-2023 08:15p.m. (UTC+0200)

Identificador de la entrega: 2130669719

Nombre del archivo: de_c_lulas_madre_mesenquimales_en_cultivo_MariaMarinJimenez.pdf (3.42M)

Total de palabras: 22387

Total de caracteres: 121749

1

Universitat Politècnica de València

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL (ETSIAMN)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DESARROLLO DE MEMBRANAS ELECTROACTIVAS
PARA LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES EN CULTIVO

1

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA (2019-2023)

TRABAJO FINAL DE GRADO

MARÍA MARÍN JIMÉNEZ

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

1

COTUTOR: LUIS AMARO MARTINS

Valencia, 14 de julio de 2023



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Desarrollo de membranas electroactivas para la estimulación de células madre mesenquimales en cultivo

El tejido óseo tiene la capacidad natural de regenerarse, pero en ocasiones, los defectos pueden superar un tamaño crítico y se vuelve inefectiva. En este sentido, la terapia con células madre mesenquimales (MSC) ha surgido como un enfoque prometedor, debido a que son accesibles y pluripotentes. Sin embargo, la transdiferenciación y dediferenciación de las MSC al ser expandidas *ex vivo* dificultan su aplicación terapéutica. Por esto, se ha propuesto preferir *in vitro* las MSC hacia el linaje osteogénico. El hueso es un tejido piezoeléctrico, por lo que genera respuestas eléctricas cuando se ejercen tensiones sobre él, lo cual es fundamental para la autorregeneración. En la ingeniería tisular se emplean materiales piezoeléctricos, que pueden generar estímulos eléctricos sobre las MSC, comprometiendo su linaje. Estos se combinan con nanopartículas magnetostrictivas para estimular magnetoeléctricamente las MSC con un campo magnético externo. Como la deformación de las nanopartículas con la estimulación es mucho menor que la deformación del material se propone que esta deformación se debe al movimiento de la nanopartícula a lo largo de la matriz debido al campo magnético dinámico.

Para probar esta hipótesis, se desarrollaron membranas de poli (fluoruro de vinilideno) con nanopartículas de ferrita de cobalto (PVDF-CFO) o magnetita de hierro (III) (PVDF-FE). Se sintetizaron mediante separación de fases no inducida por disolventes (NIPS) y se recubrieron con 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) y tetraetoxisilano (TEOS) para disminuir su hidrofobicidad y facilitar la posterior adsorción de colágeno I. La microestructura de las membranas se estudió mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y las fases electroactivas mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Además, se estudiaron las propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). El recubrimiento proteico se evaluó mediante métodos químicos. Se realizaron cultivos celulares con MSC humanas sobre membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE para estudiar la adhesión a las 24 horas mediante inmunofluorescencia, la proliferación mediante cuantificación del ADN total y la diferenciación osteogénica estimulada magnetoeléctricamente mediante la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización.

Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en las propiedades morfológicas, químicas y térmicas entre los soportes de PVDF-CFO y PVDF-FE. A las 24 horas de cultivo, las células presentaron una adhesión menor a las membranas que en los soportes control y una forma más alargada. En cuanto a la proliferación, las células se expandieron más rápidamente en las membranas de PVDF-FE, pero a día 4 la expansión se igualó. No se observaron diferencias en la actividad de la fosfatasa alcalina ni en la mineralización entre los materiales en los cultivos bajo estimulación electromagnética. Este trabajo se relaciona con el objetivo de salud y bienestar (ODS 3) y al de industria, innovación e infraestructuras (ODS 9) (anexo I).

Palabras clave: cultivo celular; estimulación; diferenciación osteogénica; membrana electroactiva

ALUMNA: MARÍA MARÍN JIMÉNEZ

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

COTUTOR: LUIS AMARO MARTINS

Valencia, 14 de Julio de 2023

Development of electroactive membranes for the stimulation of mesenchymal stem cells in culture.

Bone tissue has the natural ability to regenerate, but on occasion, defects can exceed a critical size and become ineffective. In this regard, mesenchymal stem cell (MSC) therapy has emerged as a promising approach, because they are accessible and pluripotent. However, transdifferentiation and dedifferentiation of MSCs when expanded ex vivo hinder their therapeutic application. Therefore, it has been proposed to predifferentiate MSCs in vitro towards the osteogenic lineage. Bone is a piezoelectric tissue, so it generates electrical responses when stresses are exerted on it, which is essential for self-regeneration. In tissue engineering, piezoelectric materials are used, which can generate electrical stimuli on MSCs, compromising their lineage. These are combined with magnetostrictive nanoparticles to magnetoelectrically stimulate MSCs with an external magnetic field. As the deformation of the nanoparticles with stimulation is much smaller than the deformation of the material it is proposed that this deformation is due to the movement of the nanoparticle along the matrix due to the dynamic magnetic field.

To test this hypothesis, poly (vinylidene fluoride) membranes with cobalt ferrite (PVDF-CFO) or iron(III) magnetite (PVDF-FE) nanoparticles were developed. They were synthesized by non-solvent-induced phase separation (NIPS) and coated with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and tetraethoxysilane (TEOS) to decrease their hydrophobicity and facilitate subsequent collagen I adsorption. The microstructure of the membranes was studied by field emission scanning electron microscopy (FESEM) and the electroactive phases by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In addition, thermal properties were studied by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA). Protein coating was evaluated by chemical methods. Cell cultures with human MSCs on PVDF, PVDF-CFO and PVDF-FE membranes were performed to study adhesion at 24 hours by immunofluorescence, proliferation by total DNA quantification and magnetoelectrically stimulated osteogenic differentiation by detection of alkaline phosphatase activity and mineralization.

The results showed that there were no significant differences in morphological, chemical and thermal properties between the PVDF-CFO and PVDF-FE supports. At 24 hours of culture, the cells showed a lower adhesion to the membranes than in the control supports and a more elongated shape. In terms of proliferation, cells expanded more rapidly on PVDF-FE membranes, but at day 4 the expansion was equalized. No differences in alkaline phosphatase activity or mineralization were observed between materials in cultures under electromagnetic stimulation. This work relates to the health and well-being goal (SDG 3) and to industry, innovation and infrastructure (SDG 9) (Annex I).

Key words: cell culture; stimulation; osteogenic differentiation; electroactive membrane

ALUMN: MARÍA MARÍN JIMÉNEZ

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

COTUTOR: LUIS AMARO MARTINS

Valencia, 14th of July 2023

Desenvolupament de membranes electroactives per a l'estimulació de cèl·lules mare mesenquimals en cultiu.

El teixit ossi té la capacitat natural de regenerar-se, però a vegades, els defectes poden superar una grandària crítica i es torna inefectiva. En aquest sentit, la teràpia amb cèl·lules mare mesenquimals (MSC) ha sorgit com un enfocament prometedori, pel fet que són accessibles i pluripotents. No obstant això, la transdiferenciació i dediferenciació de les MSC en ser expandides *ex vivo* dificulten la seua aplicació terapèutica. Per això, s'ha proposat prediferenciar *in vitro* les MSC cap al llinatge osteogènic. L'os és un teixit piezoelèctric, per la qual cosa genera respostes elèctriques quan s'exerceixen tensions sobre ell, que és fonamental per a l'autoregeneració. En l'enginyeria tissular s'empren materials piezoelèctrics, que poden generar estímuls elèctrics sobre les MSC, compromentent el seu llinatge. Aquests es combinen amb nanopartícules magnetostrictives per a estimular magnetoelèctricament les MSC amb un camp magnètic extern. Com la deformació de les nanopartícules amb l'estimulació és molt menor que la deformació del material es proposa que aquesta deformació es deu al moviment de la nanopartícula al llarg de la matriu a causa del camp magnètic dinàmic.

Per a provar aquesta hipòtesi, es van desenvolupar membranes de poli(fluorur de vinilidè) amb nanopartícules de ferrita de cobalt (PVDF-CFO) o magnetita de ferro (III) (PVDF-FE). Es van sintetitzar mitjançant separació de fases no induïda per dissolvents (NIPS) i es van recobrir amb 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) i tetraetoxisilano (TEOS) per a disminuir la seua hidrofobicitat i facilitar la posterior adsorció de col·lagen I. La microestructura de les membranes es va estudiar mitjançant microscòpia electrònica d'escombratge d'emissió de camp (FESEM) i les fases electroactives mitjançant espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier (FTIR). A més, es van estudiar les propietats tèrmiques mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC) i anàlisi termogravimètric (TGA). El recobriment proteic es va avaluar mitjançant mètodes químics. Es van realitzar cultius cel·lulars amb MSC humanes sobre membranes de PVDF, PVDF-CFO i PVDF-FE per a estudiar l'adhesió a les 24 hores mitjançant immunofluorescència, la proliferació mitjançant quantificació de l'ADN total i la diferenciació osteogènica estimulada magnetoelèctricament mitjançant la detecció de l'activitat de la fosfatasa alcalina i la mineralització.

Els resultats van mostrar que no va haver-hi diferències significatives en les propietats morfològiques, químiques i tèrmiques entre els suports de PVDF-CFO i PVDF-FE. A les 24 hores de cultiu, les cèl·lules van presentar una adhesió menor a les membranes que en els suports control i una forma més allargada. Quant a la proliferació, les cèl·lules es van expandir més ràpidament en les membranes de PVDF-FE, però a dia 4 l'expansió es va igualar. No s'observaren diferències en l'activitat de la fosfatasa alcalina ni en la mineralització entre els materials en els cultius sota estimulació electromagnètica. Aquest treball es relaciona amb l'objectiu de salut i benestar (ODS 3) i al d'indústria, innovació i infraestructures (ODS 9) (annex I).

Paraules claus: cultiu cel·lular; estimulació; diferenciació osteogènica; membrana electroactiva

ALUMNA: MARÍA MARÍN JIMÉNEZ

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

COTUTOR: LUIS AMARO MARTINS

València, 14 de juliol de 2023

AGRADECIMIENTOS

A José Luis, por confiar en mí para formar parte de este proyecto. Gracias por tu paciencia y calma frente a cualquier situación, sobre todo en las dificultades que han ido surgiendo por el camino. Gracias por dejarme aprender de ti.

A Luis, por estar a mi lado desde el principio, por guiarme y apoyarme en todo momento. Gracias por explicarme todo las veces que hiciera falta, sin perder nunca el buen humor y la positividad. Estoy muy agradecida de haber podido disfrutar de este proyecto contigo.

A Nadia, por su apoyo incondicional en el final de esta etapa, por implicarte en este trabajo y enseñarme tantas cosas. Gracias por todas las horas compartidas, que no han sido pocas, llenas de esfuerzo y paciencia, pero también de risas y motivación. Confío en que vas a llegar hasta donde te propongas.

Gracias a todos los compañeros del CBIT, por ayudarme en cualquier momento y por el buen ambiente que generáis. Especialmente agradecer a Ximo, Inma y Sandra, siempre dispuestos a ayudarme y aconsejarme a lo largo de este proyecto.

Gracias a mis amigas por acompañarme durante estos cuatro años, por ser un pilar fundamental y por alegrarme el día incluso en los peores momentos. No podría haber elegido mejores personas con las que compartir esta y todas las aventuras que nos quedan.

Por último, gracias a mi familia, en especial a mis padres, mis hermanas y mi abuela, por haber comprendido mis ausencias y por haberme apoyado incondicionalmente. Gracias por creer en mí en todo momento y enseñarme el valor del esfuerzo y la constancia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 TEJIDO ÓSEO	1
1.1.1 Células del tejido óseo	2
1.1.1.1 Osteoblastos.....	2
1.1.1.2 Osteocitos	2
1.1.1.3 Osteoclastos	2
1.1.2 Capacidad de regeneración del tejido óseo.....	3
1.2 TERAPIAS REGENERATIVAS DEL TEJIDO ÓSEO.....	4
1.2.1 Terapias basadas en células madre mesenquimales	5
1.3 PIEZOELECTRICIDAD	6
1.4 MATERIALES PIEZOELÉCTRICOS PARA CULTIVO CELULAR.....	7
1.4.1 Poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF)	8
1.5 COMPOSITES CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 MATERIALES	12
3.2 MÉTODO DE SÍNTESIS DE LOS SOPORTES BIOACTIVOS.....	12
3.2.1 Síntesis de membranas	12
3.2.2 Tratamiento de membranas con solución APTES/TEOS.....	13
3.2.3 Injerto de proteína	14
3.2.4 Tratamiento con glicina	14
3.2.5 Desinfección	14
3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES.....	14
3.3.1 Determinación del espesor	14
3.3.2 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo (FESEM).....	15
3.3.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	15
3.3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	16
3.3.5 Análisis termogravimétrico (TGA)	16
3.3.6 Detección y cuantificación de colágeno.....	17
3.4 ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR.....	17
3.4.1 Adhesión celular inicial	18
3.4.2 Proliferación celular	18
3.4.2.1 MTS	18

3.4.2.2 Cuantificación ADN total.....	19
3.4.3 Diferenciación osteogénica	19
3.4.3.1 Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)	19
3.4.3.2 Tinción rojo alizarina	20
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES DE PVDF, PVDF-CFO Y PVDF-FE.....	21
4.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LOS SOPORTES DE PVDF, PVDF-CFO Y PVDF-FE	26
4.3 CULTIVO CELULAR	27
4.3.1 Adhesión	27
4.3.2 Proliferación	30
4.3.3 Diferenciación osteogénica	31
5. CONCLUSIONES	33
6. BIBLIOGRAFÍA	34
7. ANEXOS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la estructura interna del hueso compacto y esponjoso

Figura 2. Proceso de formación de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos en el hueso

Figura 3. Fases de la regeneración espontánea del tejido óseo

Figura 4. Efecto piezoeléctrico directo y reverso

Figura 5. Conformación de cadena de las fases del PVDF

Figura 6. Imágenes de la superficie y sección transversal de membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE

Figura 7. Espectro de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE

Figura 8. Calorimetría diferencial de barrido del PVDF, PVDF-CFO, PVDF-FE

Figura 9. Análisis termogravimétricos de membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE

Figura 10. Imágenes FESEM de la sección transversal de membranas PVDF recubiertas con APTES/TEOS

Figura 11. Imágenes de inmunofluorescencia fusionadas de vinculina, actina y núcleo de una célula representativa en vidrio, PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE

Figura 12. Histograma del área y relación de aspecto de la adhesión inicial a las 24 horas de las hMSC en vidrio, PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE

Figura 13. Histograma del ensayo PicoGreen a día 2 y 4 en vidrios PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE

Figura 14. Histograma de la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)

Figura S1. Deconvolución de los espectros FTIR de membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE entre 1140 y 1300cm⁻¹.

Figura S2. Ejemplificación de la obtención de máscaras binarias de las células a partir del citoesqueleto de actina de una célula sembrada en PVDF-CFO y su limpieza para poder obtener después las medidas morfométricas.

Figura S3. Macros utilizadas para procesar automáticamente las imágenes de inmunofluorescencia.

Figura S4. Imágenes de inmunofluorescencia ¹ de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) en vidrio, en membranas de VDF, PVDF-CFO y PVDF-FE, procesadas mediante el programa de análisis de imagen FIJI.

² 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 y en membranas de VDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

Figura S6. Placas utilizadas del ensayo MTS a día 1 con las membranas VDF, PVDF-CFO y PVDF-FE y con los vidrios.

Figura S7. Histograma de la detección de la tinción rojo alizarina a días 14 y 21. Las células madre mesenquimales (MSC) se cultivaron en vidrios, membranas de VDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fracciones de las fases cristalinas y cristalinidad total de las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE

Tabla 2. Temperatura de fusión (T_m) y entalpía de fusión (ΔH_s) en el primer y segundo barrido de temperaturas del PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

¹ Tabla 3. Relación de los objetivos del desarrollo sostenible con el desarrollo de soportes bioactivos para la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales humanas

Tabla 4. Ensayo MTS a día 1 con la absorbancia media y desviación típica de las membranas de PVDF, PVDF-CFO, PVDF-FE y vidrios

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

MEC: matriz extracelular

MSC: células madre mesenquimales

PVDF: poli(fluoruro de vinilideno)

CFO: ferrita de cobalto

FE: magnetita de hierro (III)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

DMF: dimetilformamida

APTES: 3-aminopropiltrietoxisilano

TEOS: tetraetoxisilano

GA: glutaraldehído

DPBS: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

NEAA: aminoácidos no esenciales

FBS: suero fetal bovino

hMSC: células madre mesenquimales humanas

BSA: albúmina de suero bovino

² TS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

PVDF-FE: poli(fluoruro de vinilideno) con nanopartículas de magnetita de hierro (III)

PVDF-CFO: poli(fluoruro de vinilideno) con óxidos de ferrita de cobalto

NIPS: separación de fases inducida por un no-solvente

FESEM: microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

ATR: reflectancia total atenuada

¹ FEA: fracción de la fase electroactiva del PVDF

F_{α} : fracción de la fase alfa del PVDF

A_{840} : absorbancia del pico de 840 cm^{-1} característico de las fases beta y gamma

A_{763} : absorbancia del pico de 763 cm^{-1} característico de la fase alfa

K_{840} : coeficiente de absorción a 840 cm^{-1}

K_{763} : coeficiente de absorción a 763 cm^{-1}

F_{β} : fracción de la fase beta del PVDF

F_{γ} : fracción de la fase gamma del PVDF

A_{1275} : absorbancia del pico de 1275 cm^{-1} característico de la fase beta

A_{1234} : absorbancia del pico de 1234 cm^{-1} característico de la fase gamma

DSC: calorimetría diferencial de barrido

ΔH_s : entalpía de fusión del PVDF

T_m : temperatura de fusión del PVDF

X_c : fracción cristalina del PVDF

ΔH_{α} : entalpía de fusión de PVDF con estructuras 100% cristalinas en fase alfa

ΔH_{β} : entalpía de fusión de PVDF con estructuras 100% cristalinas en fase beta

ΔH_{γ} : entalpía de fusión de PVDF con estructuras 100% cristalinas en fase gamma

TGA: análisis termogravimétrico

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

FIJI: Fiji Is Just ImageJ

ALP: actividad de la fosfatasa alcalina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TEJIDO ÓSEO

El hueso es una estructura sólida que compone el esqueleto de los vertebrados y desempeñan un papel fundamental en el soporte estructural interno del cuerpo. El tejido óseo es un tejido conectivo vascularizado e innervado que protege los órganos internos, permite el movimiento y permite el almacenamiento de iones como el calcio o el fosfato (Brown et al., 2013; Lindahl et al., 2014). Según la organización y la estructura del hueso se puede distinguir entre hueso compacto y hueso trabecular (Lindahl et al., 2014).

El hueso cortical, también conocido como hueso compacto, presenta un aspecto denso y está formado por láminas o lamelas concéntricas alrededor de los vasos sanguíneos y nervios, formando unas columnas denominadas osteonas o sistemas de Havers (Figura 1) (Safadi et al., 2009). Además de las lamelas concéntricas, también se pueden encontrar lamelas intersticiales o circunferencial formando parte del hueso cortical (Figura 1). Este tipo de hueso constituye el 80% de la masa del tejido óseo, estando mineralizado en un 80-90% (Seeman, 2008). Debido a su alta densidad, el hueso cortical es duro y soporta las cargas mecánicas que se le aplican (Brown et al., 2013)

Por otro lado, el hueso trabecular o esponjoso tiene una estructura porosa, con aproximadamente el 80% de su volumen formado por espacios (Figura 1) (Seeman, 2008). En este caso, las láminas mineralizadas se disponen de forma longitudinal formando las trabéculas, por lo que tiene menor resistencia a la compresión en comparación con el hueso cortical; sin embargo, tiene una mayor superficie (Safadi et al., 2009).

Ambos tipos de hueso desempeñan funciones importantes en el organismo, aunque con características y propiedades mecánicas distintas debido a sus diferencias en la disposición estructural de las lamelas (Figura 1) (Seeman, 2008).

