



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Curso 2019/20

Recubrimiento de membranas de PVDF utilizando recombinámeros tipo elastina, ELRs, para diferenciación osteogénica

Autor: Paula Pastor Calvo

Tutor/es: Dra. Mercedes Santos

Dr. F. Javier Arias

Índice

1. Resumen y abstract	1
2. Introducción	3
2.1. Evolución de los Biomateriales	3
2.2. Biomateriales: concepto, aplicaciones y propiedades	4
2.3. Biocompatibilización de implantes (Influencia de la química de las superficies en la biocompatibilidad de implantes)	6
2.4. Elastina y polímeros tipo elastina (ELPs)	7
2.5. Recombinámeros Tipo Elastina (“Elastin Like Recombinamers”)(ELRs)	8
2.6. Química “click”	11
2.7. Biofuncionalización de superficies	15
2.7.1. Ensamblaje LbL por inmersión	17
3. Objetivos y justificación	17
4. Materiales y métodos	18
4.1. Materiales	18
4.1.1. Reactivos químicos y disolventes	18
4.1.2. Técnicas empleadas	19
4.3. Métodos	29
4.3.1. Modificación química de ELRs	29
4.3.2. Recubrimiento LbL de superficies porosas de PVDF (Fluoruro de Polivinilideno).	31
5. Resultados y discusión	32
5.1. Modificación química de los ELRs	33
5.1.1. Modificación química de HRGD6 con los grupos azido y ciclooctino	33
5.1.2. Caracterización de HRGD-N ₃	34
5.1.3. Caracterización de HRGD-ciclooctino	38
5.2. Recubrimiento de las membranas porosas de PVDF	41

5.2.1.	Optimización de recubrimiento de membranas porosas de PVDF.....	41
5.2.2.	Protocolo de recubrimiento de las membranas	42
5.2.3.	Caracterización de membranas piezoeléctricas porosas recubiertas.....	43
6.	Estudio bibliográfico.....	46
6.1.	Influencia del motivo peptídico RGD en la diferenciación osteogénica de células mesenquimales	46
6.1.1.	La célula.....	46
6.1.2.	Rutas de señalización celular implicadas en la diferenciación celular.....	48
6.1.3.	Tejido óseo	52
6.1.4.	Influencia del motivo peptídico RGD en la diferenciación de células mesenquimales	56
7.	Conclusiones.....	61
8.	Bibliografía	62

1. Resumen y abstract

Resumen

En este Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo el recubrimiento de membranas porosas piezoeléctricas de fluoruro de polivinilideno, PVDF, con recombinámeros tipo elastina, ELRs, mediante la metodología Layer-by-layer, LbL, y utilizando una reacción “click” como la cicloadición 1,3-dipolar entre una azida y un alquino para el entrecruzamiento de dichas capas. Estas membranas recubiertas de esta manera con ELRs portadores del dominio peptídico de adhesión RGD (arginina-glicina-aspártico) estarían destinadas a un posterior estudio “in vitro” de la influencia de este dominio en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (CMM).

La situación extraordinaria generada por la COVID-19 no hizo posible terminar la experimentación, motivo por el cual se ha completado con un estudio bibliográfico de los antecedentes existentes en la bibliografía sobre la influencia del dominio RGD en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales, CMMs.

Así, en este TFG se ha realizado la modificación química de un biopolímero ELR como el HRGD6, introduciendo en él los grupos azido, RGD-N₃, y, de manera paralela y para el mismo HRGD6, introduciendo grupos ciclooctino, RGD-ciclo. Además, se ha realizado su posterior caracterización, observándose una elevada eficacia y rendimiento de la reacción. Asimismo, se recubrieron superficies de PVDF mediante metodología Layer by Layer de inmersión de doble capa, utilizando las condiciones previamente optimizadas en un trabajo anterior; reforzando la unión entre las capas mediante una reacción de cicloadición [3+2] azida-ciclooctino promovida por la tensión angular. Gracias a técnicas como FTIR, y mediante la variación de peso y medida del ángulo de contacto se comprobó la efectividad del recubrimiento. En FTIR aparecieron señales de los grupos característicos de los polímeros utilizados como los grupos C=O amídicos o los grupos N-H amídicos. En cuanto a las medidas del ángulo de contacto, se observa la disminución de los ángulos en las membranas recubiertas como resultado del aumento de la hidrofiliidad de la superficie. Por último, se ha realizado un estudio teórico acerca de la influencia del motivo RGD en la diferenciación de células madre mesenquimales, confirmando la influencia activa de este motivo en la adhesión y diferenciación. A través de las conclusiones extraídas de los resultados experimentales y el estudio teórico se puede afirmar el enorme potencial de los ELRs con secuencias de adhesión celular en Ingeniería de Tejidos como biomateriales de gran aplicabilidad en biomedicina.

Abstract

In this End-of-Degree Project, the coating of piezoelectric porous membranes of polyvinylidene fluoride, PVDF, with recombinant elastin-like membranes, ELRs, has been carried out by means of the Layer-by-layer methodology, LbL, and using a "click" reaction such as the 1.3-dipolar cycloaddition between an azide and an alkyne for the crosslinking of such layers. These membranes coated in this way with ELRs carrying RGD peptide domain of adhesion (arginine-glycin-aspartate) would be intended for a subsequent in vitro study of the influence of this domain on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs).

The extraordinary situation generated by the COVID-19 did not make possible to complete the experimentation, which has been completed with a bibliographic study of the existing background in the literature on the influence of the RGD domain on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, MSCs.

Thus, in this TFG the chemical modification of an ELR biopolymer such as HRGD6 has been carried out, introducing azide groups, RGD-N₃, and, in parallel and for the same HRGD6, introducing cyclooctyne groups, RGD-cycle. In addition, their subsequent characterization has been carried out, and a high efficiency and performance of the reaction has been observed. Likewise, PVDF surfaces were coated by means of a double layer immersion Layer by Layer methodology, using the conditions previously optimized in a previous work; reinforcing the union between the layers by means of a cycloaddition [3+2] azide-cyclooctyne reaction promoted by angular tension. Thanks to techniques such as FTIR, and by means of weight variation and contact angle measurement, the effectiveness of the coating was proven. In FTIR, signals of the characteristic groups of the used polymers such as C=O-amide groups or N-H-amide groups appeared. Regarding the contact angle measurements, the decrease of the angles in the coated membranes is observed as a result of the increase of surface hydrophilicity. Finally, a theoretical study has been carried out about the influence of the RGD motif on the differentiation of mesenchymal stem cells, confirming the active influence of this domain on adhesion and differentiation. Through the conclusions drawn from the experimental results and the theoretical study, the enormous potential of ELRs with cell adhesion sequences in Tissue Engineering as biomaterials of great applicability in biomedicine can be affirmed.

2. Introducción

2.1. Evolución de los Biomateriales

Los dispositivos protésicos y los diferentes biomateriales comenzaron a ser utilizados por los seres humanos hace miles de años, sufriendo a lo largo de la historia numerosos giros y cambios en su utilidad en paralelo al desarrollo de la ciencia médica(1).

Es difícil establecer la evidencia más temprana de su empleo en la sociedad, pero se sabe que pueblos como la antigua Fenicia, el antiguo Egipto o la civilización Maya han construido articulaciones de cuero, madera, hierro, etc.; prótesis oculares de vidrio e implantes dentales de metales o nácar. Todo ello tenía el objetivo de una mejora de la integración social y pública de las personas con algún tipo de minusvalía o lesión. Tanto la construcción protésica y su implantación como su éxito, están directamente relacionados con la práctica médica temprana y su evolución, hasta el punto de que muchos de los diseños de los dispositivos primitivos se siguen utilizando hoy en día(1)(2)(3).

A finales del siglo XIX aparecieron los primeros polímeros sintéticos y, con ellos, emergió una nueva ciencia en la que se comenzaron a emplear estos nuevos materiales de forma muy rápida, ya que poseían características adecuadas para su aplicación biomédica. Por ejemplo, se han utilizado polímeros sintéticos como el polimetilmetacrilato, acetato de celulosa o Dacron para usos médicos en tubos de diálisis, injertos vasculares o como prótesis complejas. Aunque los materiales anteriores tenían enormes ventajas para los usuarios y permitían avances en tratamientos novedosos, existía un problema relativamente oculto al que no se ponía solución; el rechazo del cuerpo extraño debido a la interacción célula-polímero que daba lugar a procesos como la inflamación, movilidad aséptica, formación de biofilms bacterianos o la encapsulación del implante(2)(3).

A finales del siglo XX se produjo un creciente interés por los biomateriales debido principalmente a dos factores: el gran número de personas que necesitan una prótesis y, otro factor que está directamente relacionado con el anterior, el aumento pronunciado de la esperanza de vida. La longevidad masiva supone implicaciones relacionadas con el mantenimiento de la calidad de vida de las personas durante el máximo tiempo posible y la medicina ha evolucionado, y deberá seguir haciéndolo, para crear implantes biomédicos cada vez mejores, con un aumento de su biocompatibilidad, adaptada biodegradación y adecuadas propiedades mecánicas(2)(3).

Hoy en día se sigue en una búsqueda incesante de nuevos materiales que supongan una mejora en los parámetros específicos, o con nuevas propiedades para perfeccionar diferentes y mayores prestaciones. A raíz del descubrimiento y conocimiento de la interacción de los materiales con la matriz extracelular, con procesos tales como la señalización o el desarrollo celular, se han comenzado a diseñar biomateriales mucho más avanzados a los que se les ha ido añadiendo funcionalidades que permiten interacciones específicas con la superficie

celular. Asimismo, se han desarrollado biomateriales cuyas propiedades pueden ser controladas y variadas según las necesidades, es decir, los llamados “materiales inteligentes” capaces de auto-repararse o adaptarse de manera autónoma a diferentes condiciones ambientales. Por todo ello, muchos de los biomateriales que se sintetizan en la actualidad tienen un objetivo de aplicación muy concreto en el campo de la sanidad(2)(3).

2.2. Biomateriales: concepto, aplicaciones y propiedades

Un biomaterial puede definirse como cualquier material utilizado en la fabricación de dispositivos para reemplazar una parte o una función del cuerpo de manera segura, fiable, económica y fisiológicamente compatible, manteniéndose en contacto íntimo con el tejido vivo. El objetivo final del uso de estos biomateriales es mejorar la salud humana, restaurando la función de los tejidos y órganos del cuerpo; por esta razón, es necesario comprender las relaciones entre las propiedades, funciones y estructuras de los materiales biológicos. De este modo, se plantean tres aspectos clave en el estudio de los biomateriales: materiales biológicos, materiales biosintéticos y la interacción de ambos con el cuerpo, es decir, con las células y la matriz extracelular(4).

El éxito de un biomaterial o un implante depende en gran medida de tres factores principales: las propiedades y biocompatibilidad del implante (*Figura 1*), el estado de salud del receptor y la competencia del cirujano que los implanta y controla su progreso. Los requisitos de un biomaterial son, por lo tanto(4):

- 1- Biocompatibilidad
- 2- Aceptabilidad farmacológica: Baja toxicidad, no alergénico, no inmunogénico, no carcinogénico, etc.
- 3- Químicamente inerte y estable.
- 4- Adecuada resistencia mecánica.
- 5- Adecuada resistencia en el tiempo.
- 6- Peso y densidad adecuados
- 7- Relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para la producción a gran escala.

La **biocompatibilidad** es un término que deriva del prefijo bio- (del griego “vida, ser vivo”) y de la palabra compatibilidad (“capacidad de estar con”) y se puede definir como la capacidad del material para funcionar con una “respuesta adecuada del huésped” en una aplicación específica. La definición anterior se refiere a “una aplicación específica” ya que la biocompatibilidad es contextual. Así, un biomaterial puede ser biocompatible en hueso, pero no en la sangre y/o viceversa, o puede ser biocompatible para su empleo a corto plazo en un tejido específico, pero no en una aplicación a largo plazo en ese mismo tejido(5).

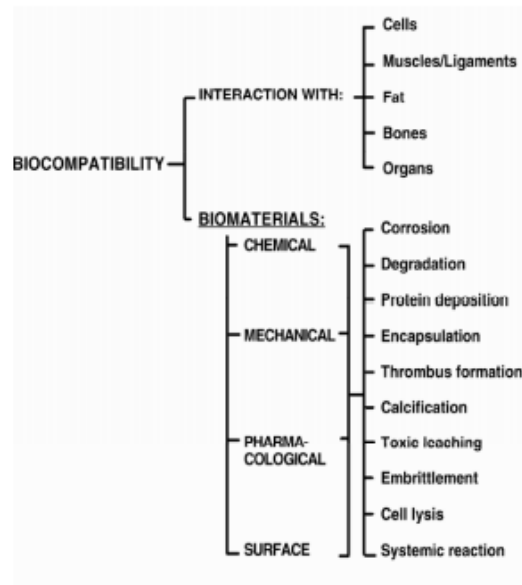


Figura 1: Ilustración esquemática de los aspectos que comprende la biocompatibilidad.

Entre las propiedades que debe presentar un biomaterial cabe resaltar asimismo su **biodegradabilidad**, es decir, el material se debe degradar produciendo sustancias no tóxicas que serán absorbidas por el organismo, de manera que garanticen de forma plena las prestaciones del material exactamente el tiempo necesario, ya sea en un implante provisional o definitivo(2).

Las características finales de un biomaterial son función de su forma, estructura, composición y estabilidad a lo largo del tiempo; así como de sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas. Además, algunas de estas características, como el grado de biocompatibilidad, dependerán de la localización en el organismo y del tipo de aplicaciones como ya hemos mencionado anteriormente(4).

Los cuatro grandes grupos de materiales sintéticos utilizados en implantación son: polímeros, metales, cerámicas y composites. Cada grupo posee ciertas ventajas e inconvenientes dependientes de sus características particulares tales como resistencia, biocompatibilidad, facilidad de fabricación o fortaleza(4).

Finalmente, dentro de la ciencia de los biomateriales cabe destacar el ámbito de la nanotecnología ya que evoluciona rápidamente e implica materiales a una escala de tamaño de 100 nm o menos. Debido a esta razón se pueden desarrollar nuevas áreas de aplicación de los biomateriales empleando dispositivos y materiales a nanoescala. Tal es el caso de las técnicas de encapsulación de fármacos en el interior de micro- y nanoesferas, utilizadas como nuevos métodos de administración controlada e incluso dirigidas de fármacos(4).

2.3. Biocompatibilización de implantes (Influencia de la química de las superficies en la biocompatibilidad de implantes)

Los biomateriales que más se emplean como implantes son, en su mayoría, hidrofóbicos y tienen una gran afinidad por una amplia variedad de proteínas. Poco después de su implantación, los biomateriales se cubren con una capa de proteínas plasmáticas, predominantemente albúmina, fibrinógeno, IgG, fibronectina y factor Von Willebrand. Estas proteínas son adsorbidas, posiblemente, a través de interacciones hidrofóbicas de sus dominios más hidrofóbicos que se vuelven muy adherentes a las superficies de los biomateriales. Se cree que los cambios conformacionales de la proteína adsorbida son responsables de iniciar reacciones adversas en el cuerpo como la inflamación, la coagulación y la respuesta a cuerpos extraños. Estas interacciones proteína-biomaterial provocan la exposición de estructuras y secuencias proteicas, que no estaban expuestas antes de la adsorción, que sirven como sitios receptores de las células inflamatorias, que iniciarán posteriormente las reacciones derivadas de cuerpos extraños(6).

Aunque no se comprende totalmente la influencia de las propiedades de la superficie de los biomateriales en las respuestas posteriores de los tejidos, está ampliamente demostrado que las propiedades de la superficie de los polímeros pueden afectar a las cantidades y tipos de proteínas de unión, así como a la conformación, orientación o fuerza de unión de la proteína adsorbida. Las proteínas adsorbidas pueden mantener la misma estructura en su forma libre o pueden reajustarse conformacionalmente en respuesta debido al nuevo ambiente. Se cree que este reajuste conformacional dependiente del tiempo afecta a las respuestas celulares y a las subsiguientes reacciones de los tejidos. Se sabe que este grado de alteración de la estructura secundaria depende de las propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas de las superficies(6).

En la búsqueda de superficies "perfectas", los científicos especializados en biomateriales han estudiado su comportamiento en relación con las características de sus superficies, modificando sus propiedades superficiales mediante numerosas técnicas que incluyen modificaciones físicas, modificaciones químicas e incluso radiación. En general, se ha demostrado que la modificación de las propiedades de la superficie de los materiales (incluidas las químicas, la humectabilidad y la morfología) influye en la adsorción de proteínas y en las consiguientes respuestas celulares a los biomateriales in vitro e in vivo. Lamentablemente, debido a la falta de tecnología que permita la caracterización de las superficies, los primeros estudios que se realizaron no permitieron comprender correctamente la influencia de las propiedades de la superficie en la patogénesis que se desarrolla debido a la presencia de cuerpos extraños. Para crear superficies homogéneas y bien definidas, se han desarrollado y utilizado en muchos estudios recientes técnicas de monocapa autoensamblada(7)(8)(9), modificación química mediante injertos(10) y técnicas

de modificación con plasma(11)(12); presentando cada método diferentes ventajas e inconvenientes(6).

Por lo que respecta a la modificación química mediante injertos para recubrir la superficie del biomaterial, el método suele implicar la conjugación covalente de una proteína o un monómero proteico a la superficie. El proceso requiere de la activación de la superficie con grupos reactivos, seguido del injerto de la funcionalidad deseada sobre la superficie y la posterior unión mediante enlace químico de la proteína. La unión covalente a la superficie evita los inconvenientes del desprendimiento de la proteína/monómero y garantiza el recubrimiento, proporcionando estabilidad a largo plazo. Los métodos de activación incluyen reacciones químicas, UV, exposición a la radiación, plasma y exposición al ozono(7). Uno de los inconvenientes destacables dentro de esta tecnología se basa en la pérdida de movilidad de la proteína al unirse a la superficie y, posiblemente, la presentación de la proteína en una conformación desconocida(6).

