

Resumen

El aumento de la esperanza de vida conlleva la presencia de una población cada vez más envejecida en la que a menudo aparecen problemas musculoesqueléticos que suponen un fuerte impacto en la calidad de vida de los pacientes. La búsqueda de nuevas terapias regenerativas óseas pone el foco en el uso de las células madre mesenquimales, MSCs por sus siglas en inglés, encargadas de la regeneración del tejido *in vivo*. Las MSCs son fáciles de obtener, presentan propiedades inmunomoduladoras y además son capaces de diferenciarse hacia células óseas. Estas características las hacen idóneas para su uso en terapias regenerativas. A lo largo de los años se ha demostrado que la inducción de un fenotipo prediferenciado *in vitro*, previo a la implantación de las MSCs, resulta en una mejor capacidad de regeneración del tejido óseo. Por eso, habitualmente, se han empleado métodos bioquímicos basados en el uso de medios de diferenciación osteogénica que contienen dexametasona. Estos métodos son poco eficientes y pueden inducir a la aparición de células adipogénicas, por lo que el uso de métodos físicos como alternativa está adquiriendo relevancia.

El hueso es un tejido con propiedades piezoeléctricas debido a las fibras de colágeno que forman parte de su matriz extracelular. Este estímulo ha sido relacionado con su capacidad de responder al estrés mecánico y autoregenerarse, donde juegan un papel importante las MSCs. Éstas se encuentran en un entorno electroactivo, y son precisamente estas señales físicas las que pueden influir en su proceso de diferenciación osteogénica pudiendo ser empleadas para su prediferenciación *in vitro* de forma efectiva. Para comprobar esta hipótesis, en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han diseñado soportes de cultivo piezoeléctricos en 2 y 3 dimensiones basados en el uso del polímero piezoeléctrico polifluoruro de vinilideno (PVDF) combinados con partículas magnetostrictivas de ferrita de cobalto (CFO). Esta combinación permite la estimulación de los soportes de cultivo aplicando un campo magnético con un biorreactor. Este campo magnético genera la deformación del componente magnetostrictivo, que es transmitida a la matriz polimérica, deformándola y generando un campo eléctrico. Ésta última es transmitida a las células cultivadas en estos soportes para estudiar su efecto sobre la diferenciación osteogénica.

En el primer capítulo experimental se desarrollaron y caracterizaron membranas electroactivas de PVDF fabricadas por el método de separación de fases inducida por no-solventes (NIPS). Se empleó etanol como no-solvente, lo que dio lugar a membranas homogéneas altamente porosas. Estos soportes de cultivo cristalizan en fase γ , una de las fases electroactivas del PVDF. Su alta porosidad e hidrofobicidad hizo necesaria la optimización de un recubrimiento basado en la técnica capa a capa (LbL), empleando recombinámeros similares a la elastina (ELRs) que contenían secuencias de adhesión celular RGD. Tras la optimización del protocolo de recubrimiento, se estudió la respuesta celular inicial de las MSCs y se comparó con los mismos soportes recubiertos únicamente con fibronectina adsorbida. Los resultados revelaron que la presencia de los ELRs es necesaria para promover la adhesión inicial de las MSCs en este tipo de soportes.

En el segundo capítulo se desarrollaron membranas electroactivas de PVDF combinadas con CFO, empleado el mismo método de fabricación que en el capítulo anterior, pero usando agua como no-solvente. En este caso las membranas presentaban una estructura no simétrica, con una superficie lisa, que fue empleada para cultivo celular, y otra porosa, así como diversas fases cristalinas, pero con una mayoría en fase β , la más electroactiva. La técnica permitió la incorporación efectiva de las nanopartículas. Se recubrieron las membranas mediante LbL con colágeno tipo I y heparina, creando un entorno biomimético para las MSCs. Se realizó un injerto inicial de grupos amina en la superficie mediante un tratamiento alcalino que permitió unir la primera capa del LbL. Una vez caracterizado el recubrimiento se estudió el comportamiento de las MSCs, revelando que el recubrimiento mediante LbL resultaba esencial para la proliferación celular en el caso de las membranas que contenían nanopartículas magnéticas.

La elevada porosidad de las membranas producidas afecta a nivel biológico a la adhesión de las MSCs y a nivel físico al proceso de polarización de los soportes de cultivo, imprescindible para obtener la máxima respuesta piezoeléctrica. Por ello, en el capítulo experimental tres se desarrollaron nuevos materiales más finos y planos, que facilitasen tanto su polarización como la adhesión celular inicial. Para ello se produjeron films de PVDF y PVDF-CFO cristalizados en presencia del líquido iónico [Bmim][Cl]. La presencia de éste indujo la nucleación del PVDF en fase β en los films, a pesar de ser obtenidos desde fundido, lo cual suele generar fase α , no electroactiva. El líquido iónico fue eliminado una vez producida la cristalización y se estudió la respuesta inicial de las MSC, revelando la no citotoxicidad de los films y la capacidad de las células para adherirse y proliferar. Se seleccionó un medio de cultivo mixto (1:1 medio osteogénico y adipogénico) para los experimentos de estimulación, basado en el análisis de las adhesiones focales. Se realizaron ensayos de estimulación piezoeléctrica empleando un biorreactor magnético y el medio seleccionado. Las MSCs respondieron a la estimulación incrementando la longitud de sus adhesiones focales, así como reduciendo la presencia de vimentina en el citoplasma.

Por último, se diseñaron soportes de cultivo piezoeléctricos en 3D. Para ello se desarrollaron microesferas de PVDF y PVDF-CFO mediante la técnica de electropulverizado. Esta técnica permitió obtener microesferas de entre 1 y 2 μm de diámetro, en fase β y con la correcta incorporación de la ferrita de cobalto. Las microesferas se encapsularon en hidrogeles de gelatina junto con las MSCs para crear un entorno tridimensional biomimético. Esta aproximación no resultó citotóxica para las células, que, además, tras 14 días presentaban una morfología completamente extendida, característica de este tipo celular. Estos soportes de cultivo se estimularon empleando el biorreactor magnético, en combinación con medio de cultivo osteogénico. Tras 7 días, se observó un incremento en la expresión del factor de transcripción RUNX2 en las muestras estimuladas, eje central de la ruta de señalización osteogénica, demostrando que la estimulación piezoeléctrica es capaz de activar en mayor medida la diferenciación de las MSCs.

En resumen, se han desarrollado y funcionalizado plataformas de cultivo electroactivas en 2D y 3D para la estimulación piezoeléctrica de las MSCs, demostrando que, efectivamente, estas células son capaces de responder a este estímulo físico.