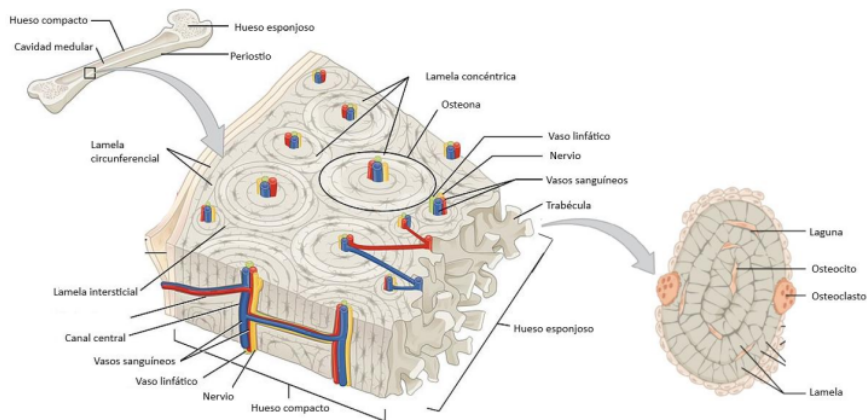


Figura 1. Estructura de la estructura interna del hueso compacto y esponjoso. Figura adaptada de Biga et al., (Biga et al., 2020)

El hueso presenta una matriz extracelular (MEC) compuesta por material orgánico, inorgánico y agua. El componente orgánico de la MEC constituye el 40% del peso seco y se caracteriza principalmente por presentar colágeno de tipo I y proteoglicanos. El componente inorgánico comprende el 60% restante del hueso y está compuesto principalmente de hidroxapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ en estructuras paralelas a las fibras de colágeno. También están presentes otras proteínas como la fibronectina, osteopontina, osteocalcina y osteonectina (Safadi et al., 2009).

1.1.1 Células del tejido óseo

Existen varios tipos celulares que participan en la formación y remodelación del tejido óseo: los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. Estos tienen distintos orígenes y funciones en los complejos procesos de regeneración ósea (Figura 2) (Tzelepi et al., 2009).

1.1.1.1 Osteoblastos

Los osteoblastos son células óseas cuboidales que se localizan cerca de los vasos sanguíneos y son las responsables de la osteogénesis y la mineralización. Se localizan recubriendo las superficies óseas en desarrollo y son capaces de responder a estímulos mecánicos para modular los cambios de tamaño y forma del hueso. Los osteoblastos se originan a partir de células madre mesenquimales (MSC) que, ante los estímulos adecuados, se comprometen con el linaje de los osteoblastos (Brown et al., 2013; Safadi et al., 2009).

Estas células son productoras de la MEC del tejido óseo. Cuando alcanzan una determinada fase de maduración, la matriz de los osteoblastos se calcifica y alrededor del 20% de ellos se transforman en osteocitos, quedando atrapados en pequeñas cavidades llamadas lagunas (Franz-Odenaal et al., 2006; Seeman, 2008).

1.1.1.2 Osteocitos

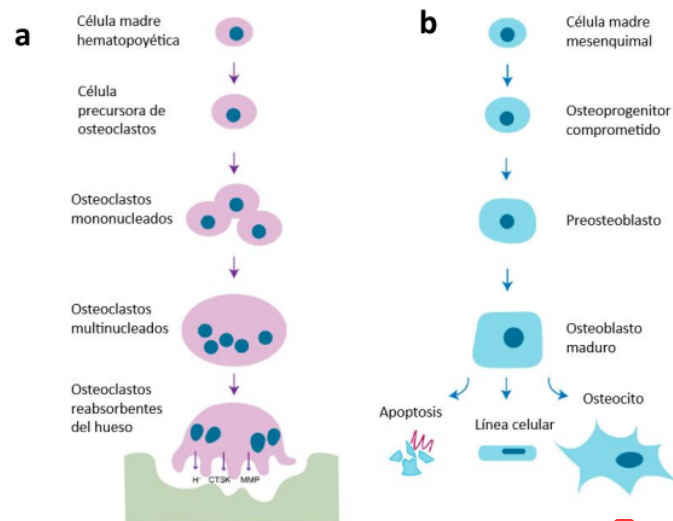
Se considera osteocito todo antiguo osteoblasto que madura y queda atrapado en la matriz ósea mineralizada (Schaffler et al., 2014). Derivan de MSC, son el tipo celular más común del hueso y constituyen alrededor del 90-95% de todas las células óseas (Franz-Odenaal et al., 2006; Safadi et al., 2009). Además, presentan numerosas proyecciones citoplasmáticas en forma de dendritas extendidas que les permiten percibir estímulos mecánicos y la comunicación entre células. También detectan cambios en la concentración de iones y activan el intercambio de estos entre la matriz ósea y el líquido extracelular (Tzelepi et al., 2009). Por tanto, mediante la estimulación mecánica, los osteocitos influyen en las MSC, osteoblastos y osteoclastos.

1.1.1.3 Osteoclastos

Por último, los osteoclastos son células multinucleadas que median en la remodelación de la matriz ósea reabsorbiendo hueso y, a diferencia de los osteoblastos y osteocitos, deriva de las células madre hematopoyéticas (Safadi et al., 2009). Los osteoclastos se encuentran en las lagunas de Howship, cavidades que surgen en los lugares donde se ha desarrollado su actividad catalítica. Inicialmente, la secreción de ácido clorhídrico por parte del osteoclasto disuelve la parte mineralizada de la matriz ósea para, posteriormente, degradar la porción proteica

mediante enzimas proteolíticas (Brown et al., 2013; Franz-Odenaal et al., 2006).

² La coordinación de la actividad de los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos es fundamental para mantener la integridad, la fuerza del esqueleto y garantizar la reparación de fracturas y la adaptación del esqueleto a los cambios del organismo (Tzelepi et al., 2009). Comprender la interacción entre estas células óseas permite desarrollar estrategias terapéuticas en enfermedades óseas.



¹ **Figura 2. Proceso de formación de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos en el hueso.** a) Diferenciación de las células madre hematopoyéticas y maduración de los osteoclastos. B) Diferenciación de las células madre mesenquimales y maduración de los osteoblastos. Estas células pueden ser destinadas a la apoptosis, a ser células de revestimiento óseo o a ser osteocitos. Figura adaptada de Kim et al. (J. Kim et al., 2020).

1.1.2 Capacidad de regeneración del tejido óseo

El hueso es un tejido dinámico con capacidad de regeneración espontánea siempre y que el tamaño del defecto no supere los 2 cm o el 50% de pérdida circunferencial del tejido, a partir del cual será considerado un defecto crítico. Sin embargo, este límite varía según la edad del paciente, su salud y la habilidad del médico con el tejido. Además, las pruebas disponibles y los tratamientos son escasos (Mauffrey et al., 2015; Nauth et al., 2011).

En condiciones normales, después de la lesión del tejido óseo se desencadena una cascada de regeneración de tejido de cuatro fases: inflamación, formación del callo blando, formación del callo duro y remodelación. Inmediatamente después del daño se forma un hematoma para contener la hemorragia; fibroblastos, plaquetas, macrófagos y otras células inflamatorias migran hasta el lugar de la lesión secretando citoquinas y factores de crecimiento. El reclutamiento de MSC del periostio y de la médula ósea, claves en la regeneración ósea *in vivo*, se promueve mediante estos factores secretados. En las siguientes fases, las fibras de colágeno y la porción orgánica mineralizada de la matriz ósea se combinan para formar un callo blando alrededor de la lesión, convirtiéndose después en fibrocartilago. A continuación, las MSC se diferencian en

osteoblastos en presencia de factores osteogénicos y van osificando el callo blando gradualmente hasta conseguir un callo duro que se reemplazará, con la ayuda de osteoclastos, por láminas muy organizadas de fibras de colágeno paralelas (Figura 3) (Einhorn y Gerstenfeld, 2015; Schindeler et al., 2008; Vernon et al., 2012)

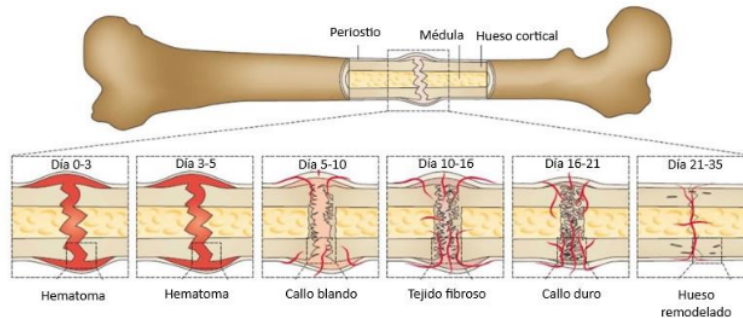


Figura 3. Fases de la regeneración espontánea del tejido óseo en una fractura de fémur de ratón. Figura adaptada de Gillman y Jayasuriya (Gillman y Jayasuriya, 2021)

1.2 TERAPIAS REGENERATIVAS DEL TEJIDO ÓSEO

Existen actualmente distintas terapias regenerativas para el tejido óseo, tanto para el fortalecimiento de los huesos como para el tratamiento de fracturas. Aunque este tejido posee una capacidad intrínseca de regeneración, en muchas ocasiones es necesaria la intervención humana. En aquellos casos en los que la fractura no supere el tamaño crítico, la regeneración ocurre espontáneamente; sin embargo, si la lesión es mayor, se debe intervenir quirúrgicamente (Mauffrey et al., 2015).

El tratamiento *por excelencia* en la regeneración ósea es el injerto de hueso autólogo. Este injerto consiste en la transposición de una sección de hueso de otra parte del cuerpo del propio paciente al sitio del defecto. Se considera que los injertos de hueso autólogos poseen propiedades osteoinductoras, osteoconductoras y osteogénicas, fundamentales para la regeneración tisular (Wang y Yeung, 2017).

La osteoinducción es la capacidad de las células pluripotentes de diferenciarse a células del tejido óseo a partir de un estímulo. Un material osteoinductivo favorece la migración de células con capacidad osteogénica y la vascularización, pero no es activo en cuanto a la diferenciación osteogénica de células pluripotentes. Por su parte, la osteointegración implica el crecimiento del hueso sobre una superficie, mientras que la osteogénesis hace referencia a la formación ósea *de novo* (Albrektsson y Johansson, 2001; Schmidt, 2021).

A pesar de que estos injertos autólogos son inmunocompatibles, económicos y aparentan tener una tasa de consolidación más alta en relación con otros injertos óseos, hay varios inconvenientes que han impulsado el estudio de alternativas, como son la morbilidad del sitio donante, la limitación de la fuente de suministro y el riesgo de hemorragias graves (Schmidt, 2021; Wang y Yeung, 2017).

Otras alternativas son los injertos de origen alogénico y xenogénico, en el que el tejido a insertar proviene de un donante humano diferente del paciente o de un animal, respectivamente. La ventaja principal es que se interviene al paciente solamente en una zona del cuerpo, pero tienen menos éxito debido a que pueden ser rechazados por el sistema inmune del paciente y son menos osteoinductivos y osteoconductivos (Gillman y Jayasuriya, 2021).

Las matrices porosas, más conocidas como *scaffolds*, y los sustitutos óseos sintéticos ya se están utilizando en clínica para la regeneración del tejido óseo. El colágeno y la matriz desmineralizada son los biomateriales más utilizados, mientras que la hidroxiapatita, el fosfato de calcio y el sulfato de calcio han cobrado relevancia como sustitutos sintéticos por ser una fuente ilimitada de injertos con una elevada vida útil (Valtanen et al., 2021). A pesar de carecer de osteoinducción y osteogénesis, se usan porque favorecen la migración, proliferación y diferenciación de las células óseas (Valtanen et al., 2021). Por otro lado, la ingeniería tisular pretende desarrollar soportes en los que se siembre las células progenitoras, como las MSC, para la formación y mantenimiento del hueso; pero conseguir una densidad de células lo suficientemente alta dificulta el avance de esta técnica (Dimitriou et al., 2011; Valtanen et al., 2021).

1.2.1 Terapias basadas en células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales son células madre adultas pluripotentes que proceden de muchas fuentes diferentes, como la médula ósea. Tienen capacidad de autorregenerarse y diferenciarse en tejido adiposo, óseo o cartilaginoso, entre otros, por lo que resultan muy interesantes como fuente celular en la regeneración ósea (Oryan et al., 2017).

Para que una célula pueda ser considerada MSC han de cumplir tres criterios: ser capaces de adherirse al plástico, expresar unos antígenos de superficie concretos y poder diferenciarse en osteoblastos, adipocitos o condroblastos. Una MSC debe expresar los antígenos CD105, CD73 y CD90 y presentar un fenotipo negativo para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19 y HLA-DR (Dominici et al., 2006; Oryan et al., 2017). Las MSC utilizadas pueden ser alogénicas o autólogas y se suelen obtener de la médula ósea, a pesar de poder extraerse también del cordón umbilical, tejido adiposo o de la placenta (Grayson et al., 2015; Oryan et al., 2017).

Cuando los defectos óseos son excesivamente grandes, es posible que los autoinjertos, los injertos alogénicos y los xenogénicos no se lleguen a unir adecuadamente y, por tanto, la regeneración ósea no es óptima (Oryan et al., 2017). Se ha demostrado que la regeneración a partir de células es más eficaz que estas técnicas en cuanto a la mineralización, osificación y angiogénesis (Bianco y Robey, 2001; Fisher et al., 2016; Oryan et al., 2017).

La terapia más sencilla y menos invasiva es la inyección de la fracción mononuclear de la médula ósea, que contiene MSC. Las células se obtienen mediante un aspirado de la médula continuando con su aislamiento y expansión *in vitro*; se espera que, una vez inyectadas, sean capaces de diferenciarse en osteoblastos y favorecer la regeneración del tejido óseo (Fernández-Vallone et al., 2013; Oryan et al., 2017).

La ingeniería tisular ha desarrollado otras técnicas para las situaciones en las que la inyección de las células no resulte efectiva. Las MSC se pueden combinar con matrices para distribuir las en la

zona del defecto. Estas pueden ser prefabricadas, de forma que se colocan las células antes de la implantación, o inyectables, con los que se facilita la migración *in vivo* de las MSC al defecto. Es importante tener en cuenta las propiedades de la superficie del biomaterial que se está utilizando, ya que influyen en la bioactividad y biocompatibilidad de las células (Liang et al., 2019; Oryan et al., 2017).

La manipulación *ex vivo* de las MSC supone importantes problemas en estas terapias. La transdiferenciación y la dediferenciación tras el trasplante, la sensibilidad de las MSC en entornos adversos o la baja supervivencia de las células son algunos de los inconvenientes que se aprecian en estas técnicas, dificultando su aprobación para terapias en la clínica (Fernández-Vallone et al., 2013; Grayson et al., 2015).

Mediante el cebado o el preconditionamiento celular se intenta imitar las condiciones de las MSC *in vivo* para facilitar la diferenciación específica y mejorar la eficacia terapéutica, disminuyendo los inconvenientes de la manipulación *ex vivo* de las MSC en terapias regenerativas (Noronha et al., 2019). Las estrategias de preconditionamiento que se están llevando a cabo consisten en citoquinas o mediadores, hipoxia, fármacos, biomateriales y otras moléculas como lipopolisacáridos (Noronha et al., 2019).

1.3 PIEZOELECTRICIDAD

La piezoelectricidad se define como el acoplamiento entre el comportamiento mecánico y eléctrico de un material (Wang, 2007). Como se muestra en la figura 4, una compresión o tensión mecánica, dependiendo de cómo se aplique la fuerza sobre el material, lo deforma de tal manera que se desplazan las cargas eléctricas. Consecuentemente, se altera el equilibrio entre ellas y se generan cargas eléctricas netas en las caras externas a lo largo de toda la estructura (Ribeiro et al., 2015). También puede ocurrir a la inversa, un material piezoeléctrico sometido a un voltaje se deforma (Figura 4) (Wang, 2007).

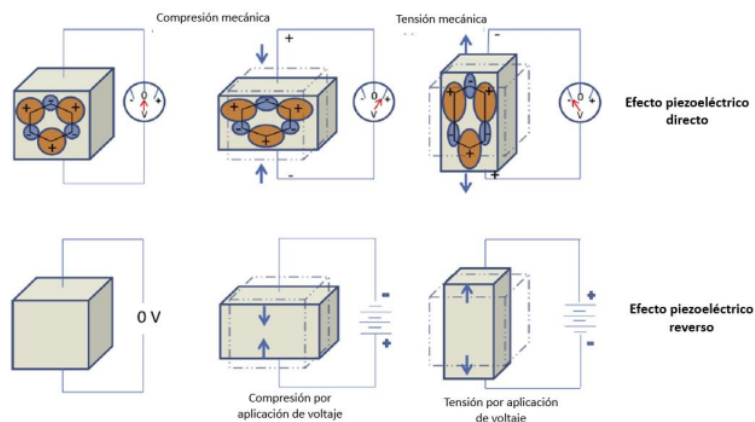


Figura 4. Efecto piezoeléctrico directo y reverso. Parte superior: una deformación mecánica del material deriva en una polarización eléctrica, generando electricidad. Parte inferior: el material es sometido a un voltaje y se deforma mecánicamente. Figura adaptada de Tandon et al. (Tandon et al., 2018).

La piezoelectricidad es un fenómeno extendido por diferentes tejidos del cuerpo humano, como la piel, los tendones o el cartilago, pero también existen proteínas y nucleótidos piezoeléctricos; incluso en la naturaleza se pueden encontrar materiales piezoeléctricos, como el cuarzo o la madera (D. Kim et al., 2020). Es una propiedad intrínseca muy importante de estos compuestos ya que los estímulos eléctricos que se generan desempeñan un papel fundamental interviniendo en la funcionalidad biológica y en la capacidad sensorial y adaptativa del organismo (D. Kim et al., 2020).

Yasuda fue el primero que describió la piezoelectricidad en el hueso y, posteriormente, se atribuyó a la presencia de las fibras de colágeno de la parte orgánica de la MEC (Fukada y Yasuda, 1957). Las hélices de colágeno que componen la matriz del hueso tienen muchas unidades de -CO- y -NH- que se encuentran en el enlace amida de los aminoácidos y, carecen de un centro de simetría, característica que presentan todos los cristales piezoeléctricos (D. Kim et al., 2020). Al someter al hueso a una tensión mecánica, los grupos polares se reorientan, el colágeno de las fibras se polariza y cuando se deslizan las fibras entre sí, se genera un potencial eléctrico (Fukada y Yasuda, 1957; Oladapo et al., 2023; Zhou et al., 2016).

La piezoelectricidad del hueso es fundamental para el crecimiento y reparación del tejido óseo, ya que gracias a esta propiedad los huesos pueden adaptarse a la tensión mecánica y a las fuerzas que se ejercen sobre ellos. El estímulo eléctrico que se genera a partir de las fibras de colágeno se transmite a los osteoblastos y estimula su proliferación y diferenciación. Estos potenciales bioeléctricos son claves en la regulación del crecimiento, la cicatrización y la regeneración ósea ya que afectan a muchos procesos celulares e influyen en la diferenciación de las MSC (Oladapo et al., 2023; Rajabi et al., 2015).

Debido a la importancia de los estímulos eléctricos en muchos tejidos del organismo, la estimulación eléctrica suele utilizarse en la medicina regenerativa e ingeniería tisular (Maidhof et al., 2012; Ravikumar et al., 2017). En un intento de mimetizar la capacidad regenerativa nativa del tejido óseo, han surgido distintas estrategias de estimulación eléctrica *in vitro* en tejidos humanos, entre las que destacan la estimulación eléctrica por acoplamiento directo, capacitivo o inductivo y la estimulación eléctrica mediada por un soporte de conductor o piezoeléctrico (Guillot-Ferriols, Lanceros-Méndez et al., 2022). Todas ellas permiten generar un entorno eléctrico sobre el cultivo celular semejante al que presentan las MSC durante la regeneración, lo cual constituye un importante avance en las terapias regenerativas del tejido óseo (Guillot-Ferriols, Lanceros-Méndez et al., 2022).

1.4 MATERIALES PIEZOELÉCTRICOS PARA CULTIVO CELULAR

Los materiales piezoeléctricos han surgido como un posible enfoque para la regeneración de tejidos debido a su capacidad de generar un potencial eléctrico. Las propiedades físicas, como la morfología o topología, y mecánicas de cada material son fundamentales para garantizar la migración celular y optimizar el comportamiento piezoeléctrico (Tandon et al., 2018).