Por lo que respecta al recubrimiento de superficies mediante técnicas de adsorción física, este procedimiento suele implicar el recubrimiento de un material mediante su inmersión en una disolución con el objetivo de formar una película sobre su superficie que posea las características adecuadas. Los inconvenientes que suele plantear este método son problemas de unión entre los materiales, así como inestabilidad de la inmovilización cuando se utilizan proteínas(6).

La modificación de superficies mediante radiación incluye principalmente la activación mediante plasma. El plasma puede considerarse como el cuarto estado de la materia y está compuesto por especies atómicas, moleculares, iónicas y radicales altamente excitadas. Se obtiene cuando los gases son excitados a estados energéticos más elevados en energía por medio de radiofrecuencia, microondas o electrones a través de una descarga a un filamento incandescente. El proceso proporciona la funcionalidad necesaria a una superficie de una forma económica y efectiva, y es compatible con la mayoría de los materiales que se están investigando actualmente en medicina, incluyendo metales, polímeros y cerámicas. Uno de los grandes beneficios de la modificación mediante plasma es la capacidad de alterar uniformemente las superficies, independientemente de la geometría de éstas, lo que permite la modificación tanto de micro y nanopartículas, como de películas o componentes tridimensionales especialmente requeridos en la ingeniería de tejidos. Además, el uso de plasmas pulsados, en lugar del modo operacional de onda continua convencional, proporciona un nivel excepcionalmente alto de control de la química de la película durante el proceso de revestimiento(13)(14)(15)(16).

2.4. Elastina y polímeros tipo elastina (ELPs)

La elastina es una de las proteínas más importantes que constituyen la matriz extracelular (MEC) (*Figura 2*). Una de sus características principales es que es una proteína polimérica auto-ensamblable y muy insoluble. Su función principal es proporcionar elasticidad a los tejidos,

aunque su función biológica no se limita únicamente a esta tarea, sino que juega un papel activo en la modulación del comportamiento celular y en impulsar la reparación de los tejidos. El papel de la elastina en la MEC ha suscitado un enorme interés en aplicaciones biológicas como la administración controlada de medicamentos y la ingeniería de tejidos. Además, se estima que posee una vida media de unos 70 años. Esta proteína se encuentra predominantemente en el tejido conectivo de arterias, piel, pulmón y ligamentos. La tropoelastina, el precursor soluble de la elastina se compone de dominios alternados hidrofóbicos e hidrofílicos capaces de proporcionar su entrecruzamiento. Una vez secretada al espacio extracelular, la tropoelastina se reticula enzimáticamente a través de sus residuos de lisina, creando fibrillas de elastina insoluble(17)(18)(2).

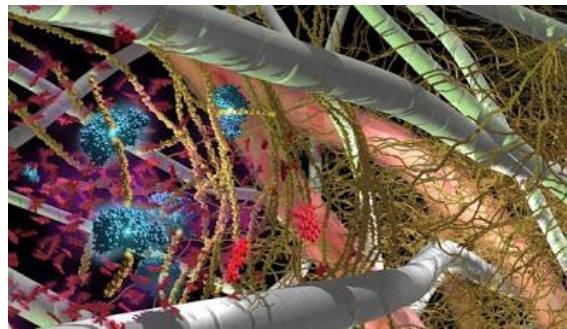


Figura 2: Matriz extracelular(19).

La secuencia primaria de la elastina está formada por regiones gobernadas por diferentes motivos repetidos, como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG (denominados *dominios elastoméricos*), cuya estructura les permite experimentar una alta deformación sin romperse y volver a su conformación original una vez que la tensión desaparece. Este proceso ocurre además sin pérdida de energía y, como resultado de este mecanismo, las fibras elásticas son capaces de sufrir más de mil millones de ciclos de estiramiento-relajación sin sufrir daños. Además, presentan zonas donde predomina la secuencia VPGKG, denominados *dominios de entrecruzamiento*, que son aquellos por donde se realizan las uniones intermoleculares covalentes catalizadas por enzimas(17)(18).

Los polipéptidos tipo elastina (ELPs) son polipéptidos artificiales cuya secuencia imita los mismos dominios que encontramos en la elastina natural. El ELP más comúnmente utilizado consiste en repeticiones sucesivas del motivo (VPGXG) n donde X, denominado residuo huésped, es cualquier aminoácido que no sea la L-prolina (ya que este residuo impide la formación de la horquilla β debido a su estructura cíclica rígida), y n representa el número de repeticiones del pentapéptido en el ELP(17)(18).

2.5. Recombinómeros Tipo Elastina (“Elastin Like Recombinamers”)(ELRs)

El enorme avance en las tecnologías del ADN recombinante ha permitido que estos materiales basados en proteínas como la elastina se puedan diseñar a la medida y se produzcan con altos

rendimientos, manteniendo un estricto control sobre la complejidad de la cadena, su longitud, estequiometría y monodispersidad. De hecho, se ha acuñado un nuevo término, ELRs (Recombinámeros Tipo Elastina= “Elastin Like Recombinamers”) para diferenciar los primeros polímeros ELPs que se sintetizaban químicamente de los nuevos polímeros ELRs que se obtienen mediante técnicas recombinantes, permitiendo así realizar un control estricto no sólo de su composición sino de sus subsiguientes propiedades. La ingeniería genética nos ha permitido crear diseños avanzados de estos polímeros, capaces de llevar a cabo funciones de gran importancia tecnológica que no están presentes en organismos vivos. Debido a la amplia disponibilidad de diferentes formas de estos recombinámeros tipo elastina se han podido desarrollar una amplia gama de biomateriales que se benefician de no sólo las propiedades inherentes de la elastina, sino también de la biocompatibilidad, naturaleza inteligente y las propiedades mecánicas(18).

Las ventajas que poseen estos biopolímeros respecto a los sintetizados químicamente son(2);

- Capacidad de expresar una función o cualquier propiedad ya sea simple o compleja de la elastina natural.
- Bioproducción a bajo coste.
- Versatilidad en el diseño molecular con control absoluto de la arquitectura molecular, incluyendo ausencia de polidispersidad y azar en la síntesis.
- Producción a partir de fuentes renovables (no se emplean productos petrolíferos).
- Desde su producción hasta su eliminación son medioambientalmente limpios, cumpliendo con los principios de la Química Verde.

Los genes que codifican a los ELRs son normalmente expresados en la bacteria *Escherichia Coli* y purificados mediante varios ciclos de calentamiento y enfriamiento, seguido de centrifugación, en un proceso conocido como ciclos de transición inversa con la temperatura.

Los ELRs se basan, como se ha comentado con anterioridad, en la repetición de los motivos de péptidos cortos presentes en la tropoelastina, donde el más frecuente es la secuencia (Val-Pro-Gly-X-Gly). Este tipo de polímero posee propiedades interesantes derivadas en su mayor parte de la elastina natural, como su biocompatibilidad, excelentes propiedades mecánicas, capacidad de auto-ensamblado y su respuesta ante diferentes estímulos. Así, son capaces de responder a estímulos ambientales como el pH, la concentración de iones, la presión o la temperatura, siendo esta última la variable más estudiada. La temperatura de transición (T_t) es característica de cada polímero y por debajo de la misma las cadenas del polímero permanecen hidratadas (hidratación hidrófoba) ya que las moléculas de agua presentan estructuras tipo clatrato rodeando los residuos apolares del polímero. Por tanto, por debajo de la Temperatura de transición, la estructura de las cadenas poliméricas de los ELRs es desordenada y con forma relativamente extendida y, por tanto, los ELRs son solubles. Por otro lado, por encima de esta temperatura de transición, la cadena de los ELRs se pliega hidrofóticamente y se ensambla, agregándose las moléculas entre sí, dando lugar a una fase

separada, precipitando así los ELRs. Este proceso se produce ya que, al aumentar la temperatura, las moléculas de agua adquieren energía suficiente y, por agitación térmica, pierden la estructura tipo clatrato. En este estado las cadenas adoptan una estructura secundaria dinámica conocida como espiral β donde los grupos apolares se disponen hacia la zona exterior quedando en el interior un canal hidrofílico formado por los residuos polares de la cadena del polímero, en el interior del cual pueden quedar retenidas gran cantidad de moléculas de agua. Esta T_t es controlada por parámetros intrínsecos, incluyendo la composición, peso molecular e hidrofobicidad, y está muy influenciada también por factores extrínsecos como la concentración, solutos o el pH: el diseño a medida de estos ELRs permite definir sus temperaturas de transición para ser adaptados a diferentes aplicaciones(18)(17).

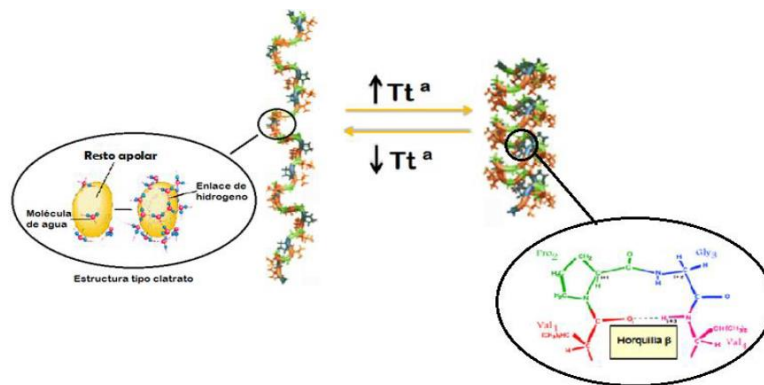


Figura 3: Estructura del ELR por debajo y por encima de la temperatura de transición (T_t).

Este comportamiento con la temperatura que experimenta tanto la elastina natural como los ELRs se denomina transición inversa con la temperatura o ITT puesto que, como se ha comentado anteriormente, se produce un ordenamiento de las cadenas del polímero por encima de la temperatura de transición. Aunque parezca que este hecho vulnera la 2ª ley de la termodinámica, esta propiedad se puede explicar en función de la solubilidad en agua de estos polímeros apolares. La hidratación hidrófoba (que se produce por debajo de la T_t) es un proceso exotérmico, con una entalpía de hidratación $\Delta H < 0$, por lo que podría tratarse de un proceso espontáneo que favorecería la disolución y dispersión de moléculas apolares en agua. Sin embargo, la solubilidad en agua de estos compuestos apolares es muy restringida debido al valor limitante de la energía libre de Gibbs que, para procesos a presión constante, es el potencial que gobierna el proceso de disolución(2).

Efectivamente, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ y, en este caso, la entropía de hidratación, ΔS , es negativa por la disminución entrópica derivada del mayor orden que deben adoptar las moléculas del agua, por lo que, a temperaturas ordinarias, este mecanismo de hidratación no se extiende a todas las moléculas hidrófobas. Por encima de la temperatura de transición (el polímero se pliega) se produce la pérdida de orden en las moléculas de agua, siendo mayor que la disminución experimentada por la ordenación del polímero y, por consiguiente, haciendo que el proceso sea espontáneo, es decir, la energía de Gibbs será menor que cero(2).

Cabe destacar que la temperatura de transición de este tipo de polímeros suele estar próxima a la temperatura ambiente o a la temperatura fisiológica. El rendimiento mecánico de los ELRs va acompañado de una extraordinaria biocompatibilidad, ya que el sistema inmunológico del organismo es incapaz de distinguir entre la elastina endógena y un ELR.

Los ELRs poseen una gran variedad de aplicaciones en el campo biomédico siendo útiles en la administración controlada de medicamentos, ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y otros dispositivos médicos(18).

2.6. Química “click”

El término Química “click” fue introducido por K.B. Sharpless en 2001 para describir reacciones que reúnen una serie de condiciones como: alto rendimiento, amplio alcance, generar sólo subproductos que se puedan eliminar fácilmente sin realizar separaciones cromatográficas, estereoespecíficas, sencillas de llevar a cabo y en disolventes no muy nocivos. En resumen, se tratan de reacciones muy eficientes, versátiles y selectivas que requieren condiciones de reacción suave y métodos para su purificación sencillos(20)(21).

Este concepto fue desarrollado en paralelo al creciente interés, por parte de la industria farmacéutica, en la producción de nuevos materiales, la biología molecular o la síntesis orgánica avanzada, entre otros(20).

Los grupos de reacciones que cumplen con los requisitos y encajan en el perfil de esta química “Click” son(2):

- Reacciones de adición nucleófila: formación de ureas, tioureas, éteres, oximas, heterociclos aromáticos, hidrazonas y amidas. En este grupo se excluyen las condensaciones aldólicas.
- Adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono: reacciones de epoxidación, dihidroxilación o adiciones de Michael, entre otras.
- Cicloadiciones de especies insaturadas: cicloadiciones 1,3-dipolares y reacciones Diels-Alder.
- Reacciones de sustitución nucleófila que provocan la apertura de anillos muy tensionados como epóxidos o aziridinas.

Una de las reacciones más representativas dentro de la Química “click” es la Cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen. Se trata de una reacción de un dipolarófilo con un compuesto 1,3-dipolar que conduce a la formación de heterociclos de 5 miembros. Como ejemplos de dipolarófilos se encuentran los alquenos y alquinos, y aquellas moléculas que poseen grupos funcionales con heteroátomos como carbonilos y nitrilos. Los compuestos 1,3-dipolares contienen uno o más heteroátomos y poseen al menos una estructura mesomérica que representa un dipolo cargado. La formación de los heterociclos resultantes de estas cicloadiciones es un proceso favorable termodinámicamente; sin embargo, poseen una elevada energía de activación, por

lo que en la mayoría de las ocasiones se deben llevar a cabo a temperaturas elevadas o en presencia de catalizador(20)(22)(2).

- **Mecanismo**

Originalmente, se propusieron 2 mecanismos para describir la cicloadición 1,3- dipolar; el primero era el mecanismo concertado de cicloadición pericíclica, propuesto por Rolf Huisgen(23) (Figura 4)(24), y el segundo, el mecanismo paso a paso que implica un dirradical intermedio, propuesto por Firestone(25). Después de mucho debate, se acepta la primera propuesta de forma más generalizada(26); el 1,3-dipolo reacciona con el dipolarófilo de manera concertada, a menudo asincrónica y dando lugar a un estado de transición aromático de 6 electrónicas.

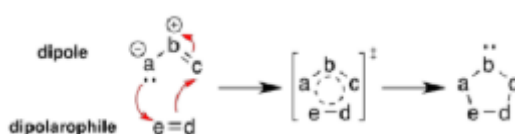


Figura 4: Mecanismo de cicloadición 1,3- dipolar propuesta por Rolf Huisgen.

Así, la cicloadición térmica de Huisgen 1,3-dipolar de alquinos a azidas requiere altas temperaturas, conduciendo a mezclas de regioisómeros cuando se emplean alquinos asimétricos (Figura 5a). En este aspecto, la clásica cicloadición 1,3-dipolar falla como una reacción típicamente “click”. Existe una variante que está catalizada por cobre (I), que sigue un mecanismo diferente y que puede realizarse en disolventes acuosos e incluso a temperatura ambiente. Además, esta catálisis con Cu permite obtener un único regioisómero 1,4-disustituido. Por el contrario, la reacción catalizada por rutenio produce el regioisómero contrario y se forman triazoles 1,5-disustituídos (Figura 5b)(20)(2).

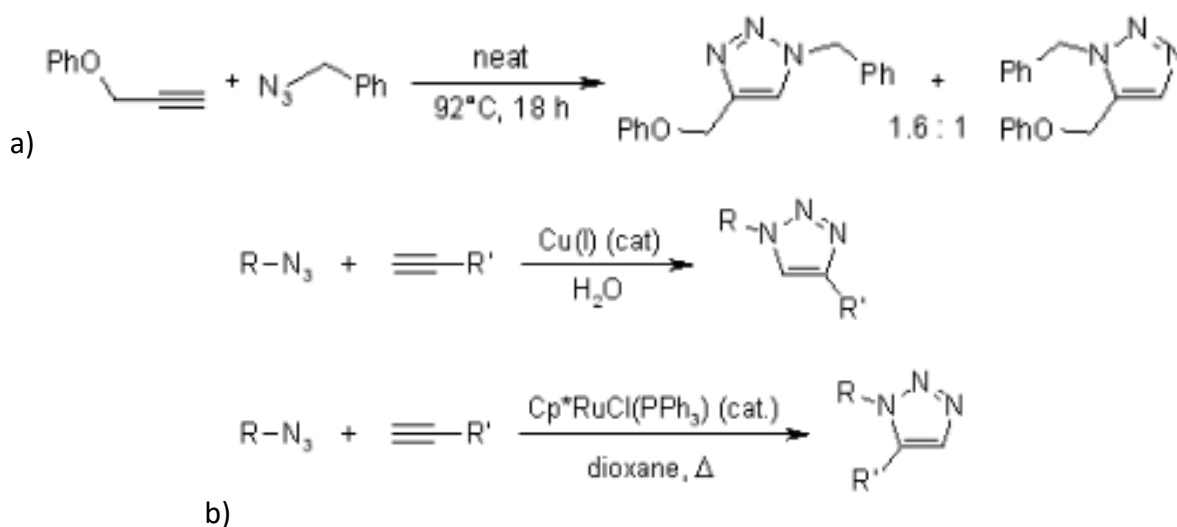


Figura 5: a) Cicloadición térmica de Huisgen 1,3-dipolar de alquinos a azidas; b) Cicloadiciones 1,3-dipolares para dar regioisómeros 1,4 y 1,5-disustituídos catalizadas por Cu(I) y rutenio, respectivamente.

Reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada con cobre (CuAAC)

En lo que se refiere a las reacciones catalizadas por cobre, éstas fueron descubiertas en 2001 por Sharpless y Meldal. Se trata, como se puede observar en la *Figura 6*, de la cicloadición [3+2] azida-alquino (AAC) que da lugar a 1,2,3-triazoles regioselectivos. Esta adición se puede llevar a cabo de forma directa, mediante el empleo de cantidades catalíticas de sales de Cu(I), o bien, mediante una reducción de sales de Cu(II) a Cu(I) en presencia de un reductor como el ascorbato sódico(2).

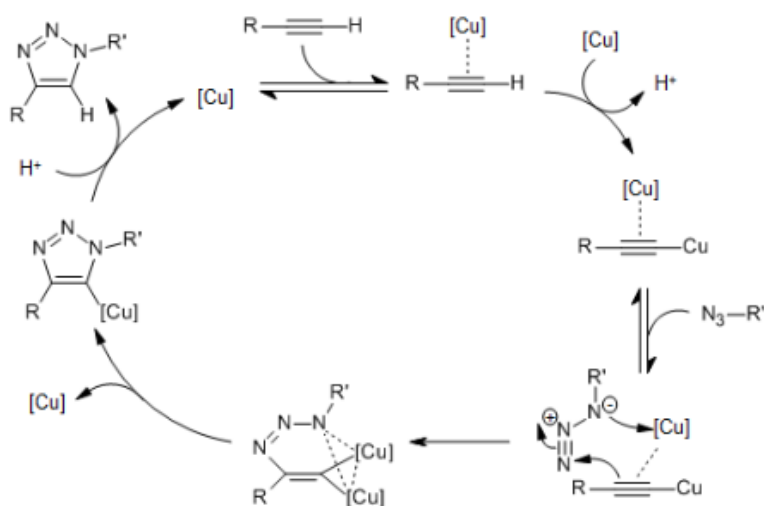


Figura 6: Esquema de reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por Cu(I).

Además de las ventajas que se han comentado anteriormente, estas cicloadiciones [3+2] catalizadas por Cu presentan una enorme aceleración en factores de 10^7 y 10^8 en comparación con la cicloadición [3+2] de Huisgen sin catalizar. Se puede llevar a cabo en un amplio rango de temperatura, es insensible a las condiciones acuosas y se puede realizar en un rango de pH de 4 a 12. Sin embargo, la presencia de cobre ha limitado el uso de esta reacción para aplicaciones en sistemas vivos debido a sus posibles efectos citotóxicos (*Figura 6*). Para solucionar este problema se emplearon alquinos activados, como los derivados de ciclooctino, puesto que su tensión anular los hace reaccionar con el grupo azido sin necesidad de una catálisis adicional, debido a la disminución de la energía de activación del proceso (SPAAC, "Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition")(20)(22)(2).

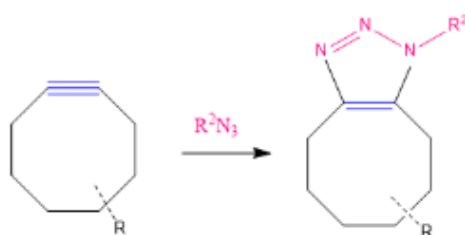


Figura 7: Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] SPAAC.

Posee la ventaja de no generar subproductos o reacciones secundarias y, además, los productos puros pueden aislarse por simple filtración o extracción sin necesidad de cromatografía o recristalización. Este tipo de estrategias sin catalizadores metálicos confieren a estas reacciones una amplia aplicabilidad biológica (*Figura 7*). El hecho de no generar subproductos o reacciones secundarias está relacionado con la economía atómica de un proceso, concepto asociado a uno de los principios de la Química Verde, que se basa en que todas las materias primas de un proceso químico terminen en el producto final generando una cantidad mínima de residuos. No nos podemos centrar únicamente en el rendimiento en una reacción, ya que un proceso puede tener un alto rendimiento, pero generar una gran cantidad de subproductos, presentando de este modo una economía atómica baja, sino que se deben tener en cuenta ambos conceptos para diseñar un proceso químico “verde”(27).

Todas estas reacciones comentadas forman parte de lo que se conoce como química bioortogonal que se refiere a cualquier reacción química que pueda ocurrir dentro de los sistemas vivos sin interferir en los procesos bioquímicos nativos(28)(29)(30). Desde su introducción, el concepto de la reacción bioortogonal ha permitido el estudio de biomoléculas como glucanos, proteínas(31) y lípidos(32) en tiempo real en sistemas vivos sin toxicidad celular. Se han desarrollado una serie de estrategias de ligamiento químico que cumplen los requisitos de bioortogonalidad, incluida la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y ciclooctinos(33).

El empleo de la química bioortogonal requiere generalmente dos pasos. Primero, un sustrato celular se modifica con un grupo funcional bioortogonal (indicador químico) y se introduce en la célula; entre estos sustratos se incluyen metabolitos, inhibidores enzimáticos, etc. El indicador químico no debe alterar drásticamente la estructura del sustrato para evitar afectar a su bioactividad. En segundo lugar, se introduce una sonda que contiene el grupo funcional complementario para reaccionar y marcar el sustrato(34).

El grupo azida es especialmente bioortogonal debido a que es extremadamente pequeño (favorable para la permeabilidad celular y evita perturbaciones), metabólicamente estable, y no existe naturalmente en las células, razón por la que no produce reacciones secundarias biológicas competitivas. Por su parte, el ciclooctino posee la estabilidad y ortogonalidad necesarias para su aplicación *in vivo*(34).

Cicloadición azida-alquino promovida por tensión anular (SPAAC)

Los estudios realizados por Wittig y Krebs demostraron que el ciclooctino reaccionaba rápidamente con una fenilazida de manera parecida a una explosión, pasando a ser incluida esta reacción dentro de las llamadas “click”(35). El ángulo de enlace en los átomos de carbono que poseen una hibridación “sp” en el ciclooctino desciende aproximadamente a 160°, mientras que el ángulo teórico que corresponde a ese tipo de hibridación es de 180°; pasando a ser 120° en el estado de transición que da lugar al triazol, conduciendo a un aumento de la

velocidad de reacción. El primer ciclooctino utilizado fue un 3-alcoxi derivado, (*Figura 8*), cuya cinética de reacción era efectivamente más rápida que cuando se empleaban alquinos lineales. De hecho, en los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas de ciclooctinos altamente reactivos. Así, Bertozzi y su equipo(33) diseñaron sistemas de ciclooctinos que contenían uno o dos átomos de flúor en el anillo, observando un aumento de la velocidad de reacción entre 3 y 60 veces, respectivamente, debido al efecto electrón-atractor de los átomos de flúor(36).

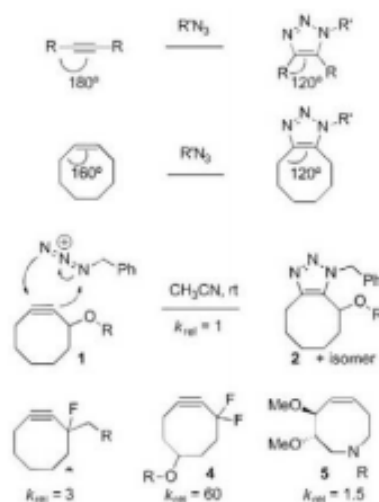


Figura 8: Reacción entre un derivado del ciclooctino y azidas en ausencia de catalizador(37).

2.7. Biofuncionalización de superficies

La modificación de la composición química superficial de los materiales mediante la fijación de grupos funcionales recibe el nombre de funcionalización. En particular, se llama biofuncionalización al proceso por el cual se fijan cadenas orgánicas que contienen grupos funcionales tales como carboxilos (-COOH), tioles (-SH) o amino (-NH₂), que pueden formar posteriormente enlaces covalentes con diversas biomoléculas bajo condiciones fisiológicas, permitiendo de esta manera la interacción estable entre los materiales y los sistemas biológicos. Algunos ejemplos de los tipos de funcionalización más empleados se basan en la formación de monocapas autoensambladas (SAM's), la hidroxilización o la silanización entre otros(38)(39)(40).

Por otro lado, las tecnologías de recubrimiento de superficies hacen posible que podamos controlar algunas propiedades de los materiales. En este sentido, la técnica de autoensamblaje capa por capa (LbL self-assembly) es un método utilizado frecuentemente para recubrir sustratos con varias capas funcionales. Los primeros estudios realizados sobre el ensamblaje LbL surgen como un proceso en el que un material cargado se adsorbía en un sustrato dado y, posteriormente, se adsorbía otro material de carga opuesta en la superficie de la primera capa(41). De este modo se obtenía una bicapa con un espesor generalmente del orden de los nanómetros. El proceso de deposición se repite hasta que se consigue el número de capas o el espesor deseado. En algunas aplicaciones se puede eliminar el sustrato en el que

se produce el recubrimiento, creando películas macroscópicas independientes como membranas(42), o micro/nanoscópicas como cápsulas huecas(43)(44). Aunque las pioneras interacciones electroestáticas siguen siendo muy utilizadas hoy en día para la formación de películas, existen otras interacciones moleculares (covalentes, enlaces de hidrógeno, Van der Waals, interacción huésped-huésped...) que han resultado especialmente útiles para el auto-ensamblaje LbL cuando se utilizan materiales como polímeros, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos o nanopartículas como recubrimiento. Tanto la simplicidad como la versatilidad y el control a nanoescala que proporciona el conjunto de técnicas LbL las convierten en unas de las tecnologías más utilizadas para el recubrimiento de superficies y diferentes sustratos en el ámbito de la óptica, catálisis, separaciones o la biomedicina (*Figura 9A*)(45).

Existen diferentes técnicas LbL en función de las diferentes propiedades y requisitos de los sustratos y de los materiales de recubrimiento. Entre los ejemplos se encuentran la inmersión(46), rociado(47), centrifugación(48), atomización(49) o electrodeposición(50). Además, se sabe que el método de ensamblaje utilizado determina tanto las condiciones del proceso como el tiempo, escalabilidad o la intervención manual, como las propiedades físico-químicas de las capas obtenidas, tales como el espesor, la homogeneidad y las interacciones entre éstas (*Figura 9B*)(45).

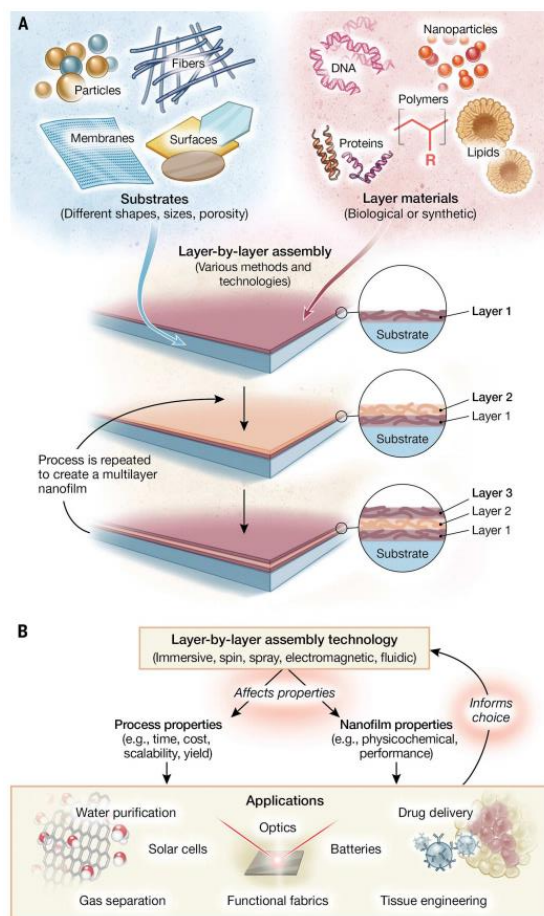


Figura 9: Versatilidad del ensamblaje Layer by Layer. (A) Visión general del ensamblaje LbL (B) Visión general de cómo la tecnología del ensamblaje LbL influye en las propiedades de las capas.

2.7.1. Ensamblaje LbL por inmersión

Como se mencionó anteriormente, el ensamblaje LbL consiste en la adsorción consecutiva de dos (o más) materiales complementarios (materiales 1 y 2, denominados M_1 y M_2) a un sustrato dado para formar multicapas. En el ensamblaje por inmersión, el sustrato (que puede ser una superficie, partícula o emulsión) se sumerge primero en una solución de M_1 por un tiempo determinado. Una vez que M_1 se adsorbe al sustrato, el paso intermedio consiste en la eliminación del exceso de M_1 , seguido de la inmersión del sustrato recubierto de la capa M_1 en una solución de la capa M_2 . El exceso de la capa M_2 se elimina mediante otro proceso de lavado, lo que da como resultado una bicapa de M_1/M_2 . Repitiendo este procedimiento, se pueden obtener múltiples capas M_1/M_2 (51).

3. Objetivos y justificación

Este proyecto surge con un primer objetivo centrado en el recubrimiento de membranas polarizadas de PVDF con recombinámeros tipo elastina portadoras del motivo de adhesión RGD destinadas a un posterior estudio “in vitro” de la influencia de este dominio en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (CMM). La situación extraordinaria generada por la COVID-19 no hizo posible terminar la experimentación, motivo por el cual surge el segundo objetivo de este Trabajo Fin de Grado y que se ha centrado en el estudio bibliográfico de los antecedentes existentes para otros biomateriales de la influencia del dominio RGD en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales.

En cuanto al primer objetivo, encaminado a la obtención de andamios moleculares que sirvan como soporte estructural de las células, éstos deben estimular la adhesión, proliferación, diferenciación y viabilidad de las células y, por lo tanto, garantizar una excelente biocompatibilidad, baja toxicidad y buena biodegradabilidad para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos. Para ello se utilizó el recubrimiento de superficies Layer by Layer (LbL), optimizado por el grupo de investigación BIOFORGE, con biopolímeros recombinantes tipo elastina (ELRs) para obtener andamios biomoleculares inteligentes destinados al cultivo celular. Los biopolímeros ELRs se producen mediante ingeniería genética y, por tanto, pueden ser diseñados de manera que porten adecuados grupos funcionales para las aplicaciones específicas que se les vaya a asignar.

En este trabajo se utilizarán membranas porosas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) piezoeléctricas en las que se unirán, mediante la técnica LbL de inmersión, ELRs modificados covalentemente con grupos ciclooctino y azido, respectivamente, de manera que las diferentes capas se puedan unir eficazmente mediante la metodología de la química “Click”. Estas membranas provienen de la Universidad Politécnica de Valencia con la que el grupo BIOFORGE lleva a cabo un proyecto en colaboración: el estudio del efecto en la diferenciación de células madre mesenquimales (CMM) de la estimulación electromecánica y de motivos peptídicos bioactivos como RGD. Por tanto, los ELRs se bioproducen de forma que contengan

dominios de adhesión celular, como el RGD, debido a que los estudios existentes muestran resultados prometedores para la diferenciación osteogénica de las CMMs.

Debido a la extraordinaria situación provocada por la pandemia mundial del COVID-19 la parte experimental de este proyecto no pudo ser concluida en su totalidad. Es por esta razón por la que, a falta de poder completar el recubrimiento de un nuevo lote de membranas piezoeléctricas polarizadas y su caracterización y aplicación posterior, se realiza un estudio bibliográfico acerca de la influencia en la osteoinducción y adhesión celular del dominio peptídico RGD en diferentes soportes moleculares.

Por consiguiente, los propósitos de este TFG son el recubrimiento de membranas piezoeléctricas polarizadas con ELRs que contienen el motivo peptídico RGD de bioadhesión mediante la metodología LbL, manteniendo la unión entre capas gracias a una reacción típica de la química “click”; y el estudio teórico de la influencia del RGD, anclado a diferentes andamios bioactivos, en la diferenciación osteogénica de CMMs para su posible aplicación en futuras terapias para la regeneración de tejidos óseos.

4. Materiales y métodos

En este apartado serán incluidos los materiales utilizados durante la parte experimental del trabajo, así como las técnicas empleadas, incluyendo el fundamento teórico de las mismas. Posteriormente se desarrollarán las distintas metodologías empleadas, como la modificación química de los ELRs y el recubrimiento de membranas porosas de PVDF con ELRs modificados químicamente.

4.1. Materiales

4.1.1. Reactivos químicos y disolventes

En las siguientes tablas, se incluyen los diferentes reactivos y disolventes, con sus casas comerciales, empleados a lo largo del trabajo.

Reactivo	Casa Comercial
Carbonato de 2-Azidoethyl (2,5-dioxopirrolidin-1-il)	Synaffix
Carbonato de (1R,8S,9S) biciclo [6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo	Galchimia

Tabla 1: Reactivos empleados y sus casas comerciales.

Disolvente	Casa Comercial
Dimetilformamida (DMF)	Acros Organics
Dietil éter	Scharlau
Acetona	Sigma-Aldrich

Dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado	Sigma-Aldrich
Agua milliQ	

Tabla 2: disolventes empleados y sus casas comerciales.

4.1.2. Técnicas empleadas

Aunque el fundamento teórico de las técnicas desarrolladas a lo largo del TFG no es estrictamente esencial ni forma parte de los objetivos, conviene conocer en líneas generales en qué se basan y el equipo necesario para obtener la información útil que nos proporcionan.

4.1.2.1. Espectroscopía de IR

La espectroscopía vibracional fue desde el comienzo una de las primeras técnicas de uso extendido, en especial la absorción en el infrarrojo (IR). La región del IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800-10\text{ cm}^{-1}$. Esta región, a su vez, se subdivide en 3 regiones: IR cercano (NIR): $12800-4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000-400\text{ cm}^{-1}$, IR lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$, siendo el IR medio la zona con un mayor número de aplicaciones analíticas en los comienzos de la técnica, mientras que el NIR experimenta un gran auge desde la época de los 80. El NIR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y proporciona un análisis cualitativo sin destruir la muestra(52).