A diferencia de otros soportes de cultivo celular, los materiales piezoeléctricos pueden modular la adhesión y el comportamiento celular mediante las cargas superficiales generadas a partir de la deformación. Estos materiales se pueden manipular fácilmente para que adopten la forma

deseada e incluso existen algunos biodegradables (Samadi et al., 2022). Además, como se ha mencionado anteriormente, existen dispositivos de estimulación externa que permiten controlar las señales eléctricas sobre las células que se cultiven en ellos (Tandon et al., 2018).

Tanto el diseño como la morfología y la porosidad son parámetros que se han de tener en cuenta al elegir qué material bioactivo se va a utilizar y cómo se pretende sintetizar y funcionalizar. Se han realizado soportes con estructura de microesfera, fibras, membranas porosas o incluso hidrogeles (Ribeiro et al., 2015). En estos casos, los soportes se suelen fabricar por separación de fases, electrohilado, impresión 3D o microfluídica, entre otros (Samadi et al., 2022).

Los materiales piezoeléctricos más utilizados en la regeneración tisular pueden dividirse en dos grandes sectores: las piezocerámicas y los piezopolímeros. El fosfato tricálcico, el nitrato de boro y el óxido de zinc son algunos materiales que pertenecen al primer grupo, mientras que el polihidroxibutirato, el poli-L-ácido láctico y el poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) pertenecen al segundo (Samadi et al., 2022). Los piezopolímeros se han utilizado sobre todo para el transporte y liberación de fármacos o para la regeneración de tejidos que presenten estímulos eléctricos de forma natural, como el tejido óseo, cartilaginoso, nervioso, cardiovascular o muscular (Wei y Dai, 2021).

1.4.1 Poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF)

El PVDF es un fluoro polímero no biodegradable semicristalino de estructura química $(-C_2H_2F_2-)_n$ que destaca por su comportamiento inerte y su resistencia térmica y química. Además, presenta un alto coeficiente piezoeléctrico que puede alcanzar valores de hasta -34 pC N^{-1} (Gomes et al., 2010).

Gracias a su flexibilidad y no toxicidad, el PVDF se ha empleado en diversas aplicaciones biomédicas como sensores, membranas o matrices inteligentes, entre otros (Ribeiro et al., 2018). Se han llevado a cabo estudios con este piezopolímero para el crecimiento neuronal *in vitro*, la cicatrización de heridas *in vitro* y *in vivo* y la formación ósea *in vitro*, entre otros (Rajabi et al., 2015). También ha sido ampliamente estudiado como sustrato para el cultivo de MSC, comprometiéndolas con el linaje osteogénico mediante la estimulación eléctrica mediada por sustrato (Guillot-Ferriols, Lanceros-Méndez et al., 2022).

Puede presentar cinco fases cristalinas diferentes (α , β , γ , δ y ϵ), siendo las más frecuentes α , β y γ ; estas dos últimas constituyen la fase electroactiva del PVDF (Ribeiro et al., 2018). Las fases α y δ están relacionadas con la estructura TGTG' (alternante trans-gauche), mientras que la fase β presenta una conformación de cadena TTT (todo trans en zigzag), y la estructura T3GT3G' (alternante (triple trans)-gauche) es característica de las fases γ y ϵ (Figura 5) (Ribeiro et al., 2018; Tandon et al., 2018).

En estas conformaciones de las cadenas, los dipolos se disponen paralelos entre sí y perpendiculares a la cadena polimérica (Tandon et al., 2018). La fase β electroactiva es la más interesante de estudiar, ya que presenta mayor polarización espontánea por celda unitaria, al igual que mayor constante dieléctrica y coeficiente piezoeléctrico. La diferencia de electronegatividad entre los átomos de flúor e hidrógeno de la estructura crean un momento

dipolar neto, confiriéndoles dichas propiedades electroactivas (Guillot-Ferriols et al., 2021).

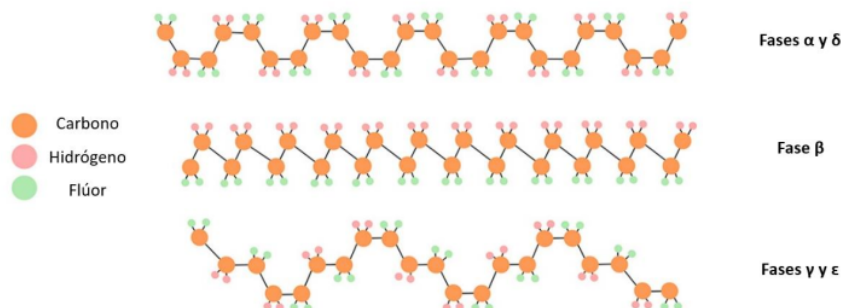


Figura 5. Conformación de cadena de las fases del PVDF. Conformaciones de las fases α , β , γ , δ y ϵ del PVDF, mostrando el carbono, el hidrógeno y el flúor que las constituyen. Figura adaptada de Guillot-Ferriols, Lanceros-Méndez et al., (Guillot-Ferriols, Lanceros-Méndez et al., 2022)

1.5 COMPOSITES CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

La magnetostricción es la capacidad que posee un material magnético para deformarse en presencia de un campo magnético; esta variación es proporcional a la intensidad del campo aplicado (P. Martins et al., 2015; P. Martins y Lanceros-Méndez, 2013). Normalmente, los materiales que poseen esta propiedad se suelen utilizar como sensores, actuadores, entre otros (P. Martins et al., 2015).

Un soporte magnetoeléctrico es aquel que tiene partículas magnetostrictivas embebidas en un material piezoeléctrico (Guillot-Ferriols et al., 2020). Las propiedades de ambos componentes se acoplan y permiten que la aplicación de un campo magnético induzca un cambio en la polarización eléctrica del material. A este fenómeno se le denomina efecto magnetoeléctrico (Guillot-Ferriols et al., 2020; P. Martins y Lanceros-Méndez, 2013).

Para promover la expansión y diferenciación de MSC en soportes magnetoeléctricos es interesante la estimulación magnetoeléctrica. Mediante esta técnica, el campo magnético induce la deformación del soporte, generando a su vez una señal eléctrica que se transmite a las células sembradas en ellos que favorece la proliferación y la diferenciación osteogénica (Guillot-Ferriols, Lanceros-Méndez et al., 2022). Sin embargo, en la práctica hay incertidumbre sobre la eficiencia de la estimulación magnetoeléctrica ya que no hay un protocolo común aceptado ni homogeneidad en cuanto los parámetros de estimulación (Guillot-Ferriols, Lanceros-Méndez et al., 2022).

La ferrita de cobalto, CoFe_2O_4 (CFO), es una nanopartícula magnetostrictiva con alta estabilidad química y de fácil procesamiento (P. Martins y Lanceros-Méndez, 2013). Además, favorece la cristalización del polímero en el que está embebido en su fase β electroactiva. Los compuestos basados en PVDF-CFO han sido muy estudiados para la diferenciación osteogénica en diferentes morfologías (Fernandes et al., 2019; García-Briega et al., 2022; Gonçalves et al., 2015; Guillot-Ferriols et al., 2020).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, las nanopartículas de CFO son muy estudiadas para la inoculación de fármacos, imágenes por resonancia magnética o la síntesis de plataformas de cultivo celular electroactivas (Ahmad y Zhou, 2017; Guillot-Ferriols et al., 2021; Jauhar et al., 2016). No obstante, existe una falta de estudios adecuados sobre la carcinogenicidad y genotoxicidad *in vivo*; la mayoría realizados *in vitro* indican que estas nanopartículas pueden inducir estrés oxidativo, apoptosis o alteraciones endocrinas (Ahmad y Zhou, 2017; Magaye et al., 2012).

La magnetita de hierro (III), Fe_3O_4 (FE), por otra parte, es una nanopartícula magnética aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *U. S. Food and Drug Administration*) y que ha sido muy estudiada en la administración de fármacos para tratamientos de cáncer (Bobo et al., 2016; S. Li et al., 2020; Y. Wei et al., 2011). Además, hay estudios que demuestran que la adición de esta nanopartícula a membranas o matrices poliméricas favorece la diferenciación de las células óseas y, consecuentemente, la reparación del tejido óseo (Meng et al., 2010; Xia et al., 2018).

La deformación del polímero, en teoría, viene dada por la magnetostricción de las nanopartículas que están embebidas en su interior; sin embargo, el cambio en la forma y tamaño de estas debido al campo magnético es muy pequeño en comparación con la matriz polimérica. Así pues, se plantea la duda de si la deformación del soporte se debe al cambio de forma de la nanopartícula o es debida al magnetismo de la partícula que, al estimular magnéticamente, se mueve con más magnitud dentro del material.

En este contexto, sería interesante evaluar las diferencias sobre la diferenciación osteogénica de soportes bioactivos de PVDF que contengan nanopartículas magnetostrictivas o únicamente magnéticas; estudiando simultáneamente la estimulación magnética y su efecto sobre la matriz polimérica.

2. OBJETIVOS

Las terapias de regeneración del tejido óseo mediante el uso de células madre mesenquimales humanas (hMSC) son una opción efectiva para abordar los defectos del hueso debido a la capacidad de autorrenovación y diferenciación a osteoblastos. Sin embargo, los resultados obtenidos de la aplicación clínica en este enfoque han sido escasos, principalmente debido a la variabilidad en la diferenciación *in vitro* de las hMSC.

El hueso posee propiedades piezoeléctricas, atribuidas a la presencia de fibras de colágeno piezoeléctrico en su matriz extracelular. La compresión que sufren los huesos por la actividad humana genera señales eléctricas fundamentales para las hMSC, las cuales tienen un papel clave en el crecimiento, diferenciación y regeneración ósea. En la ingeniería tisular se emplean materiales piezoeléctricos combinados con nanopartículas magnetostrictiva que reproducen la acción mecánica de la actividad física. Estos materiales favorecen tanto la expansión y diferenciación *in vitro* de hMSC, como la reparación de defectos óseos *in vivo* al ser implantados en el organismo.

En este trabajo tenemos dos objetivos principales. El primero es el desarrollo de un soporte de cultivo inteligente en 2D, capaz de generar un campo eléctrico en respuesta a la aplicación externa de un campo magnético que permita la estimulación y diferenciación osteogénica *in vitro* de las CMMh. Los soportes estarán fabricados con un polímero piezoeléctrico, el poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), que contiene en su interior nanopartículas de óxido de hierro (III) y de ferrita de cobalto. Además, también se pretende evaluar el impacto de la naturaleza de la nanopartícula en la estimulación magnetoeléctrica para la diferenciación osteogénica. Para alcanzar estos objetivos, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE por método de separación de fases inducida por no-solventes (NIPS).
2. Caracterizar las propiedades morfológicas, químicas y térmicas de las membranas.
3. Funcionalizar las membranas con recubrimientos de colágeno para reducir su hidrofobicidad y favorecer la adhesión celular.
4. Realizar un ensayo de cultivo estimulada de hMSC en un biorreactor magnetoeléctrico.
5. Evaluar el impacto de la naturaleza de las nanopartículas en la adhesión, proliferación y diferenciación de hMSC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Para la síntesis de los soportes se utilizó PVDF (Solef® 6010 PVDF Homopolymer; Solvay, España), dimetilformamida (DMF; grado de síntesis, Scharlab, España), óxido de ferrita de cobalto de 35-55 nm diámetro (NanoAmor, EE. UU.), magnetita de hierro de 10 nm de diámetro (Ferrotec, EE. UU.), ácido cítrico anhidro (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y etanol absoluto (Scharlab, España).

El 3-aminopropiltietoxisilano (APTES) y tetraetoxisilano (TEOS) utilizados en el recubrimiento de las membranas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (EE. UU.), mientras que el ácido clorhídrico (HCl) de Scharlab (España). Para el injerto de proteínas y su posterior tratamiento se obtuvieron el glutaraldehído (GA) y la glicina de Sigma-Aldrich (EE. UU.); el colágeno tipo I de Cellsystems (Alemania).

La solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), el piruvato sódico y la fibronectina humana fueron suministrados por Sigma-Aldrich (EE. UU.). El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (4,5 g/L) sin L-glutamina, la L-glutamina y los aminoácidos no esenciales (NEAA) fueron adquiridos de Capricorn Scientific (Alemania), Lonza (Suiza) y Biowest (Francia), respectivamente. La penicilina, la estreptomycin, la fungizona y el suero fetal bovino (FBS) provenían de Thermo Fisher Scientific (EE. UU.). De PromoCell (Alemania) se adquirieron células madre mesenquimales humanas (hMSC) y el medio 2 comercial de crecimiento de células madre mesenquimales humanas.

De los materiales utilizados para el ensayo de adhesión celular se adquirieron el paraformaldehído y la azida sódica de Panreac (España), el DPBS sin calcio ni magnesio de Corning (EE. UU.) y tanto el cloruro sódico como el cloruro magnésico hexahidrato de Scharlab (España). De Sigma-Aldrich (EE. UU.) se adquirieron la sacarosa, el HEPES, el Tritón X-100, la albúmina de suero bovino (BSA), el Tween-20, el Sudan Black B y el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vinculina (V9131). El anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Fluor™ 555 (A21424) y la faloidina Alexa Fluor™ 488 (A12379) fueron suministrados por Invitrogen (EE. UU.), mientras que el Vectashield, un medio de montaje con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se obtuvo de Vector Laboratories (EE. UU.).

Para los ensayos de proliferación, el medio basal sin rojo fenol con el reactivo MTS y el kit Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (EE. UU.) e Invitrogen (EE. UU.), respectivamente. La dexametasona, el ácido ascórbico y el β -glicerofosfato, utilizados en el medio de diferenciación osteogénica los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (EE. UU.). Por último, el kit colorimétrico SensoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay y la tinción de rojo alizarina fueron suministrados por Anaspec (EE. UU.) y Sigma-Aldrich (EE. UU.), respectivamente, mientras que el ácido acético (panreac) y el metanol por Panreac (España).

3.2 MÉTODO DE SÍNTESIS DE LOS SOPORTES BIOACTIVOS

3.2.1 Síntesis de membranas

Se prepararon diferentes membranas de PVDF con nanopartículas de magnetita de hierro (III) (PVDF-FE), con ferritas de cobalto (PVDF-CFO), así como membranas sin nanopartículas (PVDF). Se sintetizaron mediante una separación de fases inducida por un no-solvente (NIPS, del inglés *Non Solvent Induced Phase Separation*), técnica que consiste en la precipitación del polímero sobre una superficie por inmersión en un baño con un no-solvente. Se siguió para todas las

membranas los protocolos de Guillot-Ferriols ¹ *et al.*, (Guillot-Ferriols *et al.*, 2020; Guillot-Ferriols *et al.*, 2021)

Se prepararon soluciones al 20% (p/v) de PVDF en el disolvente dimetilformamida (DMF) bajo agitación a 60 °C. Para las membranas de PVDF-FE y PVDF-CFO se utilizaron nanopartículas de ferrita de cobalto o magnetita de hierro a una concentración del 10% (p/v).

Se añadió la misma cantidad de nanopartículas y de ácido cítrico, a lo que se agregó el volumen correspondiente de DMF y se dispersó durante 4 horas en un baño de ultrasonidos para facilitar la dispersión de las nanopartículas. Pasado este tiempo, se añadió el PVDF y se mantuvo la disolución a 60 °C en agitación mecánica con palas de teflón hasta la completa disolución del polímero.

Una vez disuelto el polímero, se dejaron reposar las soluciones 30 minutos para eliminar las burbujas de aire, se esparcieron sobre una placa de vidrio con un aplicador de película cuadrangular de 750 µm (Neurtek, España) y se sumergieron durante 30 minutos en un baño de etanol absoluto a 25 °C.

Una vez solidificadas, las membranas fueron separadas de los cristales y se llevaron a un baño de agua ultrapura durante 24 horas bajo agitación, para eliminar el exceso de etanol y los restos de DMF gracias a la afinidad del agua por el disolvente. Una vez lavadas, las membranas se congelaron a -80 °C y luego se liofilizaron durante 24 horas.

Se sintetizaron también membranas solamente de PVDF para comparar los resultados obtenidos y comprobar así el efecto de la ferrita de cobalto y la magnetita de hierro sobre las células. El procedimiento de síntesis fue similar al de las membranas con nanopartículas, a excepción de que la solución solo constaba del disolvente y el polímero.

3.2.2 Tratamiento de membranas con solución APTES/TEOS

Debido a su alta porosidad, las membranas se trataron con los precursores de sílice 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) y tetraethoxisilano (TEOS) mediante una reacción *sol-gel*, adaptando el protocolo de Demirdögen, *et al.* (Demirdögen *et al.*, 2014). Este proceso permite rellenar los poros de la membrana y recubrir su superficie, facilitando la unión de proteínas para el cultivo celular.

Se utilizaron TEOS y APTES como precursores, agua y etanol como disolventes y HCl 10% (p/p) como catalizador de la reacción. La relación molar de la solución TEOS/APTES: agua: etanol absoluto: HCl fue 1:2:1:0.0185, teniendo en cuenta que de los precursores 0.2 M fue de APTES y 0.8 M de TEOS.

La solución fue agitada magnéticamente durante 1 hora y, posteriormente, se introdujeron las membranas en la solución. Para asegurar que los poros de los polímeros fuesen rellenados, se colocaron los recipientes con las membranas sumergidas en las disoluciones en una cámara de vacío durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se mantuvieron las membranas durante 14 horas a temperatura ambiente y se finalizó calentando las membranas durante 12h a 40 °C.

Con el objetivo de optimizar el recubrimiento de las membranas y asegurar el efecto piezoeléctrico del PVDF sobre las células en cultivo, se prepararon disoluciones de APTES/TEOS 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 M.

3.2.3 Injerto de proteína

La superficie de las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE se funcionalizó con colágeno tipo I para facilitar la adhesión y proliferación celular, ya que es este colágeno es el principal componente de la MEC del tejido óseo. Se empleó glutaraldehído (GA) como enlace entre los grupos amino libres de las moléculas de APTES del biomaterial y los grupos amino del colágeno.

Se adaptaron los protocolos de Kuddannaya *et al.* (Kuddannaya *et al.*, 2013) y Xue *et al.* (Xue *et al.*, 2014). Brevemente, se colocaron discos de 8 mm de diámetro de los tres tipos de membranas en 1 mL de GA al 0,5% (v/v) durante 1 hora, se hicieron dos lavados con agua destilada, se sumergieron en 1 mL de colágeno tipo I al 1mg/mL durante toda la noche y se volvieron a lavar dos veces con agua destilada. Este proceso se repitió una vez más sobre las membranas ya injertadas para aumentar la cantidad de proteína inmovilizada en la superficie. El proceso fue llevado a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 mL en un régimen de agitación de 360° mediante un agitador rotatorio (rotador PTR-35, Grant-Bio, EE. UU.).

3.2.4 Tratamiento con glicina

Todas las membranas fueron tratadas con una solución de glicina para neutralizar la citotoxicidad potencial de los grupos aldehído libres del GA que pudieran no haber reaccionado con el colágeno. Se sumergió cada membrana en 1 mL de disolución de glicina 0.2 M en agua ultrapura, agitada previamente durante 20 minutos, y se dejaron toda la noche en régimen de agitación de 360°, finalizando con dos lavados con agua al día siguiente.

3.2.5 Desinfección

Con el objetivo de desinfectar las membranas y de prepararlas para el cultivo, todos los soportes fueron lavados con etanol y agua. Se sumergieron dos veces en etanol 70% durante 15 minutos, dos en etanol 50% durante 10 minutos, dos con etanol 50% durante 5 minutos y tres con agua ultrapura durante 10 minutos. Se usaron tubos Falcon de 15 mL en el agitador rotatorio de 360°. Posteriormente, se colocaron las membranas de 8 mm individualmente en el fondo de varias placas de 48 pocillos, con la cara superior, en contacto con el aire durante la síntesis de las membranas, mirando hacia arriba. Después, se esterilizaron con luz ultravioleta 30 minutos por cada cara y se lavaron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) para eliminar posibles restos de etanol. Posteriormente esta se reemplazó con medio de cultivo basal sin FBS para pre acondicionar las membranas hasta el tratamiento con fibronectina.

3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES

3.3.1 Determinación del espesor

El espesor de las membranas se midió con el instrumento Dualscope MPOR (Fischer, Alemania). Se tomaron tres medidas en cada muestra y se hizo la media de las medidas para el PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

3.3.2 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo (FESEM)

La morfología de las membranas y la disposición de las nanopartículas fueron analizadas con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, del inglés *Field Emission Scanning Electron Microscopy*). Estos equipos se basan en un barrido de haz de electrones sobre la superficie de la muestra que permite visualizar la muestra en un monitor.

Se estudió la superficie y el corte transversal de las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE. Para visualizar el corte transversal se congelaron en nitrógeno líquido para que la estructura interna de cada soporte no variase. Antes de introducir las muestras en el microscopio Ultra 55 (Zeiss, Alemania), fueron recubiertas con platino durante 90 segundos siguiendo un protocolo estándar de pulverización catódica (JFC 1100; JEOL, Japón), con la finalidad de minimizar el efecto de carga en el PVDF.

3.3.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para estudiar la fracción cristalina de las fases del PVDF en las membranas realizó una espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, del inglés *Fourier-transform infrared spectroscopy*). Se usó un espectrómetro Bruker ALPHA FTIR (Bruker, EE. UU.) en modo de reflectancia total atenuada (ATR) de 4000 a 400 cm^{-1} a una resolución de longitud de onda de 4 cm^{-1} y se analizaron muestras de las tres membranas por separado.

Este equipo mide la diferencia entre la radiación emitida y la que llega al detector en cada intervalo de longitud de onda. De este modo, la radiación que atraviesa la muestra detectada será mayor o menor según la absorción de la muestra en cada intervalo. La información que aporta el equipo está relacionada con la energía de vibración característica de cada enlace químico presente en la muestra y, por tanto, dará información sobre el contenido de las diferentes fases cristalinas que compongan cada membrana.

La fracción cristalina correspondiente a la fase α (F_α) y a la fase electroactiva (F_{EA}), que comprende β y γ en conjunto, se calculan mediante el método descrito por Cai *et al.* (Cai *et al.*, 2017) (Ecuación 1a y 1b)

$$F_{EA} (\%) = \frac{A_{840}}{\left(\frac{K_{840}}{K_{763}}\right) A_{763} + A_{840}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 1a}$$

$$F_\alpha (\%) = 100 - F_{EA} \quad \text{Ec. 1b}$$

F_{EA} : fracción de la fase electroactiva; F_α : fracción de la fase alfa; A_{840} y A_{763} : absorbancia a 840 cm^{-1} (pico característico para las fases beta y gamma) y 763 cm^{-1} (pico exclusivo de la fase α), respectivamente; K_{840} y K_{763} : coeficiente de absorción a 840 y 763 cm^{-1} , que corresponden a 7.7×10^4 y $6.1 \times 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente (Cai *et al.*, 2017).

Basándonos en el trabajo de L. A. Martins *et al.*, (L. A. Martins *et al.*, 2022) se realizó una deconvolución de los espectros FTIR entre 1140 y 1300 cm^{-1} para aislar los picos exclusivos de absorbancia de las fases gamma y beta a 1234 cm^{-1} y 1275 cm^{-1} , respectivamente. De esta forma

se pudieron obtener los porcentajes individuales del polímero en fase β y en fase γ con las ecuaciones 2a y 2b.

$$F_{\beta} (\%) = F_{EA} \cdot \left(\frac{A_{1275}}{A_{1275} + A_{1234}} \right) \cdot 100 \quad \text{Ec. 2a}$$

$$F_{\gamma} (\%) = 100 - F_{\beta} \quad \text{Ec. 2b}$$

F_{β} : fracción de fase beta; F_{γ} : fracción de la fase gamma; F_{EA} : fracción de la fase electroactiva; A_{1275} : absorbancia del pico de 1275 cm^{-1} característico de la fase beta; A_{1234} : absorbancia del pico de 1234 cm^{-1} característico de la fase gamma (L. A. Martins et al., 2022).

3.3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El grado de cristalinidad de cada fase del polímero condiciona el comportamiento térmico de cada muestra. Se decidió estudiar por calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *Differential scanning calorimetry*) las propiedades térmicas del PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE con el equipo DSC Pyris 8000 (PerkinElmer, EE. UU.) en una atmosfera de nitrógeno seco. El equipo consta de dos hendiduras en las que se colocan dos cápsulas de aluminio, una vacía y otra que contiene la muestra. Se proporciona a cada cápsula un potencial de energía concreto, de manera que en todo momento tengan la misma temperatura; en cada una se aportará un potencial diferente, dependiendo de lo que contenga la cápsula. Como resultado, el equipo genera un termograma que muestra la diferencia de potencial aportado en función de la temperatura.

Las muestras, introducidas en cápsulas de aluminio, se calentaron desde 0 °C hasta 200 °C a una velocidad de 20 °C/min, seguido de una etapa isoterma a 200 °C y un enfriamiento desde 200 °C a 0 °C.

A partir del termograma resultante se obtuvo la entalpía de fusión (ΔH_s) a partir del área del pico de fusión, la temperatura de fusión (T_m) y se calculó la fracción cristalina (X_c) de las membranas utilizando la ecuación 3.

$$\Delta X_c = \frac{\Delta H_s}{x\Delta H_{\alpha} + \Delta H_{\beta} + \Delta H_{\gamma}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3}$$

X_c : fracción cristalina; ΔH_s : entalpía de fusión; x , y , z : porcentaje de las fases α , β y γ , respectivamente, obtenidas de Ec. 1b, Ec. 2a y Ec. 2b; ΔH_{α} , ΔH_{β} y ΔH_{γ} : entalpías de fusión de muestras con estructuras 100% cristalinas en fase alfa, beta y gamma, que corresponden a 93.07, 103.40 y 104.6 J/g, respectivamente (L. A. Martins et al., 2022).

3.3.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA, del inglés *thermogravimetric analysis*) se realizó en el equipo de TGA Star System (Mettler Toledo, Suiza). El TGA es una técnica que estudia los cambios en la masa de una muestra en función de la temperatura, durante un calentamiento o enfriamiento controlado. Cada muestra se coloca en una cápsula de alúmina, pesada previamente por el equipo, y a medida que la temperatura va cambiando, se va registrando la masa de la muestra. En este caso se hizo un calentamiento para evaluar el rango de estabilidad térmica del polímero en cada una de las membranas. El análisis se realizó calentando desde 30°C hasta 800°C a una velocidad de 10°C/min con una purga de nitrógeno a 20 mL/min.

3.3.6 Detección y cuantificación de colágeno

La presencia de colágeno tipo I en la superficie de las membranas se evaluó siguiendo el protocolo de detección de hidroxiprolina de Kafienah y Sims (Kafienah y Sims, 2004). Se estimó la cantidad de colágeno en nuestra muestra teniendo en cuenta que el contenido en hidroxiprolina del colágeno es alrededor del 13% (Ignat'eva et al., 2007). Al ser un ensayo colorimétrico la absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de microplacas Victor3 (Perkin Elmer, EE. UU.).

3.4 ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR

Se realizaron tres cultivos celulares: adhesión inicial a las 24 horas, expansión y diferenciación osteogénica con y sin estimulación magnetoeléctrica. Las células siguieron el mismo tratamiento en los tres cultivos hasta la siembra en gota en los soportes, por lo que se utilizó una placa con 48 pocillos para estudiar la adhesión, otra para la expansión y dos para la diferenciación de las MSC. Cada uno de estos cultivos se analizaron mediante distintas técnicas, explicadas más adelante.

Se emplearon ¹ células madre mesenquimales humanas (hMSC). Las hMSC ¹ se descongelaron y se expandieron durante 48 horas en matraces T75 en un medio comercial para la expansión de células madre mesenquimales humanas con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. El cóctel de aminoácidos y factores de crecimiento de este medio comercial favorece una buena proliferación tras la descongelación. Pasadas las 48 horas, se cambió el medio por un medio de expansión basal casero que contenía medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (4,5 g/L) sin L-glutamina, con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 4 mM, 70 U/mL de penicilina, 70 µg/mL de estreptomycin, 0,25 µg/mL de fungizona, aminoácidos no esenciales 1X (NEAA) y piruvato sódico 1 mM. Las células fueron incubadas en ambos casos a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂, sustituyendo el medio por medio fresco cada 48-72h.

Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se cambió el medio basal a las células por un medio de ayuno para sincronizar el ciclo celular, consistente en medio basal con solo un 1% (v/v) de FBS. Tras 12h en medio de ayuno se cambió a medio basal con un 10% (v/v) de FBS y se dejó reposar a las células durante 3h. Simultáneamente, ya en las placas de 48 pocillos, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente los soportes en una solución de fibronectina humana a 20 µg/mL para incrementar la adhesión celular. Transcurrido este tiempo, se sembraron las células depositando sobre los materiales una gota de 50 µL de medio basal sin FBS con las células a la densidad requerida para cada experimento; este medio permite que las células se adhirieran primero a la fibronectina de los materiales en lugar de a las proteínas del suero. Tras confirmar ² la adhesión de las células a la superficie, se añadió a cada pocillo 250 µL de medio basal con un 12.5% (v/v) de FBS, con el objetivo de que la concentración final de FBS fuese un 10% (v/v).

² Se utilizaron cubreobjetos de vidrios de 8 mm de diámetro autoclavados como control y se utilizaron anillos de silicona para evitar que las membranas flotaran dentro de los pocillos. Todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo con hMSC en pase 2.

3.4.1 Adhesión celular inicial

En este cultivo, se sembraron las células a una densidad de 2×10^3 células/cm² tanto en los vidrios como en la superficie de las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE. Se escogió una densidad de siembra baja para obtener células individualizadas que facilitaran el análisis de imagen posterior.

La adhesión celular inicial en los materiales se evaluó mediante tinciones de vinculina, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y faloidina a las 24h de la siembra. Transcurrido este tiempo, se fijaron las células con una solución de paraformaldehído al 4% (v/v) durante 20 minutos y posteriormente se lavaron con DPBS sin calcio ni magnesio. En caso de no realizar el ensayo el mismo día, las muestras se almacenaron en azida sódica 0.05% (p/v) hasta el momento de las tinciones. Se incluyeron al menos tres réplicas biológicas de cada condición: PVDF, PVDF-CFO, PVDF-FE y vidrios.

Para realizar la inmunotinción, primero se permeabilizaron las muestras fijadas con un tampón de permeabilización (sacarosa 300 mM, NaCl 50 mM, hexahidrato de MgCl₂ 3 mM, HEPES 20 mM, Tritón X-100 0.5% (v/v), pH 7.2) durante 10 minutos a temperatura ambiente para, después, bloquearlas en una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (p/v) en DPBS 1X/0,1% (v/v) Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con DPBS1X/0,1% (v/v) Tween-20 se incubaron las membranas con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vinculina (1:400) a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces durante 5 minutos con DPBS1X/0,1% (v/v) Tween-20 y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Fluor™ 555 (1:100) y con Faloidina Alexa Fluor™ 488 (1:300) durante 2 horas a 37 °C. Tras otros tres lavados de 5 minutos, las membranas fueron sueltas durante 20 minutos en una solución de Sudan Black siguiendo el protocolo descrito en Morales-Román *et al.* (Morales-Román *et al.*, 2019). Esto se debe a la autofluorescencia del PVDF que dificulta la obtención de imágenes de las células de calidad. Por último, se lavaron 3 veces con DPBS, se añadió el medio de montaje con DAPI y analizaron en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i.

Se realizaron al menos imágenes de 28 células de cada soporte, incluido el vidrio, y se procesaron mediante el programa de análisis de imágenes FIJI (Fiji Is Just ImageJ). Las células se segmentaron individualmente para obtener máscaras binarias de sus núcleos y citoplasmas, utilizando para las últimas imágenes del citoesqueleto de actina. La segmentación se llevó a cabo por umbrales de gris (selección de rangos de intensidad de gris dentro del histograma de cada imagen) de forma manual para las del citoesqueleto y automatizada con una macro para los núcleos (anexo IV). Posteriormente, se limpiaron y perfeccionaron las máscaras y, finalmente, se tomaron medidas morfológicas de las máscaras: área, circularidad, relación de aspecto, solidez y redondez (anexo VI).

3.4.2 Proliferación celular

Las hMSC fueron sembradas a una densidad de 8×10^3 células/cm², cambiando el medio basal de expansión cada 48-72 horas. Para estudiar la expansión de las células se realizaron dos técnicas de análisis: un MTS y una cuantificación de ADN total.

3.4.2.1 MTS

El MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es un ensayo colorimétrico destructivo directamente relacionado con la viabilidad celular. El MTS es

un tetrazoilo que es reducido a un tinte de ²formazán, soluble en el medio de cultivo (Kamiloglu et al., 2020). Esta reducción la llevan a cabo enzimas deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H de células que son activas metabólicamente, es decir, viables.

El ensayo ¹ se realizó sustituyendo el medio basal por medio basal sin rojo fenol con el reactivo de MTS y se midió la densidad óptica a 490 nm en un lector de microplacas Victor3 (PerkinElmer, EE. UU.). Se incluyeron al menos tres réplicas biológicas para hacer el ensayo a día , 3 y 5. Además, también se analizaron membranas sin cultivar para determinar si el material daba señal a la longitud de onda ensayada.

3.4.2.2 Cuantificación ADN total

En los días 2 y 4 se realizó otro ensayo colorimétrico para comprobar la proliferación celular en nuestros materiales. PicoGreen es un colorante que se intercala en el ADN y emite una señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN de la muestra (Holden et al., 2009). Permite cuantificar ADN total en la muestra analizada, tanto de células viables como no viables.

Se congelaron las membranas y vidrios con las células adheridas a -80 °C hasta el día que se realizó el ensayo con el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA, siguiendo las indicaciones del fabricante. ¹ Se midió la densidad óptica a 520 nm en un lector de microplacas Victor3 (PerkinElmer, EE. UU.). La cantidad total de ADN se obtuvo a partir de una curva de calibrado con estándares de ADN conocidos.

3.4.3 Diferenciación osteogénica

En este caso, las células se sembraron a una densidad de 10⁴ células/cm². Al alcanzar el 90% de confluencia, se cambió el medio basal por medio osteogénico, siendo este igual al medio basal, pero añadiendo dexametasona 100 nM, ácido ascórbico 200 µM y β-glicerofosfato 10 mM. En ese momento, la mitad de las muestras se transfirieron a un biorreactor con estimulación magnética, dejando la otra mitad como control negativo. Ambas se cultivaron durante 21 días a 37 °C con un 5% de CO₂, sustituyendo el medio por medio fresco cada 2-3 días.

Para evaluar el efecto de los soportes bioactivos sobre la diferenciación osteogénica de las hMSC se analizaron los niveles de la fosfatasa alcalina y el nivel de mineralización en los días 14 y 21 de cultivo.

La estimulación magnetoeléctrica vino dada por un biorreactor magnético diseñado por Castro et al., ¹ (Castro et al., 2020) capaz de producir un desplazamiento lateral de imanes de neodimio debajo de los pocillos de la placa de cultivo, generando un campo magnético. Las muestras se estimularon durante 272 horas con un desplazamiento de los imanes de 10 mm a una frecuencia de 0,3 Hz. Se aplicó un programa de estimulación basado en la actividad humana diaria, simulando los ciclos de movimiento y reposo del cuerpo humano, y que comprende ciclos de 16 horas de estimulación y 8 horas de inactividad, estando el primero dividida en ciclos de 5 minutos de actividad y 25 minutos de reposo.

3.4.3.1 Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)

La actividad de la fosfatasa alcalina es un marcador temprano de la diferenciación osteogénica (Hoemann et al., 2009). Es un ensayo colorimétrico que permite cuantificar la enzima fosfatasa alcalina presente en una muestra, ya que la intensidad de la señal está directamente relacionada

con la cantidad de enzima.

A días 14 y 21, se recogió el sobrenadante de las muestras, tras dos días desde el último cambio de medio fresco, para realizar el ensayo. Se usó el kit colorimétrico SensoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de 14 días se almacenaron a -80°C hasta la realización del ensayo. Se cuantificó la enzima a partir de una curva de calibrado.

3.4.3.2 Tinción rojo alizarina

Durante la diferenciación osteogénica, las células comienzan a sintetizar y secretar componentes de la matriz extracelular formando una estructura en la que se van depositando iones de calcio y fosfato (Rodríguez et al., 2004). Para analizar la mineralización ósea, los depósitos de calcio pueden ser detectados mediante una tinción de rojo alizarina, colorante que se une a iones de calcio (Hoemann et al., 2009).

Las muestras se incubaron con una solución de rojo alizarina al 2% (p/v) ajustando el pH a 4,2. Para cuantificar los depósitos de calcio se llevó a cabo una extracción del tinte de la matriz mineral con una disolución acuosa con un 10% (v/v) de ácido acético y un 20% (v/v) de metanol, siguiendo el protocolo de Lavenus *et al* (Lavenus et al., 2011). La absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de microplacas Victor3 (Perkin Elmer, EE. UU.). Se incluyeron membranas teñidas de los distintos materiales para evaluar si existía una señal inespecífica por la absorción del tinte en la membrana y su posterior liberación por difusión, así como membranas sin teñir para evaluar una posible reacción con los materiales.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En primer lugar, se verificó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Para aquellas muestras que cumplieran ambas condiciones, se realizó un análisis ANOVA unidireccional seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Turkey (significativo si $p\text{-valor} < 0.05$). En el caso de las muestras que no cumplieran la normalidad y la homocedasticidad, se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (significativo si $p\text{-valor} < 0.05$). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando Excel y Graphpad Prism 9.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MICROESTRUCTURA Y CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS SOPORTES DE PVDF, PVDF-CFO Y PVDF-FE

La síntesis de las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE se realizó mediante ¹separación de fases inducida por no disolventes (NIPS) utilizando el etanol como no-solvente. Al sumergir una lámina de disolución de PVDF en DMF en etanol, el disolvente y el no-solvente se mezclan produciendo la precipitación del polímero que cristaliza en forma de esferulitas, apreciables claramente en la figura 6. De esta manera se forma una membrana porosa. La microestructura de la superficie puede ser diferente de la del centro de la membrana porque en la superficie el intercambio de disolvente y no-solvente es más rápido. La naturaleza o tipo de disolvente utilizado tiene un fuerte impacto en la morfología de los soportes; el etanol disminuye la velocidad de este intercambio, permitiendo que la cristalización suceda antes. En consecuencia, da lugar a membranas de superficie lisa, sin gargantas (Guillot-Ferriols et al., 2021; Liu et al., 2011).

Se confirmó la presencia de esferulitas en la superficie de las membranas de PVDF-CFO y PVDF-FE (Figura 6b-c), las cuales corresponden a las regiones cristalinas del PVDF, pero en el PVDF no son evidentes (Figura 6a). Esta diferencia entre las membranas con y sin nanopartículas evidencia el elevado impacto que tienen las nanopartículas en la cristalización del PVDF. Además, se puede apreciar que la estructura interna de la membrana es más homogénea y menos porosa cuando el polímero carece de nanopartículas, atribuible a dicha diferencia de tamaño de las esferulitas (Figura 6d-f).

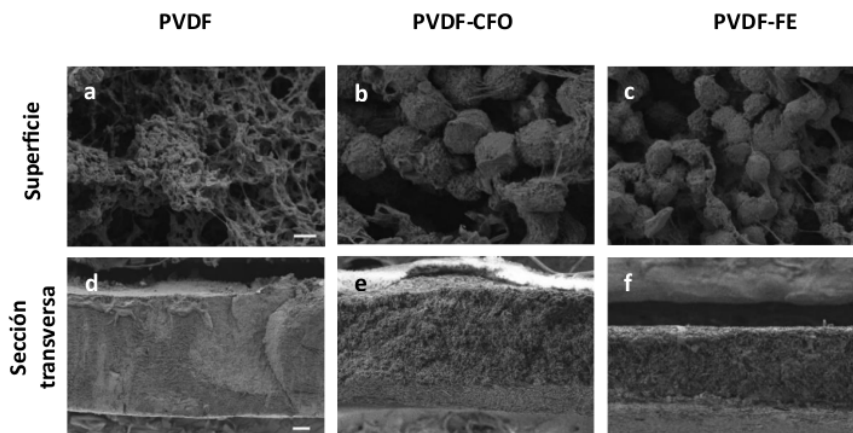


Figura 6. Imágenes de la superficie y sección transversal de membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE) producidas por separación de fases inducida por un no-solvente. a), b), c) Superficie porosa. Barra de escala 1 μm . d), e), f) Sección transversal. Barra de escala 50 μm

Este resultado coincide con estudios anteriores similares, en los que se comparó el diámetro de las esferulitas de PVDF y PVDF con nanopartículas (L. Li *et al.*, 2015; Supriya *et al.*, 2019). En ambos estudios se relacionó el crecimiento de los cristales con el posible papel de las

nanopartículas como centro de nucleación durante la cristalización de forma que, a mayor diámetro de las partículas, mayores son las estructuras formadas a partir de ellas. Por otro lado, Guillot-Ferriols *et al.*, (Guillot-Ferriols *et al.*, 2020) propuso que este incremento de tamaño podría deberse a las diferencias en los protocolos de síntesis de las membranas. Un proceso más largo, al igual que el uso de agitación mecánica y ultrasonidos en PVDF-CFO y PVDF-FE, podría promover la nucleación y el crecimiento de las esferulitas, lo que se reflejaría en un aumento de su tamaño.