Centrándonos en el IR medio, existen espectrómetros comerciales desde la década de los 40, aunque el auge de la técnica no se produjo hasta el desarrollo de los espectrómetros que incluían el método de transformada de Fourier (FT-IR) que no sólo mejoraba la calidad espectral, sino que minimizaba el tiempo de análisis de forma considerable. La mayoría de los equipos de hoy en día emplean sistemas de análisis que incluyen la transformada de Fourier de haz sencillo(52).

La espectroscopía IR se basa en la posibilidad de rotar y vibrar a distintas frecuencias (modos normales vibracionales) que tienen las moléculas. Así, una molécula puede absorber la energía de fotones en el rango energético de IR en el caso en que exista una diferencia en el momento dipolar de la molécula mientras ocurre un movimiento vibracional rotacional y cuando la frecuencia asociada con la radiación resuena con el movimiento vibracional(53).

Existen modos vibracionales que inducen oscilaciones que pueden entrar en resonancia con un haz de IR. Esto produce un intercambio de energía entre el haz y las moléculas constituyentes. Existe un comportamiento característico para un enlace con un tipo atómico, un entorno químico y una concentración de enlaces determinadas. Un espectro infrarrojo se manifiesta en forma de bandas que se corresponden cada una de ellas a un movimiento de vibración de uno de los enlaces dentro de la molécula. Se sostiene entonces que el conjunto constituye la huella dactilar del compuesto. La eficacia de la espectroscopía IR se basa en que cada compuesto presenta un comportamiento particular frente a un haz de infrarrojos(53).

Cuando se hace un análisis IR se mide la intensidad del haz antes (I_0) y después (I) de que interaccione con la muestra. El resultado se expresa en función de la frecuencia de la luz incidente. Para estudiar las frecuencias se utiliza el modelo del Oscilador Armónico Simple (OAS) basado en la Ley de Hooke. La molécula será considerada como dos masas (m_1 y m_2) que están unidas por un resorte de constante K (53).

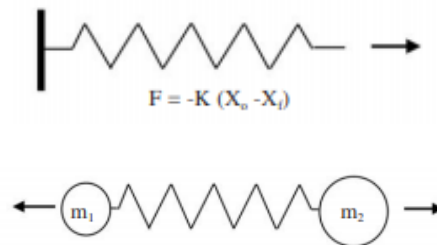


Figura 10: Esquema de oscilador armónico aplicado al análisis e frecuencias de moléculas.

Si hay resonancia entre la frecuencia de la vibración y la radiación IR, la luz es absorbida y se produce un desplazamiento que genera una energía potencial (E);

$$E = \frac{1}{2} \cdot K \cdot y^2 \quad (1)$$

siendo " K " la constante de la fuerza del enlace e " y " el desplazamiento.

Una frecuencia natural de vibración para un sistema se puede expresar como:

$$v = \frac{1}{2\pi} \times \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

donde m_1 y m_2 son las masas de los átomos y μ es la masa reducida.

Se produce la absorción si la frecuencia del haz incidente coincide con v . El modelo OAS tiene como contrapartida que ignora algunos efectos, como por ejemplo de rotura de enlaces(53).

Una de las grandes ventajas que presenta la espectroscopía de IR es su enorme versatilidad ya que permite el estudio de gran cantidad de muestras, independientemente del estado en el que se encuentren: líquido, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies.

Un espectro de IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra, determinando qué fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida por la muestra. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula.

Como en todos los procesos en los que se produce absorción de la radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca cambios en el estado

vibracional de las moléculas. Este espectro vibracional de una molécula es una propiedad física única de la misma, por lo que se puede emplear como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas o grupos característicos de la misma en comparación con espectros de referencia.

La mayoría de los espectros son muy complicados de interpretar y resulta difícil asignar cada una de las bandas que aparecen en ellos a movimientos atómicos específicos. Este análisis completo casi siempre es innecesario y no nos impide extraer información muy valiosa, de modo que este conocimiento “incompleto” de los espectros no disminuye su utilidad tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo.

Cuando los enlaces de una molécula absorben la energía adecuada vibran, dando lugar a este espectro característico. Según la fortaleza de dichos enlaces y la masa de los átomos implicados será necesario más o menos energía para que se produzca la absorción de la radiación. Además, la simetría del sistema y de cada modo normal definen las absorciones activas, por lo que el espectro IR se convierte en una propiedad del sistema de átomos o molecular específico del compuesto en cuestión.

Instrumentación y preparación de muestras

Los espectrofotómetros de IR constan de todo un equipo necesario para medir la transmisión de la radiación electromagnética de una muestra en función de la longitud de onda o del número de ondas. El elemento más importante, el elemento dispersivo, es el que nos permite medir selectivamente la señal analítica aislando la radiación de regiones espectrales definidas y da lugar a los diferentes tipos de espectrómetros: no dispersivos, dispersivos y de transformada de Fourier. Los equipos de transformada de Fourier (FT) utilizan un interferómetro que permite la modulación de la radiación dependiente de la longitud de onda y permiten la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones señal/ruido (S/N) elevadas(54)(52). Un interferómetro es un instrumento óptico que emplea la interferencia de las ondas de luz para medir con gran precisión longitudes de onda de la misma luz(55). Existen muchos tipos de interferómetros, en todos ellos se utilizan dos haces de luz que recorren dos trayectorias ópticas distintas, determinadas por un sistema generalmente de espejos y prismas que, finalmente, convergen para formar un patrón de interferencia.

Otro elemento esencial es la fuente de radiación, que debe aportar la mayor intensidad posible en la región de longitud de onda en la que se pretende trabajar. Las fuentes de radiación térmicas (sólido inerte calentado eléctricamente) son las más utilizadas y proporcionan radiación en continuo; en contraste, las de láser suministran longitudes de onda muy concretas. Por otro lado, el sistema óptico se encarga de transmitir la radiación desde la fuente al detector con la mínima pérdida.

El sistema óptico está equipado con un compartimento para la muestra, en el que ésta se sitúa de forma que el camino de la radiación incida sobre ella. Este compartimento puede presentar diferentes accesorios que permiten realizar medidas distintas a la transmisión como es, por ejemplo, la Attenuated Total Reflection (ATR). El detector se emplea para convertir la señal óptica en una señal eléctrica fácilmente medible.

ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en espectroscopía de infrarrojo, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total de la radiación que crea una onda evanescente sobre la superficie de dicho cristal. Esta onda se extiende a la muestra, que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito(54).

El equipo que se utiliza en este trabajo es un espectrómetro de Infrarrojo Bruker TENSOR 27. Este emplea la técnica FTIR-ATR (Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada) y el software OPUS, versión 6.5, para la obtención y edición de los espectros.



Figura 11: Espectrómetro de Infrarrojo Bruker TENSOR 27.

Los espectros FTIR adquiridos se realizaron con barridos de 64 escaneos en la región espectral comprendida entre 600 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} . Una vez registrados, se procede a la corrección de la línea base y a la normalización del espectro con el software del programa.

4.1.2.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen spin nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del spin nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada denominada frecuencia de resonancia. La frecuencia de resonancia, la energía de la absorción y la intensidad de la señal son proporcionales a la fuerza del campo magnético. La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos (56)(57).

Así, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un núcleo determinado están íntimamente relacionadas con su estructura molecular, por lo que un análisis detallado

del espectro proporciona valiosa información acerca de la estructura del compuesto que lo origina. Por ello, esta técnica resulta ser de las más eficientes y útiles para el estudio de la estructura y dinámica de moléculas en disolución(56)(57).

Desplazamiento químico

No se puede tener en cuenta la resonancia de un núcleo aislado dentro de un campo magnético ya que en realidad los núcleos, como pueden ser los protones o los carbonos que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados, sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos. Los electrones se mueven y generan un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo. En cualquier molécula la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Este **apantallamiento** es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo (H_{ef}) que siente un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo, y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor(58). Si todos los protones (1H) de una molécula estuvieran apantallados de la misma manera, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los diferentes núcleos activos en una molécula resuenan a frecuencias ligeramente diferentes ya que se encuentran en entornos electrónicos diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro que presenta diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de **desplazamientos químicos** (unidades δ o ppm). En la práctica es difícil medir el campo magnético al que un protón absorbe con suficiente exactitud para distinguir protones individuales, ya que las absorciones sólo varían en unas pocas milésimas. Un método más exacto para expresar desplazamientos químicos es determinar el valor respecto a un compuesto de referencia que se añade a la muestra(58) (para los núcleos 1H , ^{13}C y ^{29}Si se usa como referencia el tetrametilsilano o TMS). Esta diferencia entre la frecuencia de la señal y la frecuencia de la referencia se divide por la frecuencia de la señal de referencia para obtener el desplazamiento químico. Los desplazamientos de frecuencia son muy pequeños en comparación con la frecuencia RMN fundamental. Un desplazamiento de frecuencia típico podría ser de 100 Hz, en comparación con una frecuencia RMN fundamental de 100 MHz, por lo que el desplazamiento químico se expresa generalmente en partes por millón (ppm)(56)(57).

En los espectros de ^1H -RMN el software de análisis de los equipos permite analizar el tamaño de los picos con el fin de conocer la cantidad relativa de cada tipo de hidrógeno presente en la muestra. Este proceso se conoce como integración y se define como el área comprendida debajo de un pico que es proporcional al número de átomos de hidrógeno que generan el pico(56)(57).

Por otro lado, la muestra a analizar ha de estar disuelta en un determinado disolvente. Normalmente se emplean disolventes deuterados ya que no aparecen los protones del disolvente, o su señal es muy baja, al realizar el experimento de RMN. En estos disolventes deuterados más del 99% de los protones presentes se han sustituido por deuterio, por lo que el pico del espectro correspondiente al disolvente poseerá una integral baja(56)(57).

Durante el desarrollo de este estudio se empleó el espectrómetro automático “Agilent Technologies NMR 400” perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVA. El equipo está formado por el componente Agilent Technologies NMR 400, la sonda Agilent Technologies One NMR y el imán superconductor Agilent Technologies 400 MHz NMR.



Figura 12: Espectrómetro Agilent Technologies NMR 400.

Esta técnica se ha empleado para evaluar tanto el rendimiento de la reacción de la modificación química de los polímeros como su caracterización estructural. Para el análisis de los espectros obtenidos de los distintos compuestos de estudio se utilizó el software MestReNova.

4.1.2.3. *Ángulo de contacto*

De forma general, se define el ángulo de contacto como el ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido(59).

Cuando las fuerzas de adherencia son muy altas el ángulo es menor de 90° ya que el líquido se ve “atraído” por el sólido y se extiende. En el caso del agua se denominan superficies hidrofílicas. En el caso de que las fuerzas de atracción sean muy bajas la superficie tenderá a ‘repeler’ el líquido y el ángulo será mayor de 90° , en el caso del agua se le llama hidrofóbicas. En el caso de encontrar estos comportamientos muy acentuados añadiremos el prefijo ‘super’ se denominan superficies superhidrofóbicas o superhidrofílicas(59).

El ángulo de contacto entre un sólido y un líquido va a depender de:

- La tensión superficial entre sólido y gas.
- La tensión superficial entre sólido y líquido.
- La tensión superficial entre líquido y gas.

Un goniómetro es un aparato en forma de semicírculo o círculo graduado hasta 180° o 360°, que se emplea para medir o construir ángulos. Gracias al goniómetro, y a través de cálculos matemáticos de diferente dificultad, se pueden medir ángulos exactos entre dos objetos o puntos sumamente alejados entre sí(60).

A lo largo del trabajo se midieron ángulos de contacto de una gota de agua sobre las superficies diferentemente funcionalizadas, utilizando para ello agua milliQ. La medida del ángulo de contacto se realiza con el objeto de establecer un control de las distintas etapas de funcionalización; así, en nuestro caso, nos permitió determinar si las superficies se encontraban activadas o no, así como analizar el recubrimiento y la homogeneidad de dicho recubrimiento.

Se empleó un goniómetro Dataphysics OCA 15 plus, Neurtek Instruments, equipado con una cámara de video CCD adaptada perteneciente al GIR BIOFORGE de la UVa.

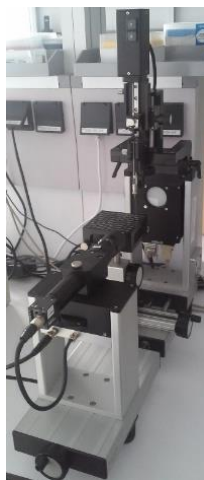


Figura 13: Goniómetro Dataphysics OCA 15 plus.

4.1.2.4. Plasma Cleaning

La limpieza con plasma consiste en la eliminación de impurezas y contaminantes de las superficies mediante el uso de un plasma energético o plasma de descarga de barrera dieléctrica (DBD) que se crea a partir de especies gaseosas. Esta limpieza se realiza de manera uniforme, segura y sencilla. Se emplean gases como el argón y el oxígeno o mezclas como aire y el hidrógeno/nitrógeno. El plasma se crea utilizando voltajes de alta frecuencia (típicamente de kHz a MHz) para ionizar el gas a baja presión (típicamente valores de presión alrededor de 1/1000 de la presión atmosférica)(61)(62).

En el plasma, los átomos de gas son excitados a estados de mayor energía e ionizados. De esta forma, a medida que los átomos se “relajan” a su estado fundamental de energía más baja, liberan un fotón de luz, que da como resultado el “brillo” o luz características asociados con el plasma. Las especies activadas del plasma incluyen átomos, moléculas, iones, electrones, radicales libres, metaestables y fotones en el rango de UV de onda corta (UV de vacío). Esta mezcla es luego la que interactúa con cualquier superficie situada en la cabina del plasma(61)(62).

La forma de evaluar, por ejemplo, si se ha producido la eliminación de contaminantes orgánicos de una superficie es mediante mediciones de ángulo de contacto. Cuando hay un contaminante orgánico, el ángulo de contacto del agua con la superficie suele ser superior que una vez limpia la superficie(61)(62).

Por otro lado, la limpieza con plasma mejora la biocompatibilidad o bioactividad de un material o superficie y elimina las proteínas y microbios contaminantes. Los limpiadores de plasma son una herramienta general en las ciencias de la vida, que se utilizan para activar superficies para cultivo celular, ingeniería de tejidos, implantes, etc(61)(62).

La activación por plasma es un proceso utilizado frecuentemente sobre materiales poliméricos para mejorar su capacidad de ser pintado o impreso. Esto se hace usando plasma de argón que no sólo produce un producto limpio, sino también un aumento en los grupos polares, mejorando directamente la capacidad de impresión y la capacidad de recubrimiento del producto polimérico(61)(62).

Al realizar la activación con plasma se deben tener en cuenta múltiples variables con las que trabajar: presión, intensidad de la radiofrecuencia administrada, tiempo de exposición al plasma y el caudal del gas utilizado(61)(62).

La importancia de la presión en este método reside en que un valor de ésta demasiado alto o bajo da lugar a un plasma inestable, lo que reduciría la eficacia del proceso. Por otro lado, un tiempo de exposición al plasma demasiado prolongado puede ocasionar problemas de sobretratamientos como la fragmentación física de la muestra. Por último, el flujo de gas depende principalmente del volumen de la cámara, del sistema de bombeo y de la presión de operación(61)(62).

En la investigación realizada en este TFG se utilizó el equipo Harrick Plasma Cleaner PDC-002, perteneciente al GIR BIOFORGE de la UVA, y se aplicó para la limpieza y activación de las membranas de PVDF.



Figura 14: Equipo Harrick Plasma Cleaner PDC-002 sobre la mesa, a la derecha las bombonas de oxígeno y argón y a la izquierda el compresor.

4.1.2.5. MALDI-ToF (MALDI, "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization", ToF, "Time of Flight")

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que las muestras se ionizan en moléculas cargadas, pudiéndose medir la relación de su masa a carga (m/z). Además de poder obtener información cualitativa o cuantitativa del peso molecular de un compuesto, también proporciona información sobre su estructura y permite su detección y posterior cuantificación(63)(2).

Como se mencionó en el párrafo anterior, la técnica requiere que las moléculas se encuentren ionizadas y, si fuera necesario, separarlas con una fase previa de cromatografía, obteniéndose de esta forma iones en fase gaseosa(2).

Las partes de un espectrómetro de masas son:

- Entrada: El dispositivo de introducción debe estar diseñado para situar la muestra (μg) en el interior del equipo, donde la presión es inferior a 10^{-6} mbar, y vaporizarla en el caso de que no sea gaseosa.
- Fuente de iones: La muestra se ioniza y se fragmenta. Posteriormente los iones son acelerados mediante campos eléctricos.
- Analizador: Los iones seguirán una trayectoria, de la cual serán desviados mediante campos eléctricos o magnéticos situados en una zona denominada analizador. Sufrirán más o menos desviación, para un mismo valor de la fuerza aplicada, en función de su masa o velocidad.
- Detector: la detección consecutiva de los iones formados a partir de moléculas de la muestra produce el espectro de masas de esa sustancia.

En la espectrometría de masas MALDI-ToF, la fuente de iones es la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), y el analizador de masas es el analizador de tiempo de vuelo (TOF).

MALDI se trata de una ionización suave en la que un láser golpea una matriz de moléculas haciendo que éstas entren en fase gaseosa sin ser fragmentadas ni descompuestas. Algunas biomoléculas son demasiado grandes y pueden descomponerse cuando se calientan, por lo que la mayoría de las técnicas tradicionales las fragmentarán o destruirán. Por esta razón, MALDI es apropiado para analizar biomoléculas como péptidos, lípidos, sacáridos u otras macromoléculas orgánicas(63).