En la literatura se encontraron muy pocos estudios que investigasen el efecto de la magnetita de hierro sobre el PVDF. Bhatt *et al.*, (Bhatt *et al.*, 2011) estudiaron la estructura de composites de PVDF-FE, obteniendo resultados similares a los de este estudio: las membranas son porosas y las agregaciones de nanopartículas se encuentran en la superficie y en los poros. Así pues, se demuestra que ambas nanopartículas modifican la estructura interna de las membranas.

También se han encontrado diferencias en cuanto al grosor de las membranas después de liofilizarlas, obteniendo un espesor medio de 205 ± 47 , 157 ± 11 y 116 ± 20 μm para el PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE, respectivamente. Como esperábamos, el grosor de la membrana una vez liofilizada es mucho menor que 750 μm , espesor de la lámina líquida original de disolución de PVDF en DMF; probablemente esta reducción se deba a la difusión del disolvente fuera de la membrana. Por tanto, se puede confirmar que la adición de CFO y FE tienen efectos sobre la anchura de las membranas, siendo más gruesas las membranas de PVDF-CFO.

Por otro lado, el estudio de las fases cristalinas de PVDF es fundamental para el cultivo estimulado magnetoeléctricamente ya que el efecto sobre las células dependerá de las fases electroactivas del PVDF. Las fases β y γ son las electroactivas y, por tanto, de las que depende la piezoelectricidad del PVDF. NIPS es una técnica que, además de en la microestructura, influye en la orientación de las cadenas de PVDF, por lo que es capaz de influir en las fases electroactivas.

Mediante la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier se identificaron los picos característicos de la fase α , β y γ , representados en la figura 7 (L. A. Martins *et al.*, 2022). Para diferenciar entre la fase β y la fase γ se utilizaron los picos a 1234 cm^{-1} y 1279 cm^{-1} , respectivamente, ya que son exclusivos de cada una de ellas. Utilizando las ecuaciones 1a y 1b fue posible obtener el porcentaje de fase α , F_{α} , respecto al conjunto de fases electroactivas $\beta + \gamma$, F_{EA} , mientras que con las ecuaciones 2a y 2b se calculó la proporción entre las fases β y γ , F_{β} y F_{γ} (Tabla 1). Para aislar los picos exclusivos de las fases β y γ se realizó una deconvolución entre 1140 y 1300 cm^{-1} (ver anexo II). Se puede observar que la fase α es mucho mayor en PVDF que en PVDF-CFO y PVDF-FE, por lo que se confirma la presencia de nanopartículas magnéticas produce la nucleación de los cristales en las fases electroactivas.

Guillot-Ferriols *et al.*, (Guillot-Ferriols *et al.*, 2020) mencionan que el incremento de la fase β , la más electroactiva, está relacionado con la presencia de CFO. Observando la tabla 1, se puede ver claramente que esto se cumple para los soportes sintetizados y, además, parece que la presencia de la ferrita de hierro también tiende a aumentar la fase β del polímero. La fase γ también ha aumentado ligeramente al introducir las nanopartículas en el polímero, aunque es más similar en las tres condiciones. La fase β es la más afectada, probablemente, por la carga de las partículas, ya que en esta fase las cargas del PVDF están opuestas e interacciona con CFO y FE.

Estos resultados confirman que los soportes bioactivos de PVDF-CFO y PVDF-FE presentan un potencial piezoeléctrico elevado.

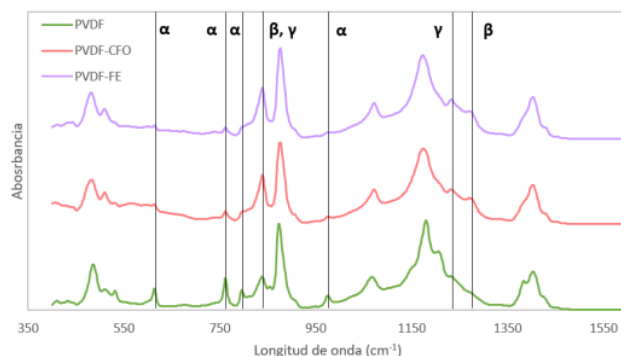


Figura 7. Espectro de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE). Los picos característicos de la fase α (614, 763, 795, 975 cm^{-1}), fase β (1276 cm^{-1}), fase γ (1234 cm^{-1}) y de $\beta+\gamma$ (840 cm^{-1}) del PVDF están representados en negro.

Tabla 1. Fracciones de las fases cristalinas y cristalinidad total de las membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE).

	PVDF	PVDF-CFO	PVDF-FE
$F_{\beta+\gamma}$ (%)	63	80	82
F_{α} (%)	37	20	18
F_{β} (%)	22	34	33
F_{γ} (%)	41	46	49
X_c (%)	86	67	77

Además de estudiar las fracciones cristalinas de cada fase, utilizando los resultados obtenidos por FTIR, también se calculó la fracción cristalina total de las membranas a partir del DSC. Los termogramas DSC de 0 a 200°C se muestran en la figura 8, donde se representa el flujo de calor y las temperaturas de fusión (T_m) en los dos barridos de calentamiento en cada tipo de membrana. Empleando la ecuación 3 se obtuvo la fracción cristalina de las tres membranas.

La cristalinidad del PVDF (86%) fue más elevada que la del PVDF-FE (77%) y la del PVDF-CFO (67%), resumidas en la tabla 1, coincidiendo con lo evidenciado en otros estudios en los que se describe el efecto de CFO y FE sobre el PVDF (Bhatt *et al.*, 2011; P. Martins *et al.*, 2012; Suresh *et al.*, 2017). Según P. Martins *et al.*, (P. Martins *et al.*, 2012) sería posible atribuir la disminución de la cristalinidad a la restricción del movimiento de las cadenas poliméricas por la presencia de las nanopartículas.

El termograma (Figura 8) muestra los picos de fusión de la estructura cristalina del primer calentamiento y del segundo. El primer calentamiento depende del proceso de cristalización del polímero a partir de su disolución en DMF, por lo que aporta información cómo se organizó el polímero al procesarlo por NIPS. La incorporación de nanopartículas disminuyó la T_m del polímero, de 172°C en PVDF a 171 y 168°C, en PVDF-CFO y PCDF-FE, respectivamente; por tanto, la adición de las nanopartículas conlleva cambios en la T_m del polímero (Tabla 2). Estos valores son similares a los que se han obtenido en otros estudios (Guillot-Ferriols *et al.*, 2020; L. A. Martins *et al.*, 2022). La entalpía de fusión (ΔH_s) es cantidad de energía a aportar para que un mol del polímero alcance su punto de fusión. La ΔH_s de las muestras también se vio afectada por la presencia de nanopartículas, pasando de 77 J/g en PVDF a 61 y 71 J/g en PVDF-CFO y PVDF-FE, respectivamente, lo que implica un menor número de estructuras cristalinas. Este hallazgo concuerda con las fracciones cristalinas obtenidas para cada membrana, siendo menores las del PVDF-CFO y PVDF-FE.

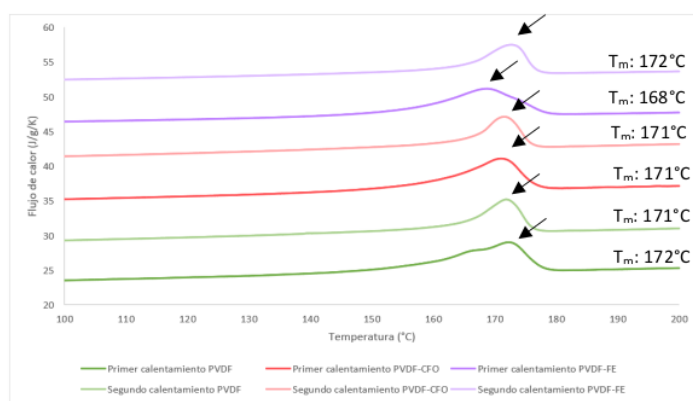


Figura 8. Termograma DSC del poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE). Las curvas representan el primer barrido de calentamiento del PVDF, el segundo barrido de calentamiento del PVDF, el primer barrido de calentamiento del PVDF-CFO, el segundo barrido de calentamiento del PVDF-CFO, el primer barrido de calentamiento del PVDF-FE y el segundo barrido de calentamiento del PVDF-FE. El gráfico evidencia el pico de fusión del polímero, mostrándose las temperaturas de fusión (T_m) en los puntos máximos del pico.

Tabla 2. Temperatura de fusión (T_m) y entalpía de fusión (ΔH_s) en el primer y segundo barrido de temperaturas del poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE).

	Primer calentamiento			Segundo calentamiento		
	PVDF	PVDF-CFO	PVDF-FE	PVDF	PVDF-CFO	PVDF-FE
T_m (°C)	172	171	168	171	171	172
ΔH_s (J/g)	77	61	71	66	58	64

En la curva de fusión del primer calentamiento del PVDF se puede apreciar que el pico de fusión es doble. La presencia de estos picos dobles durante el calentamiento del PVDF es frecuente y se atribuyen a la existencia de diferentes fases cristalinas en el polímero (L. A. Martins *et al.*, 2022). La anchura de los picos hace referencia a la estructura cristalina, cuanto más estrecho es el pico, más homogénea ha sido la cristalización del polímero. La adición de CFO disminuye la anchura del pico, mientras que la adición de FE la aumenta, sugiriendo que en PVDF-FE los cristales son más heterogéneos.

Cuando comienza el segundo calentamiento, la estructura cristalina corresponde al material cristalizado desde el fundido; las diferencias que se observan en la figura 8 entre los picos de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE se debe a la presencia y naturaleza de las nanopartículas que actúan como núcleos de cristalización. La anchura del pico se reduce en los tres tipos de membrana en comparación con la del primer calentamiento, al igual que la entalpía (Tabla 2) lo que era de esperar ya que al cristalizar desde el fundido la movilidad de las cadenas de polímero es mucho menor que cuando cristaliza a partir de la disolución y a los segmentos de polímero les cuesta más incorporarse a los cristales en crecimiento. Las diferencias entre los picos de los dos escaneados térmicos de cada membrana, tal y como dicen L. A. Martins *et al.*, (L. A. Martins *et al.*, 2022), refleja cómo las diferentes condiciones de cristalización afectan a la estructura cristalina.

Para estudiar las propiedades térmicas del polímero y cómo varían con la presencia de nanopartículas se realizó un análisis termogravimétrico. Como se puede observar en la figura 9, la temperatura de inicio de degradación de las membranas con nanopartículas fue superior en ambos casos si se compara con la del PVDF (472°C), aunque entre ellas fue muy similar; coincide con anteriores hallazgos en los que la estabilidad térmica mejoró con la adición de nanopartículas (L. A. Martins *et al.*, 2022).

Las nanopartículas de hierro alteraron más la temperatura de degradación (484°C) que las de cobalto (480°C), por lo que se podría afirmar que la adición de nanopartículas contribuye al aumento de la temperatura de inicio de degradación de los soportes. Ya que cada nanopartícula ha demostrado afectar de manera distinta al rango de estabilidad térmica del polímero, se intuye que la naturaleza de las nanopartículas desempeña un papel importante en las propiedades térmicas del polímero.

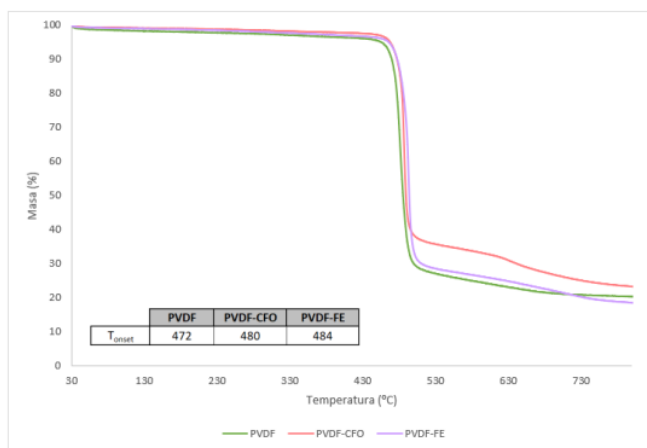


Figura 9. Análisis termogravimétricos de membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE). Se muestran las curvas de degradación térmica para cada una de las condiciones. Las temperaturas de inicio ("onset") del rango de degradación de las membranas se observan en la parte inferior izquierda del gráfico.

4.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LOS SOPORTES DE PVDF, PVDF-CFO Y PVDF-FE

El PVDF es un polímero muy estable químicamente sobre el que es muy difícil injertar las cadenas de colágeno tipo I que nos interesan para hacer las membranas más biomiméticas e inducir la adhesión celular. En este trabajo hemos realizado un primer recubrimiento que introduce grupos amina en la superficie depositando una capa de sílice modificada con esos grupos mediante un procedimiento sol-gel. Al hacer un recubrimiento de las membranas con APTES/TEOS para rellenar las membranas porosas y obtener una superficie lisa se observó que la capa era más gruesa de lo que se pretendía (Figura 10h). Para poder funcionalizar y cultivar las células después, se requería una capa de sílice del mínimo grosor posible que permitiese transmitir el efecto piezoeléctrico de la membrana a las células y que a su vez lograse cubrir toda la superficie de la membrana. Para ello, se realizó el mismo proceso de recubrimiento, pero con distintas concentraciones de APTES/TEOS, y se observaron los cortes transversales en el FESEM (Figura 10). Se decidió seguir adelante con el experimento con un recubrimiento de APTES/TEOS 0.03125M, que tenía un 1% de sílice en comparación con la primera solución utilizada.

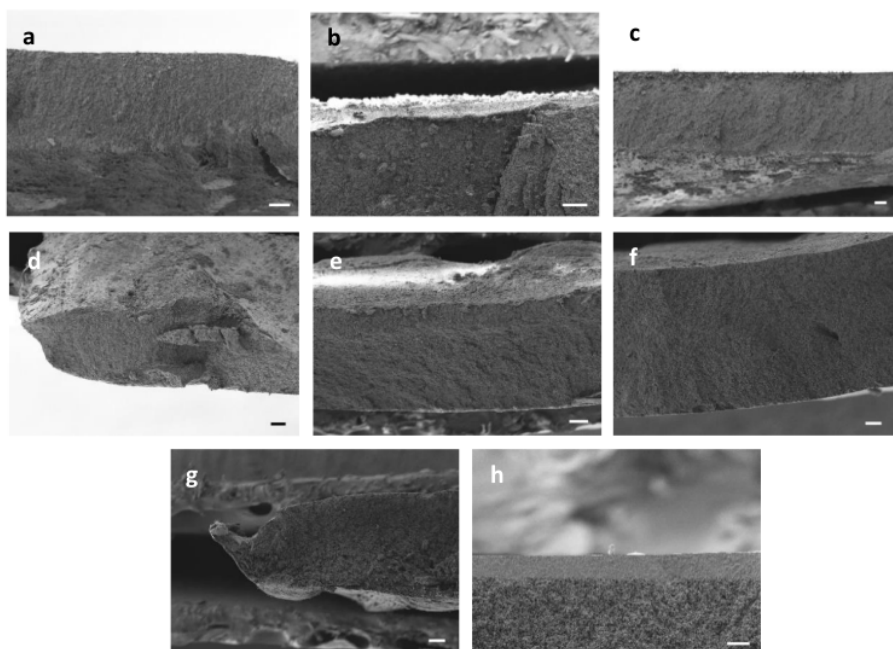


Figura 10. Imágenes FESEM de la sección transversal de membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) producidas recubiertas con una capa de sílice a partir de 3-aminopropiltrietoxisilano y tetraetoxisilano (APTES/TEOS). a) PVDF recubierto de una capa de APTES/TEOS 2M. b) 1M c) 0.5M. d) 0.25M e) 0.125M f) 0.0625M g) 0.03125M h) PVDF recubierto de una capa de APTES/TEOS 2M más detallado. Barra de escala para a), b), c), d), e) y f) 50 µm y h) 10 µm.

Una vez se ha confirmado la presencia de grupos amina en el recubrimiento, se hace reaccionar con glutaraldehído, que enlaza covalentemente los grupos amina de la superficie y los del colágeno tipo I. Para detectar el colágeno injertado se hizo un ensayo colorimétrico de detección de la hidroxiprolina. Se detectó señal de fondo en PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE, lo que sugiere que el polímero o los compuestos generados durante el ensayo podrían estar absorbiendo a 570 nm junto con la hidroxiprolina presente en el colágeno. Esta señal se le restó a la de las membranas para que la señal estudiada se deba únicamente a la presencia del colágeno.

Las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE se injertaron con colágeno I, característico en la MEC, para mejorar la adhesión de las células a los soportes. Para detectar el colágeno injertado se hizo un ensayo colorimétrico de detección de la hidroxiprolina. Se detectó señal de fondo en PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE, lo que sugiere que el polímero o los compuestos generados durante el ensayo podrían estar absorbiendo a 570 nm junto con la hidroxiprolina presente en el colágeno. Esta señal se le restó a la de las membranas para que la señal estudiada se deba únicamente a la presencia del colágeno.

En los soportes de PVDF se detectaron de media 166 ± 37 ng de colágeno por cada soporte de 8 mm de diámetro mientras que, curiosamente, en los de PVDF-CFO y PVDF-FE se detectaron 1060 ± 334 y 1114 ± 100 ng, respectivamente. La cantidad de colágeno adsorbido a la membrana depende de la capa de sílice que recubre la membrana. Al recubrir las membranas enteras y después troquelar los discos, si la capa de sílice no era homogénea en toda la superficie de la membrana, puede ser que la zona de la que se extrajeron los discos tuviese menos APTES/TEOS, y por tanto menos proteínas. Esto podría explicar las diferencias de cantidad de colágeno entre el PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE. Sería interesante hacer un ensayo para identificar los grupos amina del APTES, como puede ser una espectrometría de rayos X de energía dispersiva o el ensayo colorimétrico de ninhidrina, de manera que se confirme si esta diferencia se debe a una deficiencia en el recubrimiento de sílice o algún error experimental en la funcionalización de las membranas.

4.3 CULTIVO CELULAR

4.3.1 Adhesión

La adhesión de las MSC al soporte de cultivo marca el inicio del crecimiento de las células y es un momento clave para ver cómo afectan inicialmente las propiedades del soporte magnetoeléctrico a las células. Para estudiar la adhesión a las 24 horas se realizaron tinciones de DAPI, faloidina y vinculina para obtener imágenes de los núcleos, el citoesqueleto de actina y de las adhesiones focales de las hMSC al material. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa FIJI (ver anexo III para explicación detallada de la segmentación manual de una imagen de actina).

La cuantificación de las adhesiones focales se vio dificultada debido a que la autofluorescencia de las tres membranas era tan elevada que no permitía distinguir los detalles de la señal de la vinculina por encima del fondo.

En la figura 11 se muestra una célula representativa de cada soporte. Se aprecian diferencias de intensidad de la señal del ruido inespecífico entre el vidrio y las membranas, correspondiendo la señal verde alrededor de la célula a la señal que aporta la membrana tintada (anexo V figura S4a para más imágenes). Debido a esto, en los vidrios sí que pueden apreciarse puntos con una señal intensa de color verde en la célula que son las placas de adhesiones focales (Figura 11a), mientras que en el resto de los materiales no. Los puntos intensos en el canal de la vinculina que se aprecian en las figuras 11b-d son ruido inespecífico.

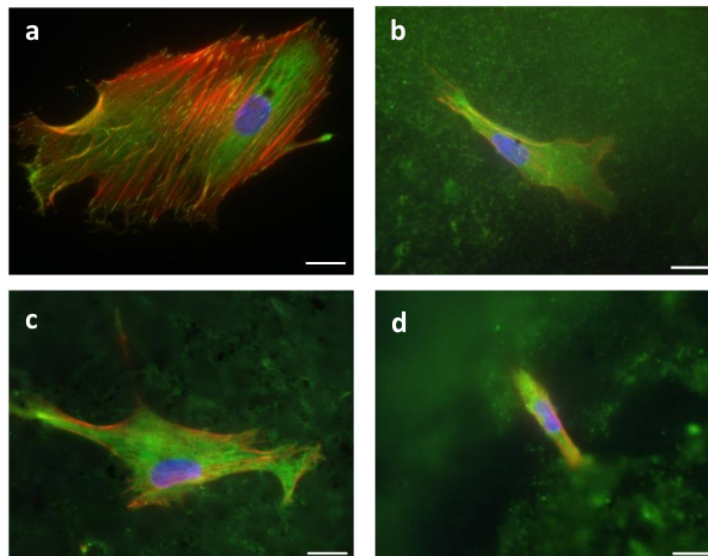


Figura 11. Imágenes de inmunofluorescencia fusionadas de vinculina (verde), actina (rojo) y núcleo (azul) de una célula representativa en vidrio, en membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE), procesadas mediante el programa de análisis de imagen Fiji. Célula cultivada en (a) vidrio b) PVDF c) PVDF-CFO d) PVDF-FE. Barra de escala 20 μ m

Para mejorar la calidad de las imágenes e intentar reducir la autofluorescencia de los materiales se tiñeron las membranas con una solución de Sudan Black. En general, la señal inespecífica disminuyó, pero en el canal de la vinculina no se redujo lo suficiente para identificar las placas de adhesión y las imágenes que se tomaron no se procesaron tan bien como las del citoesqueleto y los núcleos. En el anexo V se muestra la figura S4b, que corresponden a una zona de la membrana que no se tiñó correctamente con la solución y a otra zona perfectamente teñida. Por tanto, se pudo confirmar que el Sudan Black efectivamente disminuyó la autofluorescencia del material.

Se tomaron medidas morfométricas de las células para buscar diferencias entre condiciones. Estas medidas proporcionan información cuantitativa sobre el tamaño y la forma de las células, lo cual permite evaluar cómo afecta la naturaleza del soporte a la extensión de la célula. Uno de los parámetros que se obtuvieron fue el área de las células en los distintos soportes, en la que se vio que el área de las células sembradas en los vidrios fue significativamente mayor que la de aquellas cultivadas en las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE (Figura 12a). Estas diferencias probablemente se deban a que las células se adhieren y extienden menos sobre la superficie del PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

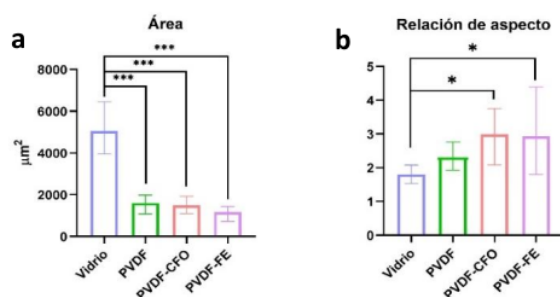


Figura 12. Histograma del área y relación de aspecto de la adhesión inicial a las 24 horas de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) en vidrio, en membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE). a) Área de las hMSC (μm^2). b) Relación de aspecto de las hMSC, corresponde a la elongación de las células. La información de los parámetros se ha obtenido de la guía de usuario de ImageJ. 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 < 0.001. Se usaron al menos 25 células de cada soporte para realizar la estadística.

La topografía de los soportes es clave en la adhesión y crecimiento de las células. Luo *et al.*, (Luo *et al.*, 2022) estudiaron la influencia de la nanotopografía en la adhesión, morfología y diferenciación de diferentes tipos celulares en distintos soportes. Las células interactúan con el soporte a través de los ligandos que sean capaces de reconocer sobre su superficie, por lo que dependiendo de cómo se unan las proteínas a los sustratos, las células darán una respuesta u otra (Luo *et al.*, 2022). La microtopografía, por otro lado, también afecta a las células. En este caso, las imágenes del FESEM (Figura 6d-f) ya adelantaron que las membranas tenían irregularidades en su topografía y, en consecuencia, afecta a la adhesión y extensión de las hMSC. Las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia evidenciaron una topografía heterogénea, con relieve, ya que la mayoría de las células sembradas en PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE se veían en distintos planos de enfoque (ver anexo V figura S4c). Por tanto, si la topografía de los soportes de cultivo es irregular, las hMSC adaptarán su adhesión y morfología a la forma de este.

Por otro lado, se midió la relación de aspecto. Este parámetro es el cociente del diámetro mayor y el menor de cada célula, de manera que informa de la elongación de la célula: será más alargada si la relación es mayor. Los resultados revelaron diferencias significativas entre las células cultivadas en vidrio y en PVDF-FE o PVDF-CFO, siendo más alargadas en los soportes poliméricos, sobre todo en aquellos que contienen nanopartículas en su interior (Figura 12b). Como se ha expuesto antes, estas diferencias de aspecto probablemente también se deban a la topografía de los materiales ya que las células intentarán adaptar sus puntos de anclaje al material y su morfología a la forma de la superficie (anexo V figura S4d).

Los parámetros de circularidad, solidez y redondez son consecuencia del área y en la relación de aspecto, por lo que (ver anexo VI para definiciones de parámetros morfométricos y gráficas de resultados de circularidad, solidez y redondez). El resultado de estos parámetros, en especial la redondez, que penaliza las formas alargadas, concuerda con lo expuesto hasta el momento: las hMSC en PVDF, PVDF-CFO y PVDF-Fe son menos redondas que las de los vidrios.

Guillot-Ferriols *et al.*, estudiaron la adhesión de las hMSC a las 24 horas en soportes de PVDF cubiertos con fibronectina. En él observaron que la adherencia inicialmente es pobre y que, en concordancia con nuestros resultados, adquieren una forma alargada (Guillot-Ferriols *et al.*, 2021). Aunque inicialmente no se unen bien al soporte, se ha visto que después de un periodo de adaptación al soporte se adhieren y expanden mejor, ya que a los 7 días las células cultivadas en PVDF adquieren una forma similar a las de los vidrios (Guillot-Ferriols *et al.*, 2021; Morales-Román *et al.*, 2019).

Por tanto, nuestros hallazgos evidencian diferencias en la forma de las células entre las que se sembraron en los vidrios y en los materiales. Estas diferencias podrían deberse a la topografía del soporte, aunque también a la presencia de las nanopartículas. Las células en los materiales han adoptado una forma más alargada y menos aplanada, e incluso algunas se deforman para poder anclarse de la mejor manera posible al soporte, indicando que las células no se han adherido muy bien al material. Para completar el estudio de la forma adquirida por las células en los materiales se debería tomar imágenes con un microscopio que permita analizar más ejes, como un microscopio confocal. Además, sería conveniente cambiar de fluoróforos para poder estudiar las adhesiones focales en longitudes de onda en la que no haya fluorescencia de los soportes y así poder obtener una imagen de calidad de las adhesiones focales.

4.3.2 Proliferación

El cultivo de hMSC en soportes magnetoeléctricos, como el PVDF-CFO, se ha estudiado en muchas ocasiones; sin embargo, se sabe que esta nanopartícula puede derivar en estrés y alteraciones en las células. La magnetita de hierro es una nanopartícula más segura que puede favorecer la regeneración ósea. Así pues, se evaluó la proliferación de hMSC sembradas en vidrio, PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

² Se realizó un ensayo de MTS para evaluar la proliferación celular. A día 1 de cultivo, la señal de las células sembradas en PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE fue menor que la señal de las membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE sin cultivar y que el blanco (ver anexo VII para ver los resultados del MTS), que únicamente contenía medio basal sin rojo fenol. En cambio, las células sembradas en vidrios sí que dieron una señal superior. A simple vista, después de realizar el ensayo se pudo ver que las membranas de PVDF se quedaron teñidas de color rojo (ver anexo VII). Estos hechos sugieren que las membranas absorben el reactivo MTS y en consecuencia no hay señal. En conclusión, la técnica MTS no es una técnica válida para estudiar la proliferación en membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE.

Se decidió cambiar a un ensayo PicoGreen con el que se cuantificó el ADN total de las muestras a días 2 y 4 de cultivo (originalmente las muestras para los días 3 y 5 del MTS). Solamente hubo diferencias significativas entre la señal del vidrio y el PVDF-FE a día 2 (Figura 13).

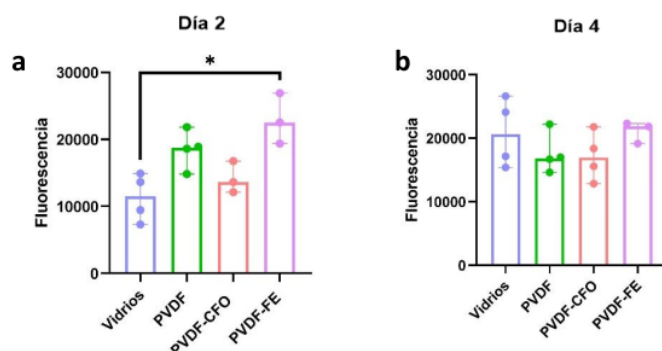


Figura 13. Histograma del ensayo PicoGreen a día 2 y 4 para cuantificar el ADN total en los vidrios y en las membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), en PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y en PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE). a) ADN total a día 2. b) ADN total a día 4. En el gráfico 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. Se usaron al menos 3 réplicas biológicas de cada soporte.

A día 2 se ve alguna diferencia en la proliferación, en los materiales hay más ADN que en los vidrios, sobre todo en PVDF-FE que sale significativa. Sin embargo, a día 4 la proliferación en las membranas se iguala con la del vidrio, sugiriendo que nuestros soportes no tienen una influencia negativa sobre el crecimiento de las células hasta ese momento. No hay un gran aumento en la cantidad de ADN a día 4, como esperábamos, posiblemente porque en esos 2 días no han tenido suficiente tiempo para proliferar. Para estudiar en el futuro la proliferación sería conveniente un cultivo más largo con más puntos en los que medir la cantidad de ADN total.

4.3.3 Diferenciación osteogénica

La literatura recoge protocolos de estimulación muy variados, desde trabajos que sólo se estimula en el primer o los dos o tres primeros días de cultivo hasta aquellos en los que la estimulación se mantiene durante todo el cultivo (Guillot-Ferriols, García-Briega, *et al.*, 2022; Ravikumar *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2018) En nuestro caso, inicialmente, se planteó una estimulación magnetoeléctrica de las muestras durante los 21 días de cultivo, pero finalmente se hizo una estimulación inicial durante 272 horas manteniendo a partir de ese momento el cultivo en condiciones estáticas para analizar el efecto de la estimulación temprana. El efecto de la estimulación magnetoeléctrica se comprobó mediante el análisis de la actividad ALP y la detección de los depósitos de calcio con una tinción rojo alizarina a días 14 y 21 de cultivo.

La figura 14a muestra la actividad de la fosfatasa alcalina a 14 días. Se pueden apreciar diferencias de la actividad entre los vidrios no estimulados, método de cultivo tradicional, y el resto de las condiciones, por lo que podemos afirmar que tanto la estimulación como los materiales disminuyen la actividad fosfatasa alcalina a los 14 días.

A día 21 de cultivo no hubo diferencias significativas ni entre condiciones ni entre aquellas células estimuladas o no (Figura 14b). Tal y como esperábamos, la actividad de la fosfatasa alcalina se reduce considerablemente, ya que la enzima se produce al inicio de la diferenciación osteogénica, siendo su pico máximo alrededor de los 10 días de cultivo normalmente; pero

conforme avanza la diferenciación, su expresión se reduce (Guillot-Ferriols, García-Briega, *et al.*, 2022; Vimalraj, 2020).

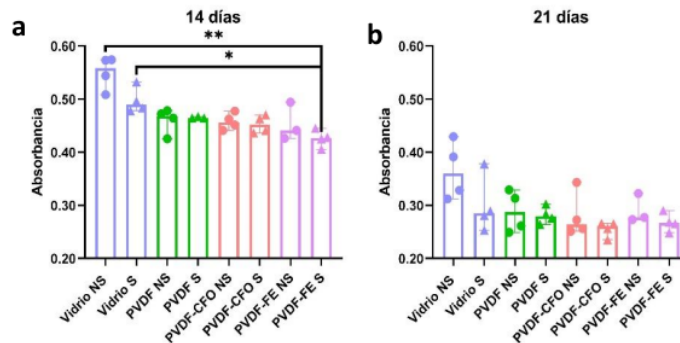


Figura 14. Histograma de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de células madre mesenquimales humanas (hMSC). Las hMSC se cultivaron en vidrios, en membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetita de hierro (PVDF-FE). Las células se cultivaron en los soportes bajo estimulación magnética durante 272 horas (S) y sin estimulación magnética (NS). a) ALP medida en día 14. b) ALP medida en 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 $< 0,05$ y ** a p -valor $< 0,01$. Se usaron al menos 3 réplicas biológicas de cada soporte.

Para el estudio de la mineralización se tiñeron las muestras con rojo alizarina y posteriormente se extrajo para cuantificarlo mediante absorbancia. La señal que dieron el PVDF, PVDF-CFO, PVDF-FE y los vidrios cultivados, tanto a día 14 como a día 21, fue menor que la de las condiciones sin cultivar. Previamente a la extracción se observaron los depósitos de calcio del vidrio al microscopio óptico; sin embargo, no se encontró nada que indicase la presencia de estos. Las membranas, al ser opacas, no se pudieron mirar al microscopio. Estos hallazgos revelan que las células no se han diferenciado lo suficiente como para que se dé la mineralización, lo que podría deberse a que el medio de diferenciación no fuese el más adecuado para el cultivo.

Por tanto, para saber si, individualmente, la estimulación temprana que se ha aplicado y la naturaleza de los soportes tienen un impacto relevante en la diferenciación osteogénica de las hMSC se debería repetir el ensayo de mineralización con otro medio de diferenciación y estudiar los depósitos de calcio. Además, para futuros experimentos de diferenciación también sería interesante prolongar la duración del cultivo, una estimulación más larga y un estudio genético de marcadores de diferenciación.

5. CONCLUSIONES

Los objetivos de este trabajo fueron desarrollar un soporte de cultivo inteligente en 2D para la expansión y diferenciación osteogénica de hMSC y evaluar el impacto de la naturaleza de las nanopartículas en la estimulación magnetoeléctrica. Las principales conclusiones del estudio pueden resumirse brevemente en:

- La síntesis de membranas de PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE por una separación de fases inducida por no-solventes (NIPS) con etanol es óptima para todas las membranas, incluida la que contiene magnetita de hierro (III).
- La adición de nanopartículas, ya sean magnéticas o magnetostrictivas, modifican la microestructura del PVDF formando esferulitas de mayor tamaño y aumentan la presencia de las fases electroactivas del polímero, sobre todo la fase β . También reducen la cristalinidad del polímero: PVDF-CFO presentaba una cristalinidad del 67%, de la cual el 80% era electroactiva, y PVDF-FE era un 77% cristalino, el 82% del cual era fase electroactiva. Además, aumentan la T_m del polímero hasta 480 y 484°C en PVDF-CFO y PVDF-FE, respectivamente. Por lo tanto, se confirmó que nuestro soporte presentaba una piezoelectricidad elevada.
- Las membranas se recubrieron con APTES/TEOS y se funcionalizaron con colágeno tipo I. Se cuantificó la proteína adsorbida a las membranas, obteniendo más cantidad en las membranas de PVDF-CFO y PVDF-FE que en las de PVDF. Dependiendo del recubrimiento con sílice, la funcionalización será más o menos homogénea, por lo que en próximos experimentos sería interesante cuantificar los grupos amina del APTES y confirmar si estas diferencias se deben a errores experimentales en el injerto de proteína o a un recubrimiento poco homogéneo.
- La adhesión a las 24 horas de hMSC fue más débil en el PVDF, PVDF-CFO y PVDF-FE en comparación con el control, evidenciado por las medidas morfométricas. Las células adaptaron su morfología a la topografía del soporte para poder adherirse y comenzar a expandirse. El estudio de la proliferación de hMSC en las membranas reveló que, aunque inicialmente haya diferencias, a los 4 días la expansión en PVDF-CFO y PVDF-FE ya era similar al control. En cuanto a la diferenciación osteogénica, la actividad de la fosfatasa alcalina evidenció una diferenciación de las hMSC, pero no se vio mineralización. Esto sugiere que el cultivo no fue lo suficientemente largo para que las hMSC se diferenciases completamente. Para futuros experimentos convendría hacer un cultivo más largo en el que se midiese la proliferación en más puntos y observar si se produce mineralización. Por último, no se vieron diferencias significativas entre células estimuladas o no estimuladas ni entre soportes; aunque sí que se apreció que tanto la estimulación como los soportes influyen negativamente en la actividad de la fosfatasa alcalina.

Parece ser que la naturaleza de la nanopartícula no interfiere con la adhesión y la proliferación de las hMSC ya que no hubo diferencias significativas entre ellas, ambas tienen efectos similares. Como la diferenciación osteogénica no se completó, no se puede asegurar con certeza si el efecto de la ferrita de cobalto y la magnetita de hierro (III) sobre la diferenciación es diferente. Por estas razones, el cultivo de hMSCs en matrices poliméricas con nanopartículas magnética para la

expansión y diferenciación parece ser prometedora y se debería continuar en esta línea de investigación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AHMAD, F., Y ZHOU, Y. (2017). Pitfalls and Challenges in Nanotoxicology: A Case of Cobalt Ferrite (CoFe₂O₄) Nanocomposites. *Chemical Research in Toxicology*, 30(2), 492-507. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00377>
- ALBREKTSSON, T., Y JOHANSSON, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration. *European Spine Journal*, 10, S96-S101. <https://doi.org/10.1007/s005860100282>
- BHATT, A. S., BHAT, D. K., Y SANTOSH, M. S. (2011). Crystallinity, conductivity, and magnetic properties of PVDF-Fe₃O₄ composite films. *Journal of Applied Polymer Science*, 119(2), 968-972. <https://doi.org/10.1002/app.32796>
- BIANCO, P., Y ROBEY, P. G. (2001). *Stem cells in tissue engineering*. 414, 118-121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35102181>
- BIGA, L. M., DAWSON, S., HARWELL, A., HOPKINS, R., KAUFMANN, J., LEMASTER, M., MATERN, P., MORRISON-GRAHAM, K., QUICK, D., Y RUNYEON, J. L. W. (2020). Bone tissue and the skeletal system. En *Anatomy Y Physiology*. OpenStax/Oregon State University. 265-327
- BOBO, D., ROBINSON, K. J., ISLAM, J., THURECHT, K. J., Y CORRIE, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research* 33(10), 2373-2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- BROWN, J. L., KUMBAR, S. G., Y LAURENCIN, C. T. (2013). Bone Tissue Engineering. En *Biomaterials Science: An Introduction to Materials* 3ª Ed., Elsevier Inc. 1194-1214.
- CAI, X., LEI, T., SUN, D., Y LIN, L. (2017). A critical analysis of the α , β and γ phases in poly(vinylidene fluoride) using FTIR. *RSC Advances*, 7(25), 15382-15389. <https://doi.org/10.1039/c7ra01267e>
- CASTRO, N., FERNANDES, M. M., RIBEIRO, C., CORREIA, V., MINGUEZ, R., Y LANCEROS-MÉNDEZ, S. (2020). Magnetic bioreactor for magneto-, mechano-and electroactive tissue engineering strategies. *Sensors (Switzerland)*, 20(12), 1-13. <https://doi.org/10.3390/s20123340>
- DEMIRDÖĞEN, B., PLAZAS BONILLA, C. E., TRUJILLO, S., PERILLA, J. E., ELCIN, A. E., ELCIN, Y. M., Y GÓMEZ RIBELLES, J. L. (2014). Silica coating of the pore walls of a microporous polycaprolactone membrane to be used in bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(9), 3229-3236. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34999>
- DIMITRIOU, R., JONES, E., MCGONAGLE, D., Y GIANNOUDIS, P. V. (2011). Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Medicine* 9(1), 1-10 <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., DEANS, R. J., KEATING, A., PROCKOP, D. J., Y HORWITZ, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