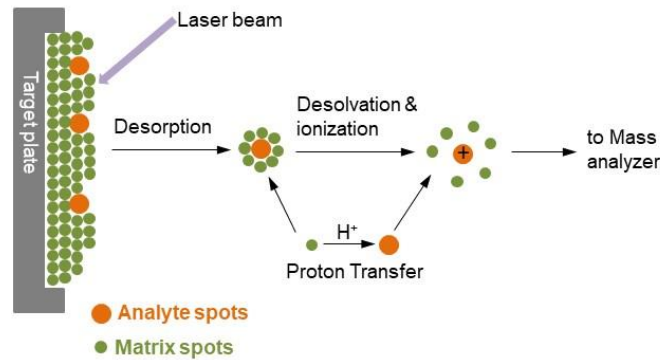


Figura 15: Ionización de analitos por MALDI.

Para llevar a cabo el análisis, se mezcla la muestra con una matriz orgánica para lograr una cocrystalización muestra-matriz y esta mezcla se deposita sobre una placa metálica conductora. En alto vacío, es tratada con pulsos de luz láser provocando que la matriz absorba esta energía y la convierta en energía de excitación y transferencia de iones al analito. El área tratada se calienta y se provoca la desorción de iones de fase sólida a gaseosa (Figura 15)(64). Lo más común es que en la ionización MALDI las moléculas de analito adquieran una sola carga positiva(63).

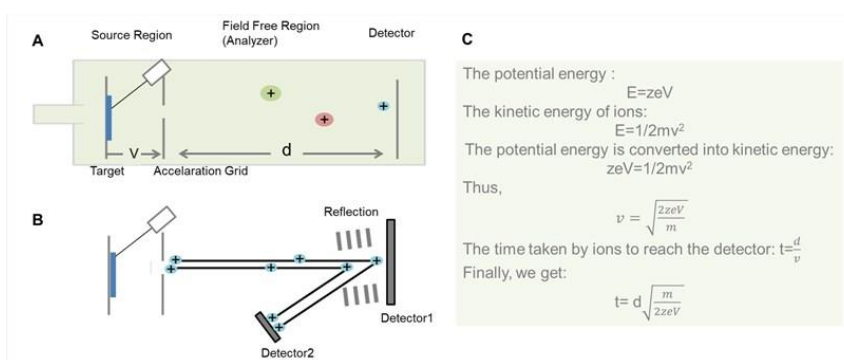


Figura 16: Esquema general del analizador TOF. (A) analizador Liner TOF; (B) analizador Reflector TOF; (C) El proceso de derivación del tiempo que los iones pasan a través de la región libre de campo en el analizador TOF de revestimiento(63).

Como se muestra en la Figura 16, el principio básico de TOF es que los iones de diferentes m/z se dispersan en el tiempo durante su vuelo a lo largo de una trayectoria de deriva libre de campo de longitud conocida. Siempre que todos los iones comiencen su viaje al mismo tiempo o al menos dentro de un intervalo de tiempo suficientemente corto, los más ligeros llegarán antes al detector que los más pesados.

En este trabajo esta técnica se ha utilizado para caracterizar los ELRs modificados con azida y ciclooctino. Gracias a ella se ha obtenido el peso molecular de cada uno de ellos. En concreto, el equipo empleado fue un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción de láser asistida por matrices (MALDI-ToF) Bruker Autoflex que se encuentra en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVa.



Figura 17: Espectrómetro MALDI TOF Bruker Autoflex.

4.3. Métodos

4.3.1. Modificación química de ELRs

La bioproducción y purificación de los biopolímeros es una tarea que no se pudo llevar a cabo en este TFG debido a la COVID-19. Las modificaciones químicas de los ELRs se llevaron a cabo sobre recombinámeros HRGD bioproducidos previamente en el GIR BIOFORGE; y dichas modificaciones se realizaron para incorporar tanto grupos azido, RGD-N₃, como grupos ciclooctino, RGD-ciclo, a la cadena aminoácida del polímero. Si las modificaciones químicas se hubieran llevado a cabo sobre el recombinámero VKVx24 como biopolímero de partida, el procedimiento resultaría análogo.

Secuencias de los biopolímeros HRGD6 y VKV:

- VKVx24: MESLLP [(VPGVG)5VPGKG]24-V
- HRGD6: MGSSHHHHHSSGLVPRGSH-MESLLP-[[(VPGIG)2(VPGKG) (VPGIG)2]2-AVTGRGDSPASS- [(VPGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2]2]6-V

La modificación química de RGD-N₃ se realizó en un proceso a gran escala, utilizando una cantidad de biopolímero de 15 g que requiere el uso de un reactor y unas condiciones experimentales diferentes a las utilizadas a menor escala.

4.3.1.1. Modificación de HRGD6 con azida

Se añaden 1000 ml de DMF, a temperatura ambiente, a un reactor de 1000 ml en atmósfera inerte de N₂ y se agita mecánicamente. Posteriormente se pesan 15 g del polímero HRGD6 y se añaden al reactor, purgando el aire del interior con nitrógeno por medio de una manguera con N₂; finalmente, se mantiene la atmósfera inerte mediante un globo de N₂.

Por otro lado, se prepara una disolución de 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (3.55×10^{-3} mmol, 811.8 mg, 0.6 eq, PM 228.17) en 5,0 mL de DMF y se añade, mediante una jeringa, a la disolución del polímero en DMF a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se agita durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se reparte el contenido del reactor en 2 tubos de centrifuga de 2L. La purificación del biopolímero modificado se realiza por precipitación con éter, adicionando la cantidad necesaria hasta aproximadamente 1 L. Se centrifuga el contenido a 4200 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente se elimina el sobrenadante, trasvasando el pellet a un solo bote. Se realizan 4 lavados de dicho pellet con acetona (utilizando aproximadamente 500 mL), para eliminar el disolvente y restos de compuestos orgánicos, mediante centrifugación (4200 rpm, 4°C, durante 15 min).

El sólido blanco obtenido se seca a presión reducida durante 3 h y se procede a su redisolución en agua fría, añadiendo hasta 500 mL de agua milliQ, y agitando el contenido en hielo durante unas 12 h. La disolución se dializa repartiendo el contenido en diferentes tripas y realizando los cambios de diálisis pertinentes (7 cambios). Por último, se liofiliza y se obtiene el biopolímero HRGD6 modificado con azida, RGD-N₃.

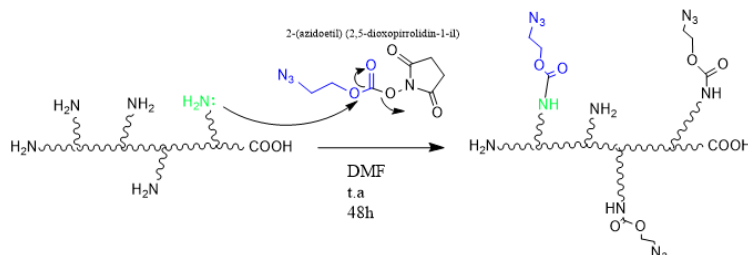


Figura 18: Reacción de modificación de un biopolímero proteico portador de lisinas con grupos azido.

4.3.1.2. Modificación de HRGD6 con ciclooctino

Se pesan 0,5 gramos de HRGD6 y se introducen en un matraz de 25 mL de capacidad tapándolo seguidamente con un septum. Como la reacción se lleva a cabo en atmósfera inerte, se realiza una purga con nitrógeno por medio de un globo de N₂ y una aguja, y se añaden a continuación 10 ml de DMF a temperatura ambiente agitando el contenido hasta su disolución.

Por otro lado, se prepara una disolución de (1R, 8S,9S)- biciclo [6.1.0] non-4-in-9-ilmetil N-succinimidil carbonato (0.117 mmol, 33.98 mg, 0.6 eq, PM 291.30 g/mol) en 0,5 mL de DMF y se añade, mediante una jeringa, a la disolución del polímero en DMF a temperatura ambiente. La mezcla total se agita durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se reparte el contenido del matraz en 2 falcons de 45 mL, llenándolos hasta un máximo de 1/4 (15 ml) de su capacidad, y se añaden 30 mL éter dietílico en cada uno de ellos precipitando de este modo un sólido blanco que se corresponde con el producto de reacción.

Se centrifuga el contenido a 15000 rpm durante 10 min a 4°C y, de forma seguida, se elimina el sobrenadante. A continuación, se realizan 3 lavados del sólido con acetona (25 mL en cada uno de ellos), para eliminar el disolvente y restos de compuestos orgánicos, mediante centrifugación (15000 rpm durante 15 min).

El sólido se seca a presión reducida y se redisuelve en 30 mL de agua ultra-pura a 4°C. La disolución se dializa, utilizando un bidón de 25 L con agua milliQ, realizando hasta 3 cambios de medio y, por último, se liofiliza el HRGD6 modificado con ciclooctino, RGD-ciclo.

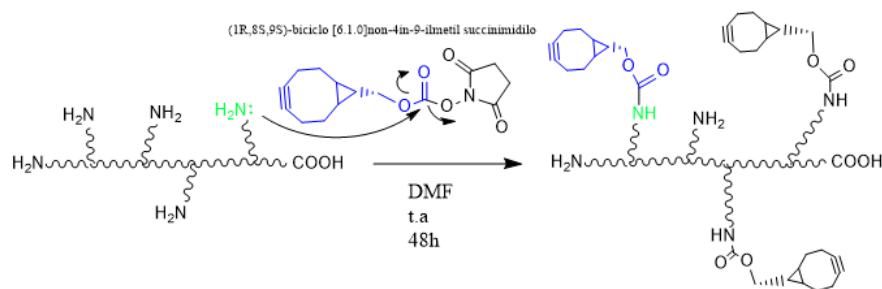


Figura 19: Reacción de modificación de un biopolímero proteico con grupos ciclooctino.

4.3.2. Recubrimiento LbL de superficies porosas de PVDF (Fluoruro de Polivinilideno)

Se va a realizar un recubrimiento de superficies porosas de PVDF mediante la técnica LbL (Layer by Layer) utilizando disoluciones de VKV- N₃ y VKV-ciclo. Para ello, antes de comenzar, es necesario un tratamiento con plasma cleaner con el objetivo de limpiar y activar la superficie de cada una de las membranas. Finalizado este proceso se procede con su recubrimiento.

Previamente a la limpieza y activación con el plasma cleaner se deben cortar las membranas con un cúter con el tamaño deseado (1 cm x 1 cm), y se marcan con una R, o con numeración, en la cara menos porosa con el objeto de identificar en todo momento qué cara es la que se va a recubrir, ya que ambas son visualmente muy parecidas. La cara más porosa es la que posee mayor interés y la que se recubrirá poliméricamente para una aplicación posterior en cultivo celular.

Nota: Las membranas en todo el proceso deben ser manipuladas con pinzas cogiéndolas con sumo cuidado por una esquina para dañarlas lo menos posible.

4.3.2.1. Activación de las superficies con plasma cleaner

Las membranas se colocan en la cámara del plasma con la cara más porosa mirando hacia arriba. Se procede en este momento a realizar un vacío de forma gradual en el equipo hasta que se alcanzan unos 600 mTorr y, de forma seguida, se hace circular una corriente de gas Argón de 20 ml/min. Una vez que los parámetros son constantes se conecta la radiofrecuencia HI (29,6 W), generando plasma de Argón de color rosáceo, y se prolonga el proceso durante 1 minuto.

Transcurrido ese tiempo se apaga la radiofrecuencia, se purga con el propio Argón, se rompe el vacío, abriendo las correspondientes llaves del equipo, y se extraen las muestras con cuidado, depositándolas en una placa Petri.

4.3.2.2. Preparación de las disoluciones de polímeros

Se preparan las disoluciones de los polímeros en una concentración de 25 mg/ml mediante pesada de los correspondientes polímeros (100 mg de VKV-N₃ y 100 mg de VKV-ciclo, respectivamente) en dos eppendorfs de 5 ml y adición posterior de 4 ml de agua milliQ fría, dejándolos disolver unas 24 h en una cámara fría a 4°C. Los polímeros se mantienen disueltos en frío, a 4°C aproximadamente, durante todo el proceso de disolución.

4.3.2.3. Recubrimiento de superficies

El proceso de recubrimiento de la superficie de las membranas consta de una serie de pasos:

- 1) Se sumergen las membranas en la disolución de VKV- N₃ durante 5 segundos y se dejan secar 5 minutos
- 2) A continuación, se sumergen las membranas en la disolución de VKV-ciclo durante 5 segundos y se dejan secar 5 minutos, generando la primera bicapa de recubrimiento.
- 3) Los pasos 1) y 2) se repiten de nuevo.
- 4) Se dejan secar las membranas durante 40 minutos adicionales.
- 5) Se depositan en la placa Petri con la parte recubierta de interés hacia arriba y se congelan durante 24 h; finalmente se liofilizan y almacenan hasta su utilización.

Este proceso se puede utilizar para recubrir diferentes tipos de membranas; el orden de los polímeros en el recubrimiento y la concentración de los mismos son factores también variables en el proceso, con objeto de evaluar tanto la mayor o menor viabilidad del crecimiento celular como el grado de recubrimiento de la superficie membrana. Tomando como referencia previa el estudio realizado en el trabajo de Fin de Grado de Ana del Barrio(2) se llegó a la conclusión de que se producía un mejor recubrimiento cuando se adsorbía a la membrana, como primera capa, la disolución de VKV-N₃ mejor que la de VKV-ciclo, todo ello respaldado por técnicas como RMN, FTIR, SEM y ángulo de contacto. Además, dedujeron que el tiempo de tratamiento de plasma cleaner no mejoraba la activación (aumento hidrofiliidad) de las membranas y que con 1 minuto de tratamiento se conseguían los objetivos requeridos.

5. Resultados y discusión

En este apartado se van a mostrar los resultados obtenidos en la parte experimental del TFG, analizándolos para ver si se han cumplido los objetivos planteados en el estudio. Se analizan los resultados de las modificaciones químicas de un ELR, HRGD6, tanto con el grupo azido como con el grupo ciclooctino, y se caracterizan mediante las técnicas de RMN, FT-IR y

espectrometría de masas. Por otro lado, se exponen los resultados del recubrimiento de membranas porosas polarizadas de PVDF de prueba mediante las condiciones optimizadas para la tecnología LbL de inmersión, utilizando disoluciones de los ELRs: VKV-N₃ y VKV-ciclooctino. Por razón de esta insólita situación producida por la pandemia del COVID-19 no se ha podido realizar el recubrimiento de un nuevo lote de membranas piezoeléctricas de PVDF para ensayos de diferenciación celular osteogénica, en este nuevo ensayo se pretendía realizar el recubrimiento utilizando disoluciones de RGD-N₃ y RGD-ciclo y su consecuente caracterización.

5.1. Modificación química de los ELRs

5.1.1. Modificación química de HRGD6 con los grupos azido y ciclooctino

La modificación química del biopolímero HRGD6 implica la introducción, en los grupos amino de las lisinas de la secuencia aminoacídica, de los grupos azido y ciclooctinilo. Se trata de una reacción de amidación por ataque nucleofílico de las aminas de las lisinas al carbono carboxílico de un carbonato especialmente reactivo debido a la presencia del resto N-succinimidilo (*Figuras 20 y 21*). Este último es un grupo activador puesto que actúa como buen grupo saliente al formarse la sal N-hidroxisuccinimida que pasa a la fase sólida y se elimina con facilidad.

Las cantidades utilizadas de polímero para cada modificación se encuentran en los apartados 4.3.1.1 y 4.3.1.2 al igual que las de los reactivos carbonato de 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) y carbonato de (1R,8S,9S)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil succinimidilo para introducir los grupos azido y ciclooctinilo, respectivamente. De estos dos últimos reactivos, se emplean 0,6 equivalentes en cada reacción dejando evolucionar la reacción durante 48h a temperatura ambiente. Realizadas las modificaciones, los productos de la reacción, una vez purificados y liofilizados, se caracterizan mediante 3 técnicas: espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas en tiempo de vuelo (MALDI-ToF).



Figura 20: Reacción de modificación química con grupos ciclooctino.

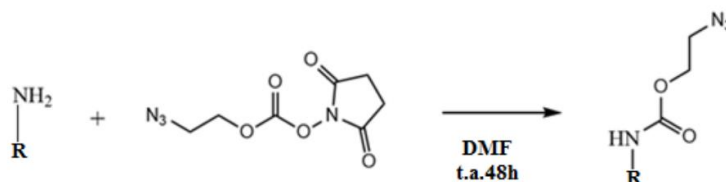


Figura 21: Reacción de modificación química con grupos azido.

Se adjuntan a continuación el rendimiento de ambas reacciones;

Polímero	RGD-N ₃	RGD-ciclo
Peso inicial	15 g	500 mg
Peso obtenido	13.7 g	475 mg
mmoles de partida	0,24	8.2 x 10 ⁻³
mmoles obtenidos	0,22	7.5 x 10 ⁻³
Rendimiento	91,6%	91,4%
Estado	Sólido	Sólido

Tabla 3: Resultados de la modificación química del ELRs RGD.

5.1.2. Caracterización de HRGD-N₃

5.1.2.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Se realiza un experimento de FT-IR colocando una pequeña muestra de polímero modificado con grupos azido, programando el equipo para que se realice un barrido desde 800 cm⁻¹ hasta 4000 cm⁻¹. Gracias a esta técnica se va a poder comprobar si se ha adicionado algún grupo funcional en las reacciones anteriores por comparación con un espectro del polímero puro sin modificar.