- EINHORN, T. A., Y GERSTENFELD, L. C. (2015). Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology* 11(1), 45-54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>
- FERNANDES, M. M., CORREIA, D. M., RIBEIRO, C., CASTRO, N., CORREIA, V., Y LANCEROS-MENDEZ, S. (2019). Bioinspired Three-Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(48), 45265-45275. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b14001>
- FERNÁNDEZ VALLONE, V. B., ROMANIUK, M. A., CHOI, H., LABOVSKY, V., OTAEGUI, J., Y CHASSEING, N. A. (2013). Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation* 85(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.08.004>
- FERREIRA, T., Y RASBAND, W. (2012). *ImageJ user guide— IJ 1.46*. imagej.nih.gov/ij/docs/guide/
- FISHER, J. N., PERETTI, G. M., Y SCOTTI, C. (2016). Stem Cells for Bone Regeneration: From Cell-Based Therapies to Decellularised Engineered Extracellular Matrices. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9352598>
- FRANZ-ODENDAAL, T. A., HALL, B. K., Y WITTEN, P. E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *En Developmental Dynamics*, 235(1), 176-190. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>
- FUKADA, E., Y YASUDA, I. (1957). On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the Physical Society of Japan*, 12(10), 1158-1162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1143/JPSJ.12.1158>
- GARCÍA-BRIGA, M. I., RÓDENAS-ROCHINA, J., MARTINS, L. A., LANCEROS-MÉNDEZ, S., GALLEGU FERRER, G., SEMPERE, A., Y GÓMEZ RIBELLES, J. L. (2022). Stability of Biomimetically Functionalised Alginate Microspheres as 3D Support in Cell Cultures. *Polymers*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/polym14204282>
- GILLMAN, C. E., Y JAYASURIYA, A. C. (2021). FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *En Materials Science and Engineering C*, 130. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>
- GOMES, J., NUNES, J. S., SENCADAS, V., Y LANCEROS-MENDEZ, S. (2010). Influence of the β -phase content and degree of crystallinity on the piezo-and ferroelectric properties of poly(vinylidene fluoride). *Smart Materials and Structures*, 19(6). <https://doi.org/10.1088/0964-1726/19/6/065010>
- GONÇALVES, R., MARTINS, P., MOYA, X., GHIDINI, M., SENCADAS, V., BOTELHO, G., MATHUR, N. D., Y LANCEROS-MENDEZ, S. (2015). Magnetoelectric CoFe₂O₄/polyvinylidene fluoride electrospun nanofibres. *Nanoscale*, 7(17), 8058-8061. <https://doi.org/10.1039/c5nr00453e>
- GRAYSON, W. L., BUNNELL, B. A., MARTIN, E., FRAZIER, T., HUNG, B. P., Y GIMBLE, J. M. (2015). Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews Endocrinology*. 11(3), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.234>
- GUILLLOT-FERRIOLS, M., DEL BARRIO, A., COSTA, C. M., LANCEROS MÉNDEZ, S., RODRÍGUEZ-CABELLO, J. C., GÓMEZ RIBELLES, J. L., SANTOS, M., Y GALLEGU FERRER, G. (2021). Effective elastin-like recombinamers coating on poly(vinylidene) fluoride membranes for mesenchymal stem cell culture. *European Polymer Journal*, 146 (Enero), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110269>

- GUILLLOT-FERRIOLS, M., GARCÍA-BRIEGA, M. I., TOLOSA, L., COSTA, C. M., LANCEROS-MÉNDEZ, S., GÓMEZ RIBELLES, J. L., Y GALLEGÓ FERRER, G. (2022). Magnetically Activated Piezoelectric 3D Platform Based on Poly(Vinylidene) Fluoride Microspheres for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Gels*, 8(10), 680. <https://doi.org/10.3390/gels8100680>
- GUILLLOT-FERRIOLS, M., LANCEROS-MÉNDEZ, S., GÓMEZ RIBELLES, J. L., Y GALLEGÓ FERRER, G. (2022). Electrical stimulation: Effective cue to direct osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells? *Biomaterials Advances* 138 (Mayo), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212918>
- GUILLLOT-FERRIOLS, M., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J. C., CORREIA, D. M., CARABINEIRO, S. A. C., LANCEROS-MÉNDEZ, S., GÓMEZ RIBELLES, J. L., Y GALLEGÓ FERRER, G. (2020). Poly(vinylidene) fluoride membranes coated by heparin/collagen layer-by-layer, smart biomimetic approaches for mesenchymal stem cell culture. *Materials Science and Engineering C*, 117, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111281>
- HOEMANN, C. D., EL-GABALAWY, H., Y MCKEE, M. D. (2009). In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie*, 57(4), 318-323. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.06.004>
- HOLDEN, M. J., HAYNES, R. J., RABB, S. A., SATIJA, N., YANG, K., Y BLASIC, J. R. (2009). Factors Affecting Quantification of Total DNA by UV Spectroscopy and PicoGreen Fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7221-7226. <https://doi.org/10.1021/jf901165h>
- IGNAT'ÉVA, N. Y., DANILOV, N. A., AVERKIEV, S. V., OBREZKOVA, M. V., LUNIN, V. V., Y SOBOL', E. N. (2007). Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(1), 51-57. <https://doi.org/10.1134/S106193480701011X>
- JAUHAR, S., KAUR, J., GOYAL, A., Y SINGHAL, S. (2016). Tuning the properties of cobalt ferrite: A road towards diverse applications. *RSC Advances*, 6(100) 97694-97719. <https://doi.org/10.1039/c6ra21224g>
- KAFIENAH, W., Y SIMS, T. (2004). Biochemical Methods for the Analysis of Tissue-Engineered Cartilage. *Methods in Molecular Biology. Humana Press, Clifton*, 238, 217–230.
- KAMILOGLU, S., SARI, G., OZDAL, T., Y CAPANOGLU, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- KIM, D., HAN, S. A., KIM, J. H., LEE, J. H., KIM, S. W., Y LEE, S. W. (2020). Biomolecular Piezoelectric Materials: From Amino Acids to Living Tissues. *Advanced Materials*, 32(14). <https://doi.org/10.1002/adma.201906989>
- KIM, J. M., LIN, C., STAVRE, Z., GREENBLATT, M. B., Y SHIM, J. H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 9(9). <https://doi.org/10.3390/cells9092073>
- KUDDANNAYA, S., CHUAH, Y. J., LEE, M. H. A., MENON, N. V., KANG, Y., Y ZHANG, Y. (2013). Surface chemical modification of poly(dimethylsiloxane) for the enhanced adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(19), 9777-9784. <https://doi.org/10.1021/am402903e>
- LAVENUS, S., PILET, P., GUICHEUX, J., WEISS, P., LOUARN, G., Y LAYROLLE, P. (2011). Behaviour of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblasts on smooth surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7(4), 1525-1534. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.033>
- LI, L., ZHANG, M., Y RUAN, W. (2015). Studies on synergistic effect of CNT and CB nanoparticles

- on PVDF. *Polymer Composites*, 36(12), 2248-2254. <https://doi.org/10.1002/pc.23137>
- LI, S., WEI, C., Y LV, Y. (2020). Preparation and Application of Magnetic Responsive Materials in Bone Tissue Engineering. *Current Stem Cell Research Y Therapy*, 15(5), 428-440. <https://doi.org/10.2174/1574888x15666200101122505>
- LIANG, K., BAE, K. H., Y KURISAWA, M. (2019). Recent advances in the design of injectable hydrogels for stem cell-based therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(24), 3775-3791. <https://doi.org/10.1039/c9tb00485h>
- LINDAHL, A., BRITTEBERG, M., GIBBS, D., DAWSON, J. I., KANCZLER, J., BLACK, C., TARE, R., Y OREFFO, R. O. C. (2014). Cartilage and Bone Regeneration. En *Tissue Engineering*. Elsevier. 529-582. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420145-3.00016-X>
- LIU, F., HASHIM, N. A., LIU, Y., ABED, M. R. M., Y LI, K. (2011). Progress in the production and modification of PVDF membranes. *Journal of Membrane Science*, 375(1-2), 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.03.014>
- LUO, J., WALKER, M., XIAO, Y., DONNELLY, H., DALBY, M. J., Y SALMERON-SANCHEZ, M. (2022). The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix – A review. *Bioactive Materials*, 15, 145-159. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.11.024>
- MAGAYE, R., ZHAO, J., BOWMAN, L., Y DING, M. (2012). Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(4), 551-561. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.656>
- MAIDHOF, R., TANDON, N., LEE, E. J., LUO, J., DUAN, Y., YEAGER, K., KONOFAGOU, E., Y VUNJAK-NOVAKOVIC, G. (2012). Biomimetic perfusion and electrical stimulation applied in concert improved the assembly of engineered cardiac tissue. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(10). <https://doi.org/10.1002/term.525>
- MARTINS, L. A., RÓDENAS-ROCHINA, J., SALAZAR, D., CARDOSO, V. F., GÓMEZ RIBELLES, J. L., Y LANCEROS-MENDEZ, S. (2022). Microfluidic Processing of Piezoelectric and Magnetic Responsive Electroactive Microspheres. *ACS Applied Polymer Materials*, 4(8), 5368-5379. <https://doi.org/10.1021/acsapm.2c00380>
- MARTINS, P., COSTA, C. M., FERREIRA, J. C. C., Y LANCEROS-MENDEZ, S. (2012). Correlation between crystallization kinetics and electroactive polymer phase nucleation in ferrite/poly(vinylidene fluoride) magnetoelectric nanocomposites. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(2), 794-801. <https://doi.org/10.1021/jp210493t>
- MARTINS, P., Y LANCEROS-MÉNDEZ, S. (2013). Polymer-based magnetoelectric materials. *Advanced Functional Materials*, 23(27), 3371-3385. <https://doi.org/10.1002/adfm.201202780>
- MARTINS, P., SILVA, M., Y LANCEROS-MENDEZ, S. (2015). Determination of the magnetostrictive response of nanoparticles via magnetoelectric measurements. *Nanoscale*, 7(21), 9457-9461. <https://doi.org/10.1039/c5nr01397f>
- MAUFFREY, C., BARLOW, B. T., Y SMITH, W. (2015). Management of segmental bone defects. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 23(3), 143-153. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-14-00018>
- MENG, J., ZHANG, Y., QI, X., KONG, H., WANG, C., XU, Z., XIE, S., GU, N., Y XU, H. (2010). Paramagnetic nanofibrous composite films enhance the osteogenic responses of pre-osteoblast cells. *Nanoscale*, 2(12), 2565-2569. <https://doi.org/10.1039/c0nr00178c>

- MORALES-ROMÁN, R. M., GUILLOT-FERRIOLS, M., ROIG-PÉREZ, L., LANCEROS-MENDEZ, S., GALLEG0-FERRER, G., Y GÓMEZ RIBELLES, J. L. (2019). Freeze-extraction microporous electroactive supports for cell culture. *European Polymer Journal*, 119, 531-540. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.07.011>
- NAUTH, A., MCKEE, M. D., EINHORN, T. A., WATSON, J. T., LI, R., Y SCHEMITSCH, E. H. (2011). Managing Bone Defects. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 25(8), 462-466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e318224caf0>
- NORONHA NC, N. D. C., MIZUKAMI, A., CALIÁRI-OLIVEIRA, C., COMINAL, J. G., ROCHA, J. L. M., COVAS, D. T., SWIECH, K., Y MALMEGRIM, K. C. R. (2019). Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>
- OLADAPO, B. I., ISMAIL, S. O., KAYODE, J. F., Y IKUMAPAYI, O. M. (2023). Piezoelectric effects on bone modeling for enhanced sustainability. *Materials Chemistry and Physics*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127960>
- ORYAN, A., KAMALI, A., MOSHIRIB, A., Y ESLAMINEJAD, M. B. (2017). Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs*. 204(2), 59-83. <https://doi.org/10.1159/000469704>
- RAJABI, A. H., JAFFE, M., Y ARINZEH, T. L. (2015). Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. *Acta Biomaterialia*. 24, 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.010>
- RAVIKUMAR, K., BODA, S. K., Y BASU, B. (2017). Synergy of substrate conductivity and intermittent electrical stimulation towards osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bioelectrochemistry*, 116, 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.03.004>
- RIBEIRO, C., COSTA, C. M., CORREIA, D. M., NUNES-PEREIRA, J., OLIVEIRA, J., MARTINS, P., GONÇALVES, R., CARDOSO, V. F., Y LANCEROS-MÉNDEZ, S. (2018). Electroactive poly(vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications. *Nature Protocols*, 13(4), 681-704. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.157>
- RIBEIRO, C., SENCADAS, V., CORREIA, D. M., Y LANCEROS-MÉNDEZ, S. (2015). Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. En *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.043>
- RODRÍGUEZ, J. P., GONZÁLEZ, M., RÍOS, S., Y CAMBIAZO, V. (2004). Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(4), 721-731. <https://doi.org/10.1002/jcb.20234>
- SAFADI, F. F., BARBE, M. F., ABDELMAGID, S. M., RICO, M. C., ASWAD, R. A., LITVIN, J., Y POPOFF, S. N. (2009). Bone structure, development and bone biology. En *Bone Pathology*. Humana Press 1-50. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-347-9_1
- SAMADI, A., SALATI, M. A., SAFARI, A., JOUYANDEH, M., BARANI, M., SINGH CHAUHAN, N. P., GOLAB, E. G., ZARRINTAJ, P., KAR, S., SEIDI, F., HEJNA, A., Y SAEB, M. R. (2022). Comparative review of piezoelectric biomaterials approach for bone tissue engineering. En *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 33(12), 1555-1594. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2065409>
- SCHAFFLER, M. B., CHEUNG, W. Y., MAJESKA, R., Y KENNEDY, O. (2014). Osteocytes: Master orchestrators of bone. En *Calcified Tissue International*, 94, 5-24. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9790-y>

- SCHINDELER, A., MCDONALD, M. M., BOKKO, P., Y LITTLE, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19, (5), 459-466. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.004>
- SCHMIDT, A. H. (2021). Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury*, 52, S18-S22. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.01.043>
- SEEMAN, E. (2008). Modeling and Remodeling: The Cellular Machinery Responsible for the Gain and Loss of Bone's Material and Structural Strength. En *Principles of Bone Biology*. 3^a ed., Academic Press. 3-28.
- SUPRIYA, S., KUMAR, L., Y KAR, M. (2019). Optimization of dielectric properties of PVDF–CFO nanocomposites. *Polymer Composites*, 40(3), 1239-1250. <https://doi.org/10.1002/pc.24840>
- SURESH, G., JATAV, S., RAMACHANDRA RAO, M. S., Y SATAPATHY, D. K. (2017). Enhancement of dielectric and ferroelectric properties in cobalt ferrite doped poly(vinylidene fluoride) multiferroic composites. *Materials Research Express*, 4(7). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa7109>
- TANDON, B., BLAKER, J. J., Y CARTMELL, S. H. (2018). Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair. *Acta Biomaterialia*, 73, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.026>
- TANG, B., ZHUANG, J., WANG, L., ZHANG, B., LIN, S., JIA, F., DONG, L., WANG, Q., CHENG, K., Y WENG, W. (2018). Harnessing Cell Dynamic Responses on Magnetoelectric Nanocomposite Films to Promote Osteogenic Differentiation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(9), 7841-7851. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19385>
- TZELEPI, V., TSAMANDAS, A. C., ZOLOTA, V., Y SCOPA, C. D. (2009). Bone anatomy, physiology and function. En *Bone Metastases: A translational and clinical approach*. 1.^a ed., Springer. 3-30.
- VALTANEN, R. S., YANG, Y. P., GURTNER, G. C., MALONEY, W. J., Y LOWENBERG, D. W. (2021). Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future? *Injury*, 52, S72-S77. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.07.040>
- VERNON, L., KAPLAN, L., Y HUANG, C.-Y. C. (2012). Stem cell based bone tissue engineering. En *Bone Regeneration*. In Tech. 11-32
- WANG, W., Y YEUNG, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2(4), 224-247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
- WANG, Z. L. (2007). Nanopiezotronics. *Advanced Materials*, 19(6), 889-892. <https://doi.org/10.1002/adma.200602918>
- WEI, W., Y DAI, H. (2021). Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: Recent advances and challenges. En *Bioactive Materials* 6(12), 4830-4855. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.011>
- WEI, Y., ZHANG, X., SONG, Y., HAN, B., HU, X., WANG, X., LIN, Y., Y DENG, X. (2011). Magnetic biodegradable Fe₃O₄/CS/PVA nanofibrous membranes for bone regeneration. *Biomedical Materials*, 6(5). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/6/5/055008>

- XIA, Y., CHEN, H., ZHANG, F., WANG, L., CHEN, B., REYNOLDS, M. A., MA, J., SCHNEIDER, A., GU, N., Y XU, H. H. K. (2018). Injectable calcium phosphate scaffold with iron oxide nanoparticles to enhance osteogenesis via dental pulp stem cells. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup1), 423-433. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1428813>
- XUE, P., BAO, J., CHUAH, Y. J., MENON, N. V., ZHANG, Y., Y KANG, Y. (2014). Protein covalently conjugated SU-8 surface for the enhancement of mesenchymal stem cell adhesion and proliferation. *Langmuir*, 30(11), 3110-3117. <https://doi.org/10.1021/la500048z>
- ZHOU, Z., QIAN, D., Y MINARY-JOLANDAN, M. (2016). Molecular Mechanism of Polarization and Piezoelectric Effect in Super-Twisted Collagen. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2(6), 929-936. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00021>

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}

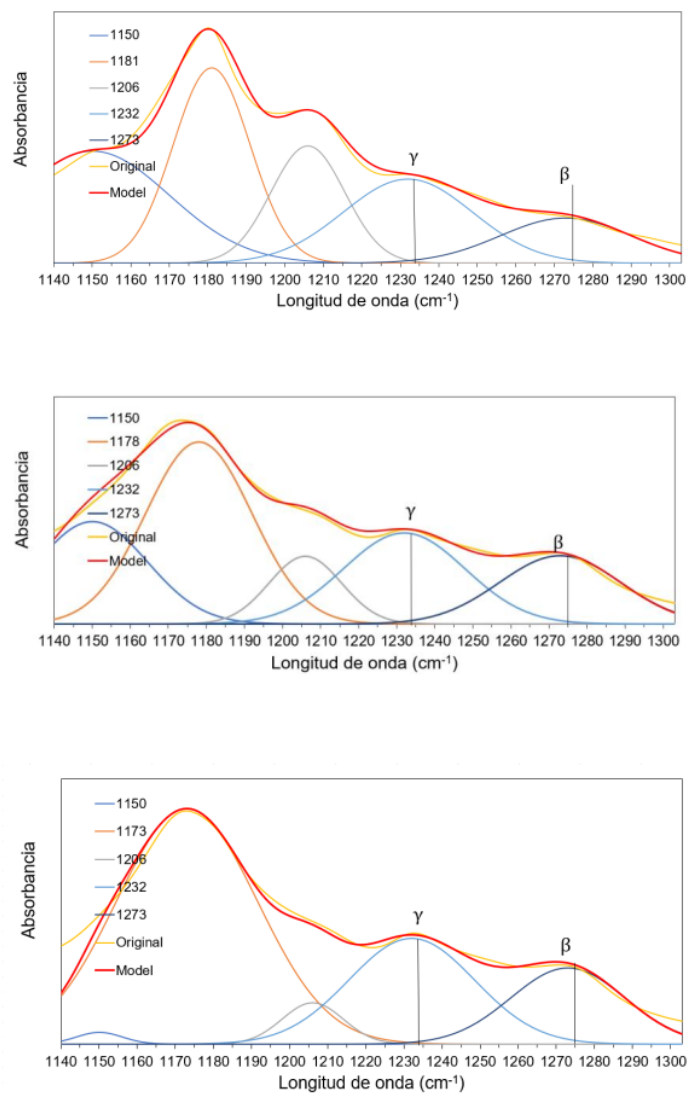


Figura S1. Deconvolución de los espectros FTIR de membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE) entre 1140 y 1300 cm^{-1} . a) Deconvolución de PVDF b) Deconvolución de PVDF-CFO. c) Deconvolución de PVDF-FE. Los 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