A continuación, se adjunta un espectro de FT-IR del polímero RGD-N₃;

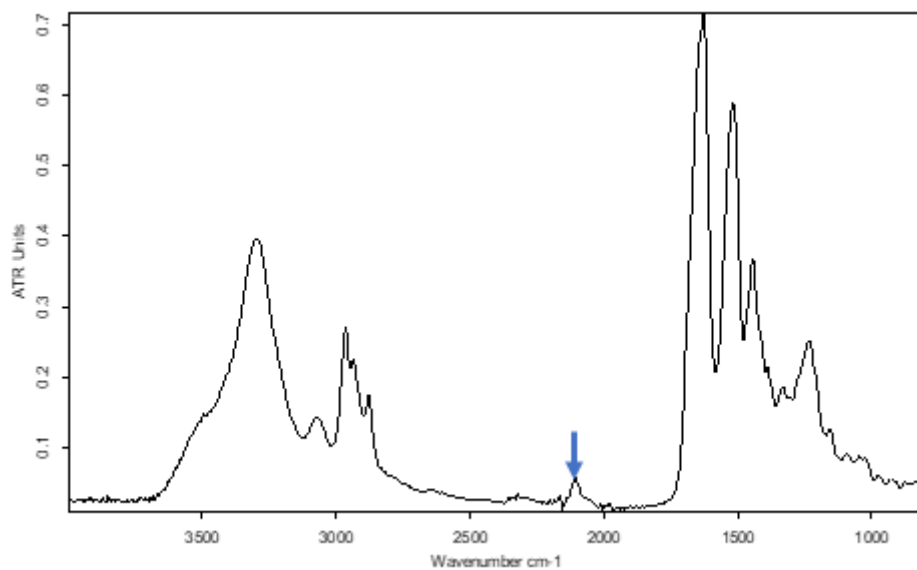


Figura 22: Espectro de FT-IR del polímero RGD-N₃.

El pico señalado en la *Figura 22* corresponde a la absorción del grupo azido (N₃) y aparece a 2100 cm⁻¹. El valor teórico de frecuencia que corresponde a este grupo son 2160-2120 cm⁻¹. El valor experimental obtenido nos indica, por lo tanto, que sí se ha producido la modificación con el grupo azido en nuestro polímero.

5.1.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se obtuvo un espectro de resonancia magnética nuclear de protón del RGD-N₃ preparando una disolución de 25 mg/mL de éste en dimetilsulfóxido deuterado.

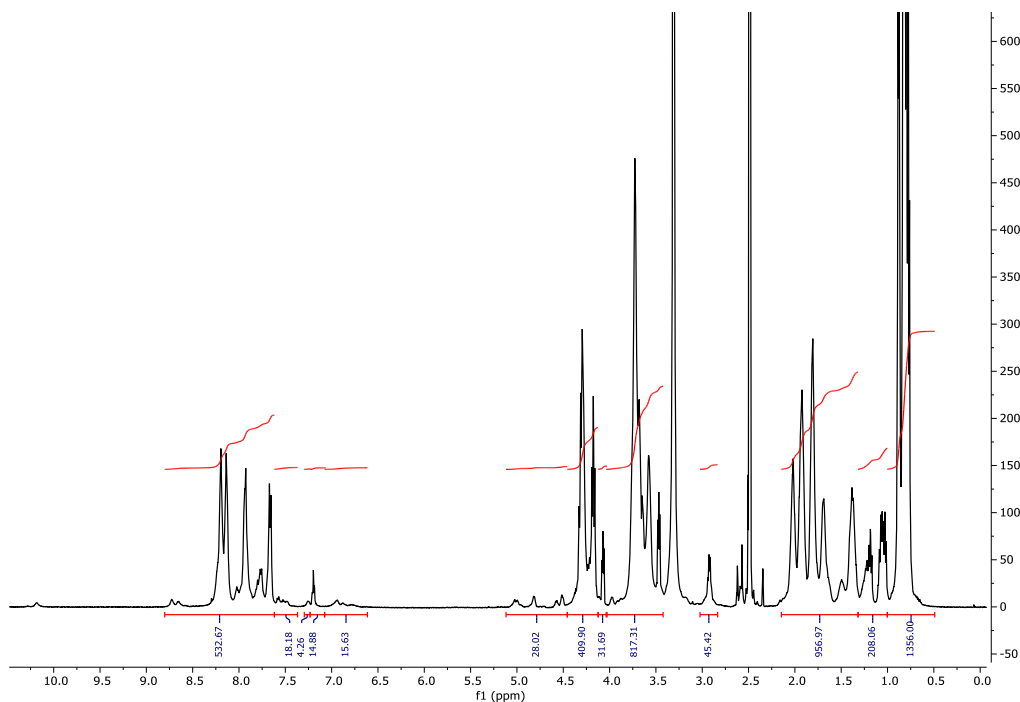


Figura 23: Espectro RMN de ¹H para el RGD-N₃.

El RGD sin modificar presenta:

- 1356 CH₃ cuyos protones salen en torno a 1 ppm.
- 570 NH cuyos protones salen en torno a 8 ppm.
- 382 CH₂ cuyos protones salen en torno a 1,3-1,5 ppm.
- 827 CH₂ cuyos protones salen en torno a 2,0-2,7 ppm.
- 1244 CH₂ cuyos protones salen en torno a 3,5-4,5 ppm.

Cabe destacar que, en el espectro, se toma como referencia los protones de los metilos cuya integral se impone en 1356. Por ello, si la línea base del espectro se toma mal o por casualidad la señal de los protones metílicos está alterada, los valores de las integrales para los demás protones se alejarán de los valores teóricos. Se tomará como válido una integral próxima a los valores reales ya que, al tratarse de un polímero complejo, es muy difícil acercarse a valores muy próximos o exactos. Además, dependiendo de los entornos químicos puede que los protones se desplacen a más o menos ppm de los valores teóricos.

Fijándonos ahora en el espectro, la suma de 956 y 208, para las integrales entre 1 y 2 ppm, es aproximadamente parecida a la suma de los 382 y 827 protones teóricos calculados para esa zona en la que aparecen los primeros CH₂. Respecto a los protones de los NH amídicos deberían haber salido entorno a los 570 y el valor de la integral del espectro es 532. Esto se debe a errores del método y a cuestiones mencionadas en el párrafo anterior.

Los picos correspondientes a la modificación química aparecen aproximadamente a 3, 4 y 7 ppm. La nueva señal en torno a 7 ppm corresponde al nuevo protón amídico resultante de la modificación de los protones del grupo amino de la lisina. La integral de este pico nos va a indicar el número de lisinas que se han modificado. Experimentalmente es el pico que aparece a 7,2 ppm y nos indica que se han modificado 14 protones, indicándonos que son 14 grupos amino de las lisinas del polímero puro las que se han modificado. El pico a 4 ppm se trata de los protones del CH₂ colindante al carbonato que se ha introducido. Por ello integran el doble que los portones anteriores, en tono a 30 ppm. En el espectro este valor es 31. Por último, los CH₂ unidos al NH de las lisinas modificadas es la señal a 3 ppm cuya integral, experimentalmente, es considerablemente mayor a 30 (45) debido probablemente al ajuste de la línea base. Nos vamos a fijar en el pico a 7,2 ppm para ver el porcentaje de modificación, ya que está en una zona del espectro más despejada y podemos comprobar que el ajuste de la línea base sea adecuado.

Puesto que el pico a 7,2 ppm integra como 14,9 protones, podemos suponer que el porcentaje de modificación es aproximadamente del 100%. El exceso en el valor de la integral del máximo posible (14,4), para los 0,6 equivalentes utilizados, probablemente se deberá a cómo se ha ajustado la línea base y a la anchura de la señal considerada..

5.1.2.3. *Espectrometría de masas con tiempo de vuelo*

A partir de la espectrometría de masas se puede determinar el peso molecular del polímero modificado y el del polímero de partida. A partir de estos datos se calcula el porcentaje de conversión de los aminoácidos lisina del RGD de partida.

El espectro de masas obtenido es el siguiente:

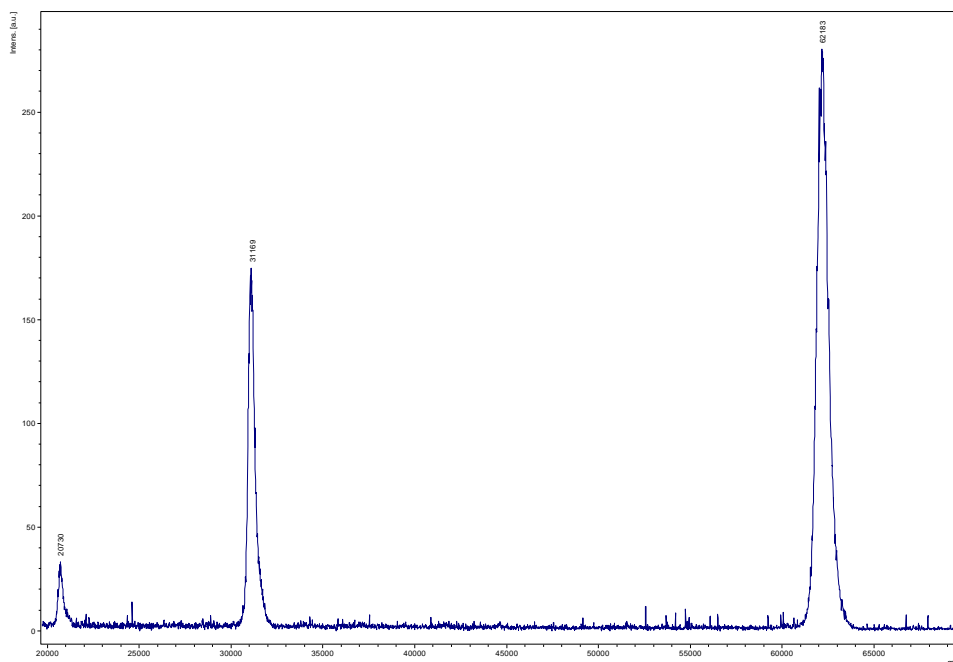


Figura 24: Espectro de masas MALDI-ToF de RGD-N3.

El segundo pico del espectro se corresponde con el M^+ mientras que el primero es el $M^+/2$. Por lo tanto, el peso molecular final corresponde con el obtenido en el segundo pico del *Gráfico 3* y es 62183 Da, aproximadamente. El peso molecular del RGD de partida es 60661 g mol^{-1} , pudiéndose calcular el número de lisinas que se han modificado a través de la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ lisinas modificadas} = \frac{PM \text{ final} - PM \text{ inicial}}{PM \text{ producto}}$$

El PM del producto es el aumento en el peso molecular que produce la introducción de los átomos en la reacción de modificación, que se corresponde a:

$$N \left(14 \frac{g}{mol} \cdot 3 \right) + C \left(12 \frac{g}{mol} \cdot 3 \right) + O \left(16 \frac{g}{mol} \cdot 2 \right) + H \left(1 \frac{g}{mol} \cdot 4 - \frac{1g}{mol} \right) = 113 \text{ g/mol}$$

El número de lisinas que se han modificado resulta de 13.5 y conociendo que en el polímero HRGD6 hay 24 lisinas libres, el porcentaje de conversión es de 56,1% .

5.1.3. Caracterización de HRGD-ciclooctino

5.1.3.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El polímero modificado con grupos ciclooctino presenta un espectro casi idéntico al del polímero puro, por lo que mediante esta técnica no se puede confirmar de forma más o menos precisa si se ha producido la modificación del polímero. Esto se debe a que el ciclooctino es un anillo simétrico y la absorción a 2200 cm^{-1} es inactiva no observándose la señal del triple enlace.

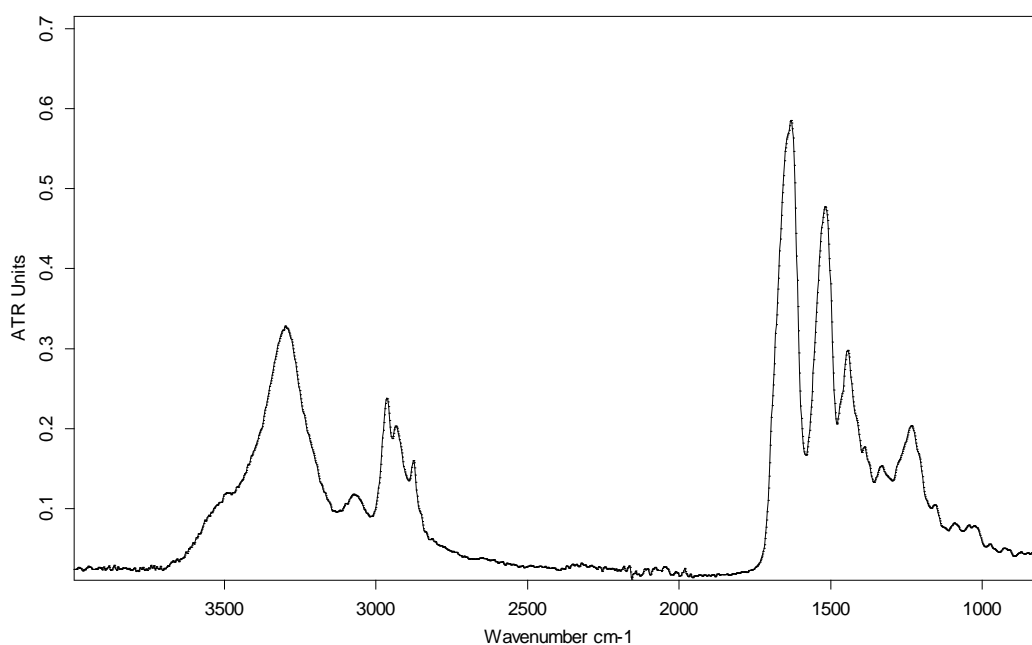


Figura 25: Espectro de FT-IR del polímero RGD-ciclo.

5.1.3.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se obtuvo un espectro de resonancia magnética nuclear de protón del RGD-ciclooctino preparando una disolución de 25 mg/mL de éste en dimetilsulfóxido deuterado;

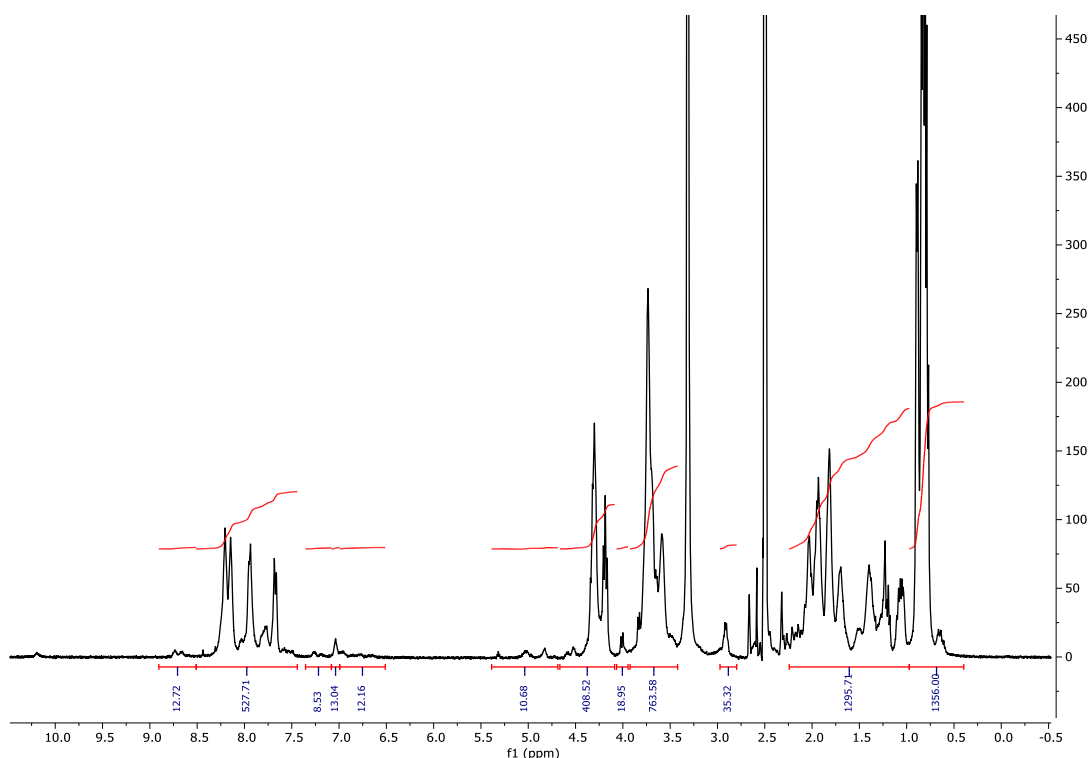


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H para el RGD-ciclo.

El análisis del espectro anterior es muy similar al que se encuentra en el apartado 5.1.2.2.. Por lo tanto, también se toman como referencia los protones de los CH_3 que aparecen a un desplazamiento cercano a 1 ppm y las variaciones en el número de protones teórico y experimental. Los 1295 protones de la zona de los CH_2 entre 1 y 2,5 ppm es bastante similar a la suma de los 827 y 382 protones teóricos que deberían salir. Por su parte, la suma de 763, 408 y 10 es próxima a los 1244 CH_2 . Por último, los protones de los NH suman un total de 539 (527+12) que debería haber sido parecido a 570. Como para el caso del RGD-azida, el ajuste de la línea base y la complejidad del polímero, provoca que los valores del número de protones se alejen del número teórico.

Además, los picos que nos permiten determinar la modificación química también aparecen aproximadamente a 3, 4 y 7 ppm; sin embargo, el pico a 4 ppm se corresponde al hidrógeno del ciclo ciclopropano. Dicha señal debería tener la misma integral que la señal del hidrogeno del nuevo protón amídico resultante de la modificación de los protones del grupo amino de la lisina que sale aproximadamente a 7 ppm. Este último, nos indica que se han modificado aproximadamente 13 protones indicándonos que son 13 grupos amino de las lisinas del polímero puro las que se han modificado. Por último, los protones del metileno unido al NH de las lisinas modificadas corresponden a la señal a 3 ppm cuya integral, experimentalmente,

corresponde con un valor de 35. De forma idéntica al espectro del RGD-azida nos vamos a fijar en el pico a 7 ppm para ver el porcentaje de modificación.

El porcentaje de sustitución es por tanto del 54,2% sabiendo que se ha utilizado una equivalencia de 0,6 el rendimiento es del 90,3% tratándose de un valor adecuado para el recubrimiento de membranas porosas de PVDF.

5.1.3.3. *Espectrometría de masas con tiempo de vuelo*

A partir de la espectrometría de masas se puede determinar el peso molecular del polímero que se ha modificado y el del polímero de partida. A partir de estos datos se calcula el porcentaje de conversión de los aminoácidos lisina del HRGD de partida.

El espectro de masas obtenido es el siguiente;

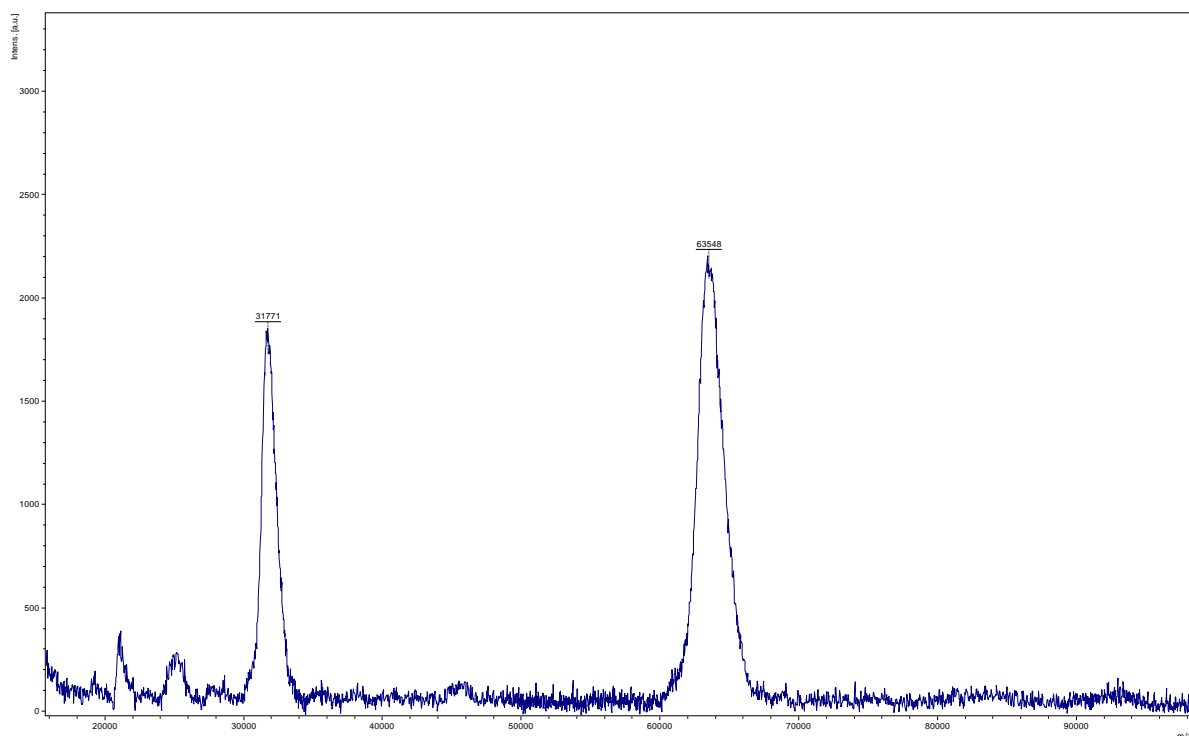


Figura 27: Espectro de masas MALDI-ToF de RGD-ciclo.

El segundo pico del espectro se corresponde con el M^+ mientras que el primero es el $M^+/2$. Por lo tanto, el peso molecular final corresponde con el obtenido en el segundo pico del *Gráfico 6* y es 63548 g/mol. aproximadamente. El peso molecular del HRGD de partida es 60661 g mol⁻¹, pudiéndose calcular el número de lisinas que se han modificado a través de la fórmula del apartado 5.1.2.3.

El PM del producto es el peso molecular de los átomos que se introducen en la reacción de modificación, que se corresponde a;

$$C \left(12 \frac{g}{mol} \cdot 11 \right) + O \left(16 \frac{g}{mol} \cdot 2 \right) + H \left(1 \frac{g}{mol} \cdot 13 - \frac{1g}{mol} \right) = 176g/mol$$

El número de lisinas que se han modificado resulta de 16,4 y conociendo que en el polímero HRGD6 hay 24 lisinas libres, el porcentaje de conversión correspondería a un 66,7%.

5.2. Recubrimiento de las membranas porosas de PVDF

En este apartado se va a explicar de forma más detallada el resultado obtenido en el proceso de recubrimiento de membranas porosas de fluoruro de polivinilideno mediante tecnología LbL. En la *Figura 28* se muestra un esquema de la metodología utilizada para recubrir las membranas con dos bicapas. Estas bicapas se forman por inmersión, de forma alternada, en la disolución de VKV-N₃ y, posteriormente, de VKV-ciclooctino tal como se explica en la sección de Materiales y Métodos.

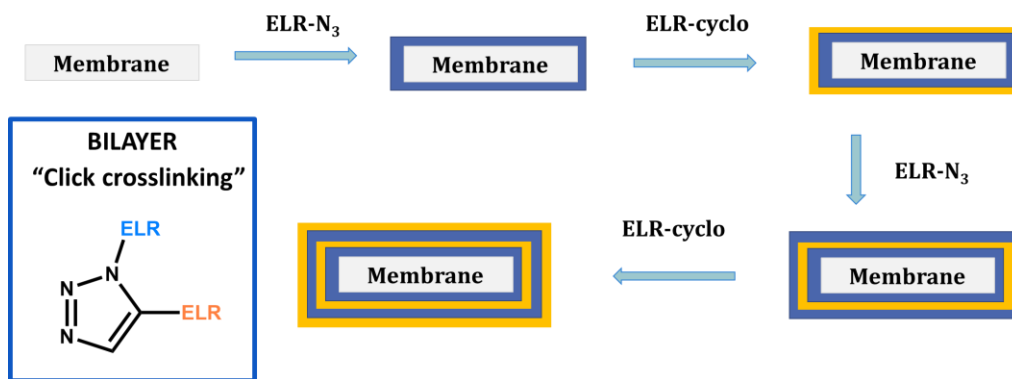


Figura 28: Esquema de recubrimiento de las membranas de PVDF mediante la técnica de inmersión LbL.

Antes de proceder con dicho recubrimiento es necesario realizar pruebas de marcaje de las membranas, así como optimizar los diferentes parámetros de activación y de reacción. Posteriormente se procede con el recubrimiento de las membranas empleadas previamente en un trabajo previo(2) y que procedían de la Universidad Politécnica de Valencia con la que se está realizando este proyecto en conjunto. Tras realizar las pruebas pertinentes con estas membranas, el objetivo era proceder con el recubrimiento de un nuevo lote de membranas porosas piezoeléctricas de PVDF, utilizando las condiciones óptimas establecidas con anterioridad. Debido a la situación excepcional producida por la pandemia del COVID-19, este último recubrimiento, así como su caracterización posterior, no se pudo realizar.

5.2.1. Optimización de recubrimiento de membranas porosas de PVDF.

5.2.1.1. Prueba de marcado de membranas

Antes de proceder con el recubrimiento de las membranas se realizaron pruebas de marcaje de éstas. El marcaje se efectuó, tanto con una aguja como con la punta de un clip, sobre la cara brillante (menos porosa) de una porción de membrana de prueba. Con ayuda de unas pinzas para sujetarla se procedió con el marcaje. Se optó por la opción de poner numeración,

en vez de marcarlas con una R como se había realizado en trabajos previos, con el objetivo de poder diferenciarlas a cada una por separado. Se llegó a la conclusión de que era más fácil y preciso utilizar la aguja. En la experimentación, se cortaron las membranas con el tamaño requerido y se efectuó el marcaje final de las mismas.

5.2.1.2. Parámetros optimizados en trabajos previos.

Optimización del tiempo de tratamiento con plasma cleaner

En trabajos previos(2) se evaluó este parámetro con el objetivo de ver si la variable del tiempo era crucial para el aumento de la hidrofiliidad de la superficie de las membranas. Para ello lo que se realizó fue tomar diferentes porciones de dos tipos de membranas y se colocaron en la cámara de plasma con la cara porosa hacia arriba (para activar la cara que va a permanecer en contacto con los cultivos celulares) y se realizaron los ensayos de activación a diferentes tiempos. Los parámetros de flujo y de presión siempre se mantuvieron constantes (20 ml/min y 600 mTorr) y se realizaron 4 pruebas a diferentes tiempos: 1, 5, 20 y 30 minutos, de manera independiente. Con objeto de determinar si se había producido aumento de hidrofiliidad con el tiempo de exposición al plasma, se llevaron a cabo medidas del ángulo de contacto de una gota de agua sobre las superficies activadas. Como los valores del ángulo apenas variaban con el tiempo de exposición del plasma, se concluyó que un mayor tiempo de acción del plasma no mejoraba la hidrofiliidad de las superficies y se tomó como óptimo el menor tiempo investigado, para evitar el desgaste de las membranas.

Para el tiempo establecido como óptimo, 1 minuto, sumergiendo las superficies en agua milliQ, la cara menos porosa salía completamente seca y la porosa estaba humedecida, lo que reflejaba que aumentaba su hidrofiliidad, un hecho que resulta favorable para el recubrimiento buscado.

Influencia de la concentración y el orden de las disoluciones en el recubrimiento

Es necesario conocer qué concentración de cada uno de los polímeros utilizar y en qué orden comenzar el recubrimiento. Para ello, se evaluaron en un trabajo previo(2) concentraciones de 10 mg/mL y 25 mg/mL tanto para VKV-ciclo como VKV-azida, y se observó si el procedimiento resultaba mejor comenzado el recubrimiento con las disoluciones de VKV-ciclo o VKV-azida. Mediante los resultados obtenidos para los recubrimientos, y fijándonos en la variación de peso de las membranas (masa de recubrimiento), FTIR y la medida de ángulos de contacto, se llegó a la conclusión de que se producía un mejor recubrimiento cuando se comenzaba, como primera etapa, con la disolución de VKV-azida y en una concentración de 25 mg/mL.

5.2.2. Protocolo de recubrimiento de las membranas

5.2.2.1. Recubrimiento de las membranas prueba

El recubrimiento de las membranas se realiza mediante la técnica “layer by layer”, una vez establecidos todos los parámetros necesarios para que el recubrimiento de la superficie de

estas membranas sea el óptimo posible. Como se mencionó en el apartado de métodos 4.3.2.2. se trata de formar una bicapa con dos tipos de disoluciones: VKV-Azida y VKV-Ciclo. Las capas se mantienen unidas entre ellas debido a una reacción tipo “click” entre el grupo azido y el ciclooctino de cada una de las disoluciones utilizadas, lo que conduce a la formación de un heterociclo derivado del triazol como nexo de unión entre cadenas.

El proceso de recubrimiento de la superficie de las membranas consta de una serie de pasos ya mencionados en el apartado de métodos. En este trabajo se ha llevado a cabo el recubrimiento de cuatro membranas según la metodología LbL, utilizando las disoluciones de los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo de concentración 25 mg/mL y depositando en primer lugar la disolución de VKV-N3 según los parámetros de trabajo previamente establecidos como óptimos.

5.2.3. Caracterización de membranas piezoeléctricas porosas recubiertas

Una vez realizado el recubrimiento LbL es necesario evaluar dicho recubrimiento. Para ello, se evaluó la variación del peso de las membranas antes y después del recubrimiento, el ángulo de contacto de las membranas antes y después del recubrimiento y se realizó un análisis comparativo de espectroscopía IR. En base a estos datos obtenidos se sacarán las conclusiones pertinentes.

5.2.3.1. Variación de peso y medida de ángulos de contacto

La variación de peso de las membranas antes y después del recubrimiento es un parámetro que nos permite cuantificar la cantidad de polímero que ha quedado adherido. Los datos de las variaciones de peso se encuentran en la *Tabla 4*.

Del mismo modo, la medición del ángulo de contacto evalúa la presencia de la última capa de recubrimiento, puesto que se produce un cambio de la hidrofobicidad en las superficies tras el recubrimiento: antes del recubrimiento la superficie es muy hidrofóbica y tenderá a “repeler” el líquido, por lo que el ángulo será más elevado que tras el recubrimiento, donde el líquido (agua) se verá más atraído por la superficie y, por lo tanto, se extenderá. Las medidas se encuentran en la *Tabla 4*.

Muestras	P ₀ (mg)	P _f (mg)	ΔP (mg)	ΔP/S (mg/cm ²)	ángulo de contacto (°)
1	13,17	13,43	0,26	0,26	85, 0 ± 1,07
2	12,19	11,24	-0,95	-0,95	n.d.
3	12,62	12,94	0,32	0,32	90,3 ± 5,89

4	12,49	12,86	0,37	0,37	81,9± 6,08
---	-------	-------	------	------	------------

Tabla 4: Resultados de la variación de masa y ángulo de contacto.

Nota: La superficie de las membranas es de 1 cm².

Los resultados obtenidos para la variación de peso de las membranas muestran un recubrimiento medio de 0,32 g/cm². En la membrana 2, sin embargo, los resultados son un tanto extraños debido a que no sólo no hay un aumento en el peso, sino que hay una pérdida del mismo tras el recubrimiento. Esto se puede deber a que, a causa de la manipulación de las membranas, ésta se rompió por una esquina y el resultado fue que el peso medido no era el de toda la superficie recubierta, realmente. Nos planteamos en un futuro la utilización de otro tipo de pinzas con una punta menos abrasiva, de manera que, para el siguiente lote definitivo de membranas, y realizando pruebas previamente con ellas, nos aseguremos de que mantienen la integridad de las mismas.

Por otra parte, se realizaron medidas del ángulo de contacto de las muestras 1, 3 y 4 después del recubrimiento. Para ello se realizaron un mínimo de 5 medidas del ángulo de contacto con cada superficie. En la *Tabla 4* se recoge la media de dichos datos junto con la desviación estándar de dicha media.

El ángulo de contacto de las membranas antes del recubrimiento tenía un valor de $133,2^\circ \pm 1,4^\circ$. Sin embargo, las medidas obtenidas para las membranas recubiertas son inferiores o cercanas a 90° , lo que nos sugiere que las membranas se han recubierto satisfactoriamente. Los valores “bajos” de las desviaciones estándar determinan un recubrimiento homogéneo de las superficies.

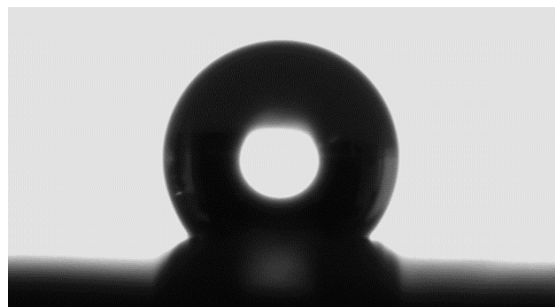


Figura 29: Medida de ángulo de contacto: $133,2 \pm 1,4$ (°) (de la membrana sin activar).

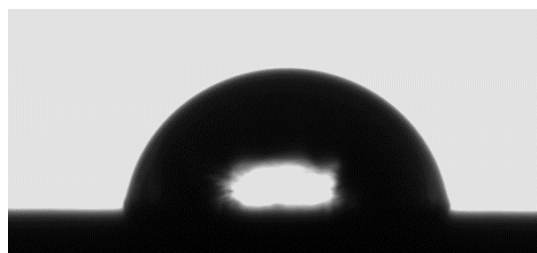


Figura 30: Medida ángulo de contacto: $84,4 \pm 2.2$ (°) de una de las membranas recubiertas.

5.2.3.2. Espectros de infrarrojo (IR)

Otra técnica empleada para la evaluación del recubrimiento de las membranas es la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier. Se trata de una técnica que nos permite detectar si se ha producido el recubrimiento de las membranas debido a que nos proporciona información sobre los grupos funcionales presentes en la superficie de éstas, cuando se compara con el espectro de IR de las membranas no recubiertas. La presencia en el espectro de FTIR-ATR de grupos funcionales no presentes en la membrana de PVDF de partida y correspondientes a los grupos funcionales presentes en la estructura proteica de los ELRs utilizados para el recubrimiento, nos permite corroborar la presencia de una capa de ELR presente sobre las membranas porosas.

El estudio del espectro de la membrana 3 (*Gráfico 7*) nos permite determinar que se ha producido el recubrimiento de la superficie, debido a que aparecen señales de grupos funcionales característicos de los polímeros utilizados, como los grupos C=O amídicos a 1800 y 1750 cm^{-1} , o los grupos N-H amídicos, que presentan un pico ancho de absorción por encima de los 3000 cm^{-1} . En dicho espectro también aparecen las señales de absorción correspondientes a la membrana de PVDF por debajo de 1600 cm^{-1} , como se muestra en el espectro FTIR de la membrana sin recubrir (*Gráfico 7, espectro en negro*).