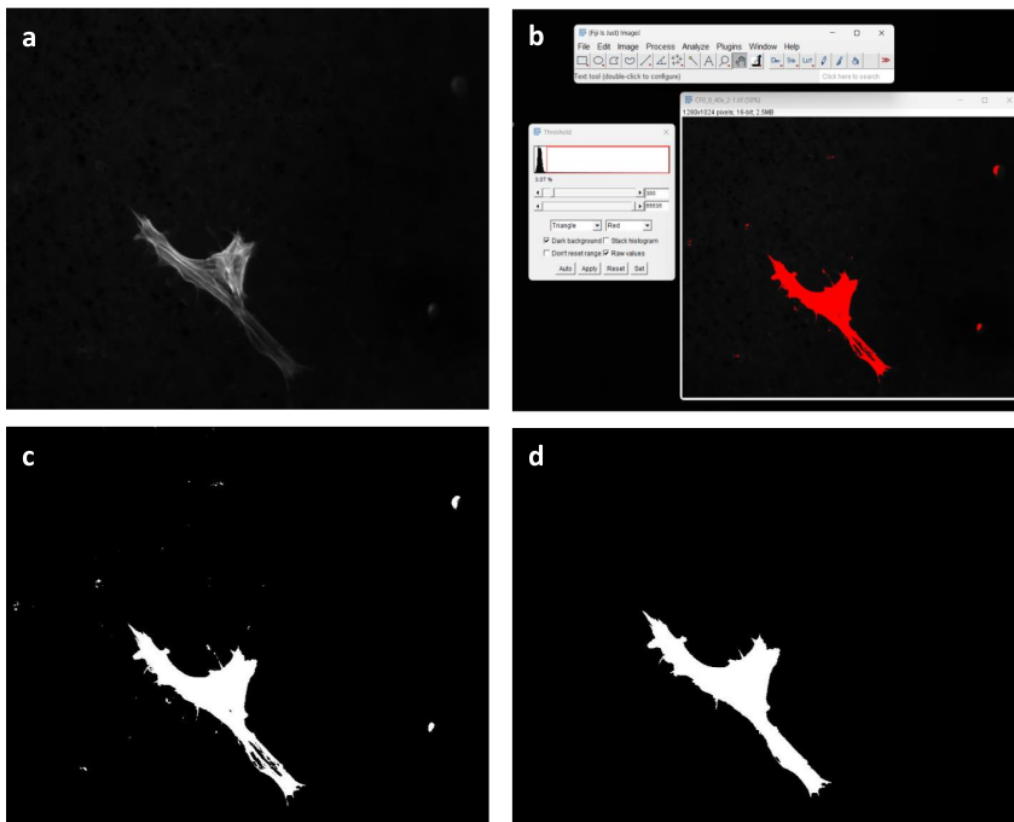


Figura S2. Ejemplificación de la obtención de máscaras binarias de las células a partir del citoesqueleto de actina de una célula de poli(fluoruro de vinilideno) con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y su limpieza para poder obtener después las medidas morfométricas. a) Imagen del citoesqueleto de actina 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

```

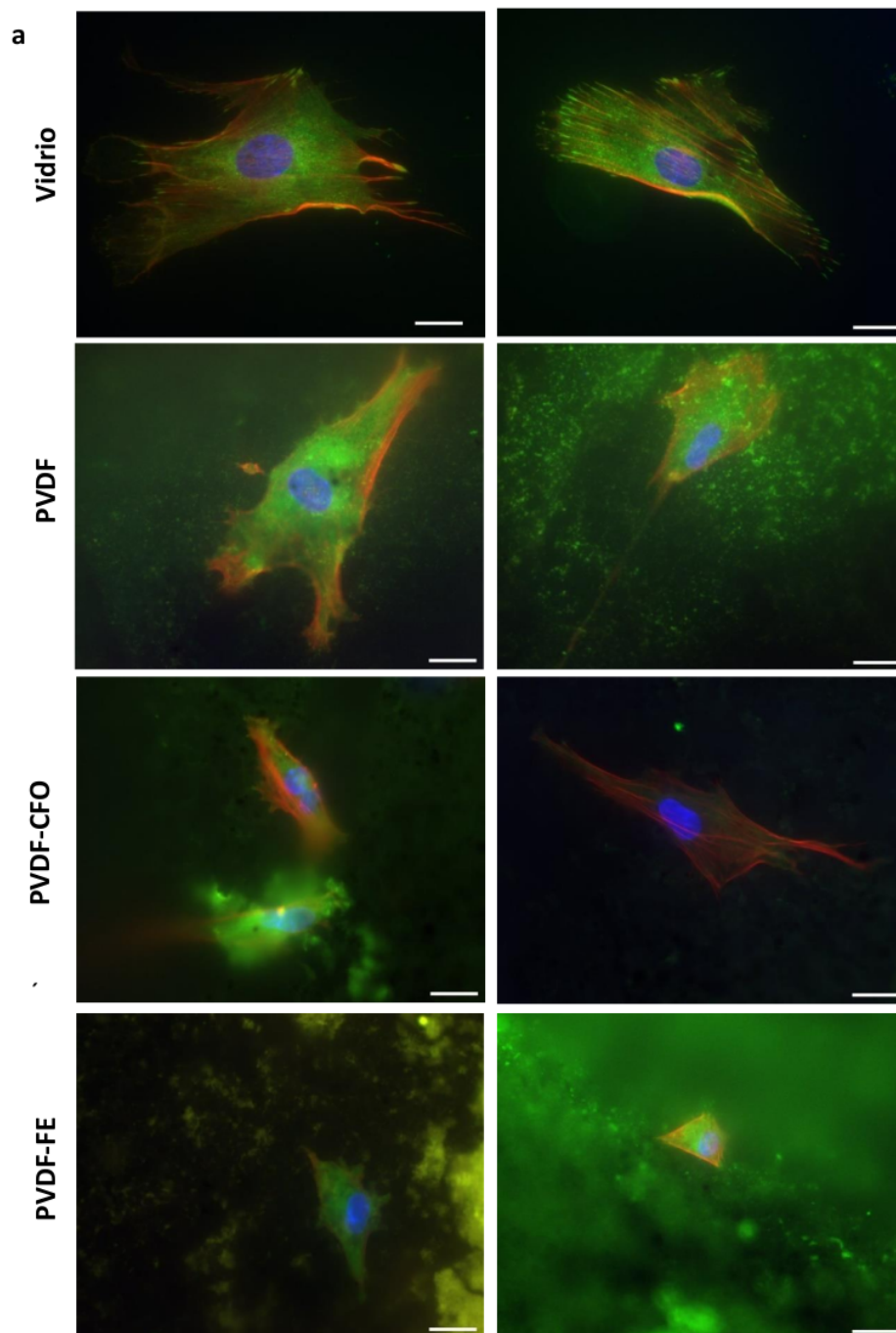
1 //Definimos las medidas que vamos a tomar en las células después
2 run("Set Measurements...", "area shape display redirect=None decimal=3");
3
4 //Activamos la opción fondo negro
5 run("Options...", "iterations=1 count=1 black do=Nothing");
6
7 //Abrimos la carpeta con las imagenes
8 dir=getDirectory("Choose 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 células de cada imagen, filtrando el tamaño del área (Área>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");

```

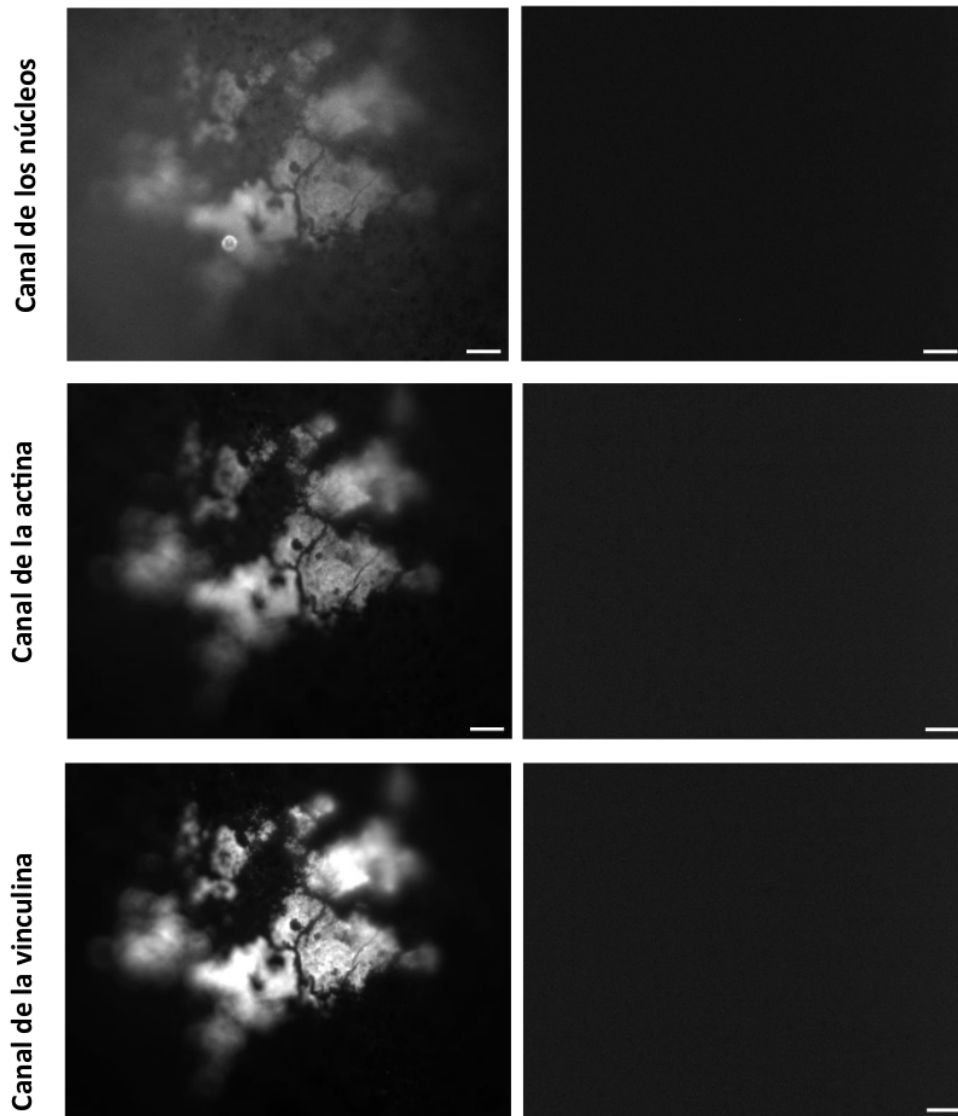
Figura S3. Macros utilizadas para procesar automáticamente las imágenes de inmunofluorescencia. a) Macro desarrollado para segmentar las imágenes de los núcleos de las células. Se utilizó el autoumbrales "Li dark", comprobando previamente que era adecuado para todos los núcleos. b) Macro desarrollado para los parámetros morfológicos del citoplasma de las células, a partir de imágenes del citoesqueleto. El tamaño utilizado como filtro (300 μm^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).



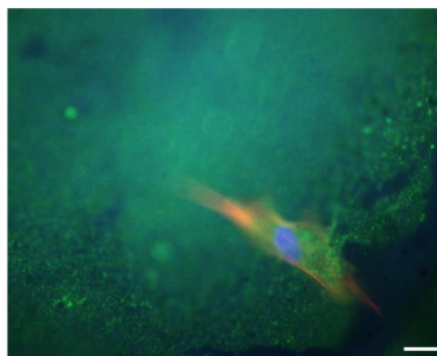
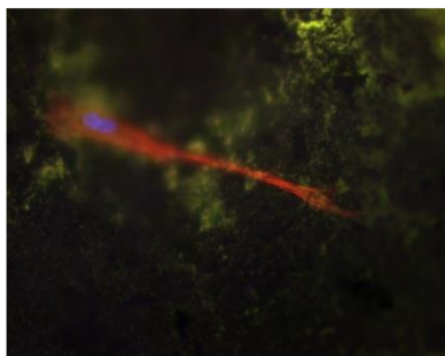
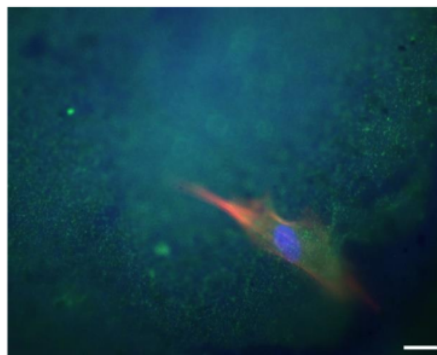
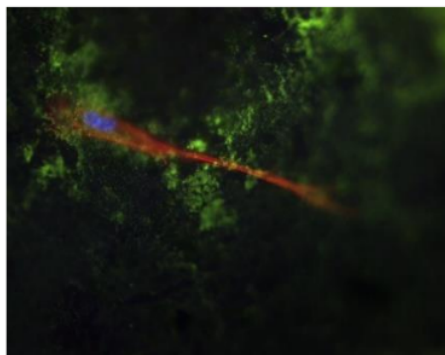
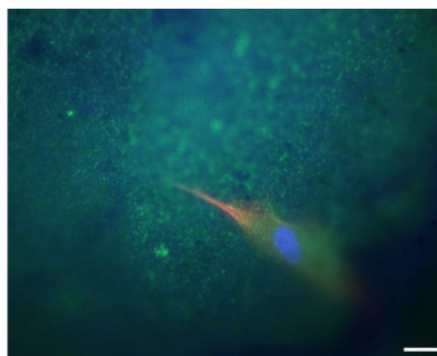
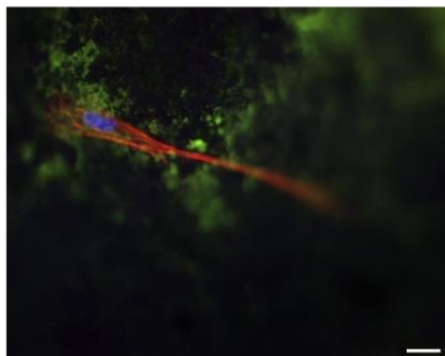
b



c

PVDF-CFO

PVDF-FE



d

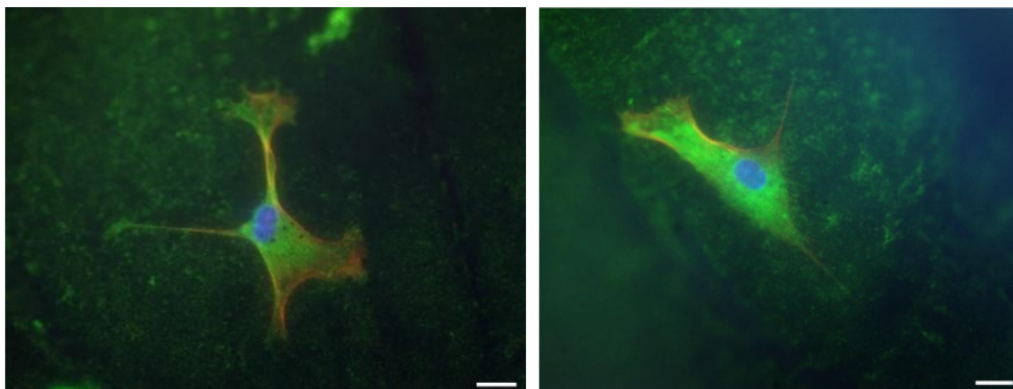


Figura S4. Imágenes de inmunofluorescencia de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) en vidrio, en membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE), procesadas mediante el programa de análisis de imagen Fiji. 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

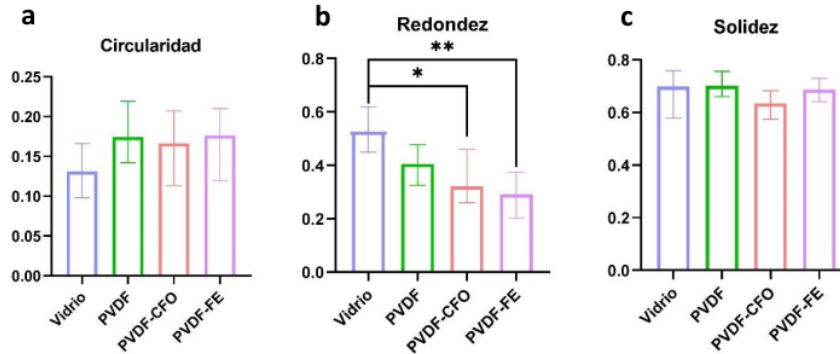


Figura 55. Histograma de la circularidad, redondez y solidez de la adhesión inicial a las 24 horas de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) en vidrio, en membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE). a) 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

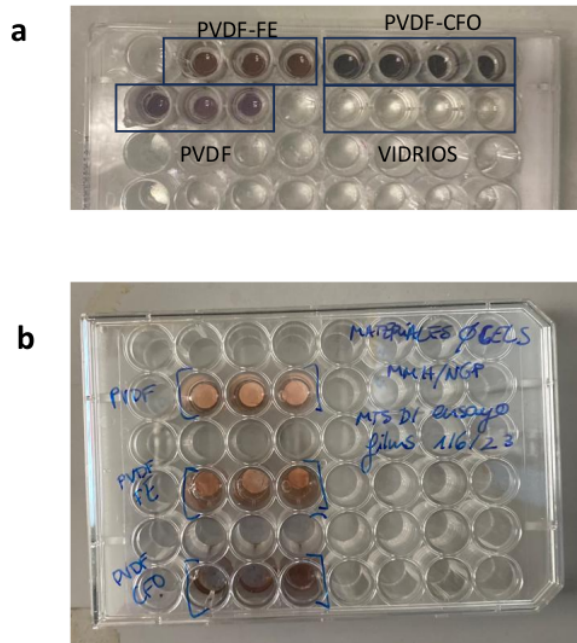


Figura S6. Placas utilizadas del ensayo MTS a día 1 con las membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO), de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE) y con los vidrios. a) Placa con 48 pocillos después del ensayo MTS a día 1 con PVDF, PVDF-CFO, PVDF-FE y 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

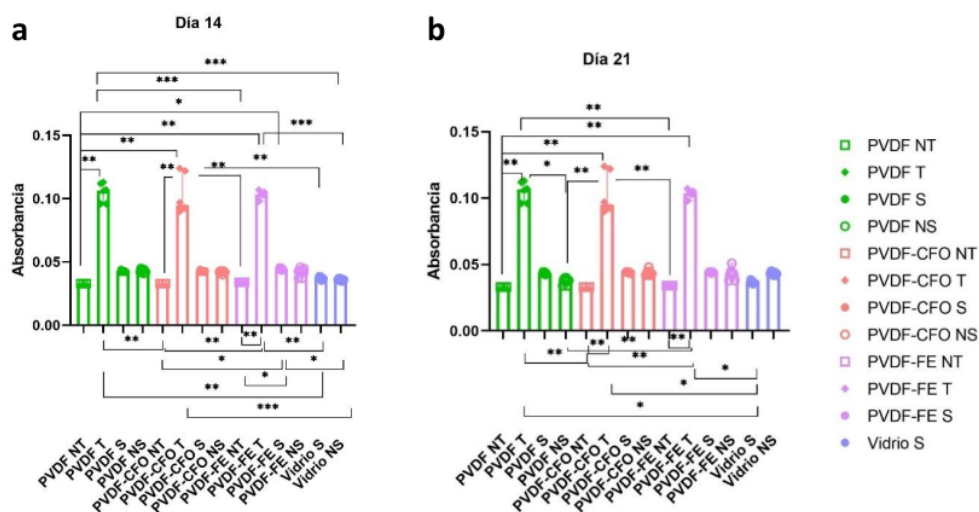


Figura S7. Histograma de la detección de la tinción rojo alizarina a días 14 y 21. Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) se cultivaron en vidrios, membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), de PVDF con ferritas de cobalto (PVDF-CFO) y de PVDF con magnetitas de hierro (PVDF-FE). Las células 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.

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

hdl.handle.net

Fuente de Internet

2%

2

Irene Lara Sáez. "Evaluación biológica de nuevos recubrimientos osteoinductores sintetizados vía sol-gel para aplicación en implantología dental.", 'Universitat Politecnica de Valencia', 2015

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Activo

Excluir bibliografía

Activo

Excluir coincidencias < 70 words