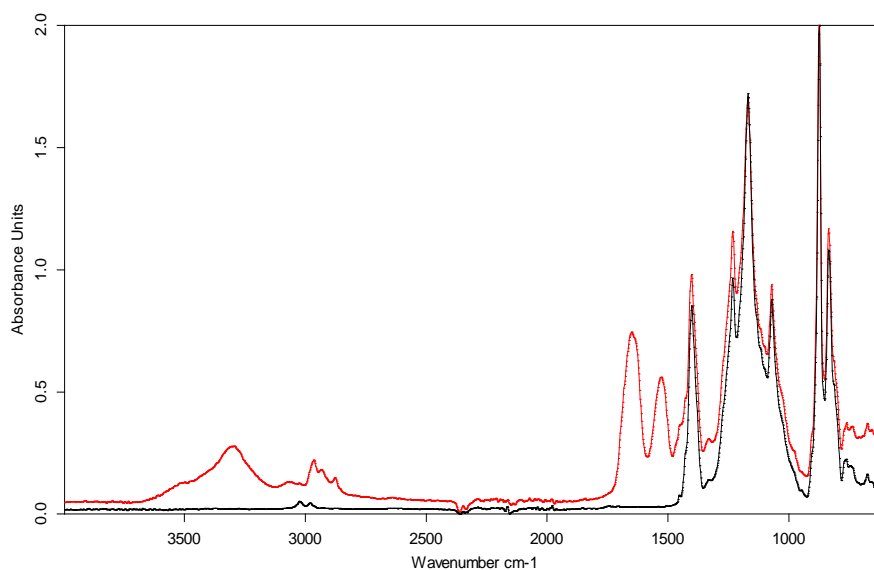


Gráfico 7: Espectro de FTIR de una membrana de PVDF recubierta mediante la técnica LbL con VKV-ciclo y VKV-azida (rojo) y de una membrana de PVDF sin recubrir (negro).

La parte experimental de este trabajo concluyó de forma prematura debido a la situación excepcional provocada por el virus COVID-19. Por esta razón no se llevaron a cabo más tareas en el laboratorio; por ejemplo, no se han podido repetir algunas medidas defectuosas y se ha completado con un estudio bibliográfico enfocado en el tema que nos concierne.

6. Estudio bibliográfico

6.1. Influencia del motivo peptídico RGD en la diferenciación osteogénica de células mesenquimales

Se va a realizar un estudio bibliográfico acerca de cómo afecta el motivo peptídico RGD, presente en proteínas de la matriz extracelular, en la diferenciación de células mesenquimales de cara a su aplicación en ingeniería de tejidos óseos. El objetivo es observar la influencia de este péptido RGD, una vez incluido en la estructura de diferentes andamios moleculares que mimetizan la matriz extracelular. Estos andamios proporcionan microambientes adecuados a las células madre mesenquimales humanas (CMMhs) que permiten la diferenciación osteogénica promovida gracias a la existencia de este motivo peptídico mediante diferentes vías de señalización celular.

6.1.1. La célula

La célula es la unidad anatómica y fisiológica de los seres vivos. Las células se dividen principalmente en dos clases diferentes según la definición y localización de su núcleo. Las células **procariotas**, como las bacterias, carecen de pared nuclear, mientras que las células **eucariotas** presentan una envoltura bien definida que separa el material genético del resto del citoplasma. Las células procariotas son generalmente más simples y pequeñas que las eucariotas, debido a la ausencia del núcleo, a su genoma mucho menos complejo y a que no contienen orgánulos citoplasmáticos o citoesqueleto. Sin embargo, aun presentando estas diferencias, ambas descienden desde un ancestro común. Las células surgieron hace al menos 3800 millones de años gracias a la aparición de forma espontánea de las primeras macromoléculas orgánicas, como proteínas y ácidos nucleicos que, tras su evolución, formaron lo que se conoce como las primeras células, cuyo desarrollo metabólico y funcional las ha llevado a convertirse en las células actuales(65).

Las células procariotas se dividen en dos grupos: las **arqueobacterias**, capaces de vivir en condiciones extremas, y las **eubacterias**, que incluyen a las bacterias comunes presentes en la actualidad; ambas se diferencian desde el principio de su evolución. Por su parte, las células eucariotas presentan un núcleo bien definido, están rodeadas por la membrana plasmática, contienen ribosomas y orgánulos membranales que llevan a cabo importantes actividades metabólicas como, por ejemplo, las mitocondrias y los cloroplastos. El citoesqueleto es una estructura formada por una red de filamentos proteicos que se extiende a lo largo del citoplasma, determinando tanto su forma como la organización estructural del mismo(1). Por otra parte, es importante comprender los mecanismos que controlan, con elevada especialización y complejidad, tanto el crecimiento como la proliferación y la diferenciación celular; siendo su conocimiento aun actualmente un gran desafío para la biología celular y molecular(65).

6.1.1.1. *Desarrollo de organismos multicelulares*

Las bacterias y algunos organismos eucariotas están formados por una única célula y por ello se los conoce como organismos unicelulares. Las levaduras son los organismos eucariotas unicelulares más simples. Sin embargo, existen otros eucariotas unicelulares mucho más complejos, con un contenido en ADN similar al de las células humanas, y que están especializados en funciones como la fotosíntesis o la captura e ingestión de otros organismos como alimento, como son, por ejemplo, las amebas. Por su parte, los organismos multicelulares evolucionaron a partir de los eucariotas unicelulares hace unos 1700 millones de años al formarse los primeros agregados multicelulares. La especialización y evolución de estos primeros organismos multicelulares ha proporcionado la complejidad y diversidad observada en muchos tipos de células que componen las plantas y animales, incluidos los seres humanos de hoy en día(65).

El ser humano está formado por más de 200 tipos de células diferentes que conforman hasta cinco tipos principales de tejidos(65);

- **Tejido epitelial.** Las células epiteliales forman láminas que recubren la superficie del cuerpo y delimitan órganos internos. Existen diversos tipos de células epiteliales especializadas en una función específica como: protección (piel), absorción y secreción.
- **Tejido conectivo.** Conformado por el hueso, el cartílago y el tejido adiposo, cada uno de los cuales se forma a partir de células especializadas como osteoblastos, condrocitos y adipocitos, respectivamente.
- **Sangre.** Contiene diferentes tipos de células: glóbulos rojos o eritrocitos, que se encargan del transporte de oxígeno; granulocitos, monocitos y macrófagos, involucrados en las reacciones inflamatorias; y linfocitos, necesarios para la respuesta inmune.
- **Tejido nervioso.** Las neuronas, células que forman este tipo de tejido, están especializadas en la transmisión de señales nerviosas a lo largo del organismo.
- **Tejido muscular.** Los diferentes tipos de células musculares se encargan de la producción de fuerza y movimiento.

Debido a que se va a realizar un estudio de cómo el dominio peptídico RGD influye en la diferenciación osteogénica de células mesenquimales humanas, se hace necesario conocer a grandes rasgos la composición y funciones del tejido óseo.

6.1.1.2. *Células madre*

La peculiaridad de las conocidas como células madre es que pueden dividirse para producir células hijas, las cuales pueden diferenciarse o permanecer como células madre. Además, se

autorrenuevan y sirven como fuente de producción de células diferenciadas a lo largo de la vida.

Todas las células poseen un tiempo de vida limitado, desde un día hasta algunos meses, y son producidas de forma continua por la división de una célula madre común, una célula madre pluripotencial. Los descendientes de una célula madre pluripotencial siguen una vía de diferenciación específica. Estas últimas continúan proliferando y sufren varios ciclos de división a medida que se diferencian. Sin embargo, una vez que se encuentran completamente diferenciadas, cesan su proliferación, de modo que el mantenimiento de las células diferenciadas depende de la continua proliferación de la célula madre pluripotencial(65).

Aplicaciones médicas de las células madre

Las células madre debido a su capacidad de replicarse y diferenciarse para dar lugar a variedad de tipos celulares suscitan un enorme interés en el campo de la biomedicina. Las células madre embrionarias (ES) son las que poseen mayor capacidad de diferenciarse y se encuentran en embriones tempranos y pueden dar lugar a todos los tipos celulares diferenciados de los organismos adultos. En 1998, dos grupos de investigadores publicaron el primer aislamiento de células madre embrionarias humanas, de modo que empezó a surgir la posibilidad de que éstas pudieran ser utilizadas en aplicaciones médicas. Debido a que las células madre embrionarias pueden obtenerse a partir de embriones que se han producido por la transferencia de núcleos adultos en oocitos, ha surgido la posibilidad de la clonación terapéutica. Gracias a estos tratamientos ha surgido la esperanza de solucionar gran variedad de trastornos, enfermedades y diferentes lesiones, como la médula ósea. Sin embargo, el desarrollo de la clonación terapéutica conlleva cuestiones éticas, no sólo con respecto a la posibilidad de clonar seres humanos, sino con la destrucción de embriones que son la fuente de células ES. Ha surgido la posibilidad de emplear células madre aisladas a partir de tejidos adultos en vez de células ES, sin embargo, la capacidad de proliferación y potencial de desarrollo de las células madre adultas son limitadas con respecto a las células ES. Aunque sigan existiendo muchos retos en este campo de investigación, los posibles procedimientos con células madre abre un campo de posibilidades para el tratamiento de enfermedades humanas(65).

6.1.2. Rutas de señalización celular implicadas en la diferenciación celular

6.1.2.1. *Transducción de señales y citoesqueleto*

Además de las rutas de señalización que regulan variaciones en el metabolismo o en la expresión génica, en respuesta a hormonas y a factores de crecimiento, las funciones de la mayoría de las células se encuentran directamente influidas por el proceso de adhesión celular y la organización que posee el citoesqueleto. De este modo, los receptores de la membrana que se encargan de la adhesión celular inician rutas de señalización intracelular que regulan otros aspectos del comportamiento celular, en la que se incluye la expresión de los genes. De

esta manera, los componentes del citoesqueleto actúan como receptores y dianas en estas vías de señalización celular, integrando la variación en la forma y el movimiento celular con otras respuestas celulares(65).

6.1.2.2. *Integrinas y transducción de señales*

Las integrinas son los receptores principales encargados del anclaje de las células a la matriz extracelular. Además, interactúan con componentes del citoesqueleto en dos tipos de uniones célula-matriz: las adhesiones focales (sitios de adhesión celular con el entorno extracelular) y hemidesmosomas, promoviendo de este modo un vínculo estable entre la matriz extracelular y las células adheridas. Las integrinas, a parte de su papel estructural, sirven como receptores que activan vías de señalización intracelular, controlando la expresión de los genes y diferentes aspectos del comportamiento celular en respuesta a la adhesión celular(65).

Las integrinas contienen segmentos citoplasmáticos cortos que carecen de actividad enzimática. Sin embargo, otros segmentos de las integrinas proporcionan una respuesta inmediata a la interacción de éstas con diferentes componentes de la matriz extracelular, ya que se encuentran asociadas de algún modo a proteína-tirosina quinasas no receptoras que promueven la fosforilación de tirosinas proteicas. Una de las rutas de señalización a partir de integrinas implica la activación de una proteína-tirosina quinasa no receptora denominada **FAK** (Focal Adhesión Kinase) (*Figura 31*). Esta se localiza en las adhesiones focales y se fosforila rápidamente después de la unión de la integrina a componentes de la matriz extracelular como la fibronectina. La activación de FAK requiere la autofosforilación inducida por la agrupación de integrinas adheridas a la matriz extracelular, creando puntos de interacción para otras moléculas señalizadoras que contienen dominios SH₂, entre los que se encuentran los miembros de la familia Src de proteína-tirosina quinasas no receptoras que, a su vez, fosforilan otros puntos adicionales de FAK(65).

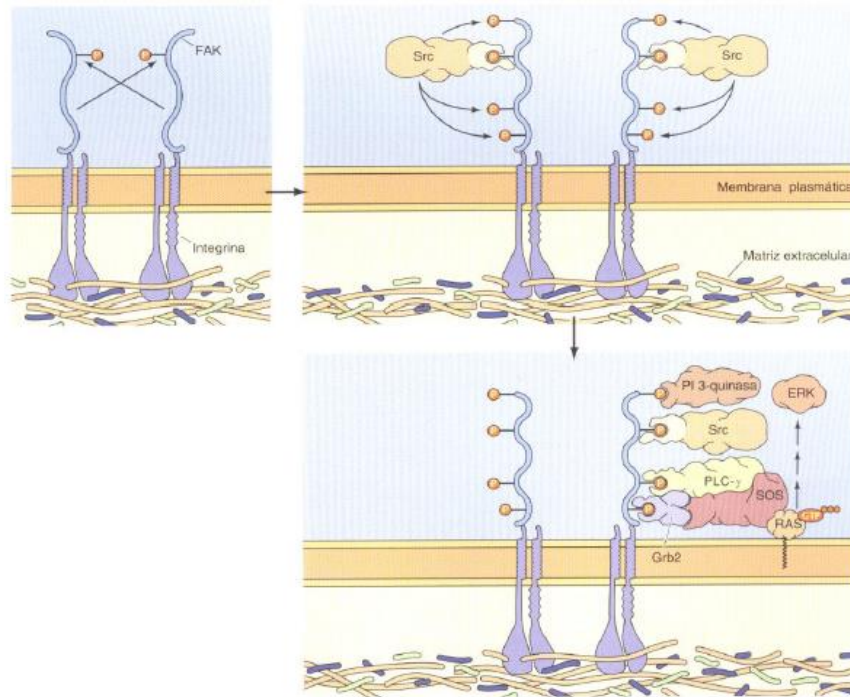


Figura 31: Señalización por integrinas. La unión de integrinas a la matriz extracelular provoca el agrupamiento de integrinas y la activación de FAK por el mecanismo de autofosforilación. Posteriormente, Src se une al dominio de autofosforilación de FAK y fosforila FAK en residuos adicionales de tirosina. Las fosfotirosinas de FAK actúan como sitios de unión para gran variedad de moléculas señalizadoras.

La activación de las proteína-tirosina quinasas FAK y Src por parte de las integrinas asocia la adhesión celular a las mismas vías de señalización que regulan la expresión génica, la proliferación celular y la supervivencia de la célula, que se activan en respuesta a los factores de crecimiento(65).

6.1.2.3. Ras, Raf y vía de las MAP quinasas

La vía de las MAP quinasas, que engloba una serie en cascada de proteínas quinasas, es una ruta de señalización muy conservada en la evolución que desempeña un papel clave en la transducción de señales en todas las células eucariotas. Los elementos más importantes de esta vía son una familia de proteínas-serina/treonina quinasas denominadas quinasas MAP (*Proteínas quinasas Activadas por Mitógenos*) que entran en actividad en respuesta a diversos factores de crecimiento y a otras moléculas señal, como aquellas que contienen el motivo peptídico RGD. En los organismos eucariotas “superiores”, entre los que se incluyen los mamíferos, las quinasas MAP regulan omnipresentemente el crecimiento y la diferenciación celular(65).

Las quinasas MAP mejor caracterizadas en las células de mamíferos son las pertenecientes a la familia de las ERK (Quinasas Reguladas por señales Extracelulares). La activación de ERK posee un papel central en la señalización de la proliferación celular inducida por factores de crecimiento que actúan a través de proteína-tirosina quinasas. Tiene lugar gracias a dos proteína-quinasa que están asociadas a receptores de factores de crecimiento mediante una

proteína de unión a GTP denominada Ras. La activación de Ras provoca la activación a su vez de la proteína-serina/treonina quinasa Raf, que fosforila y activa a una segunda proteína quinasa conocida como MEK (de MAP quinasa/ERK quinasa). La proteína quinasa MEK posee doble especificidad activando a los miembros de la familia ERK, fosforilando tanto residuos de treonina como de tirosina separados por un aminoácido. Una vez que ERK se activa, fosforila diferentes moléculas diana, entre ellas otras proteína quinasa y factores de transcripción(65).

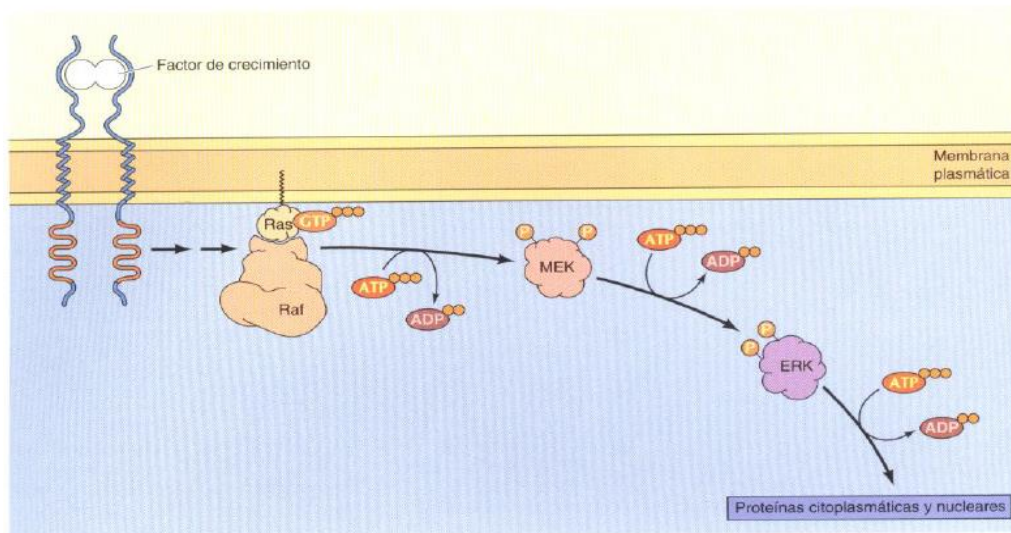


Figura 32: Activación de las quinasas MAP ERK. Debido a la unión de factores de crecimiento, se activa la proteína de unión a GTP ras, que interacciona con la proteína quinasa Raf. Esta última fosforila y activa a MEK, una proteína quinasa de doble especificidad, la cual activa a ERK fosforilándola en residuos treonina y tirosina (Thr-183 y Tyr-185). De este modo ERK fosforila a diversas proteínas citoplasmáticas y nucleares.

Las MAPKs de la familia ERK presentan dos isoformas: p44 ERK1 y p42 ERK2, con una homología del 83% aproximadamente. Las dos se activan por numerosos estímulos extracelulares, en particular estímulos mitogénicos. Dicha activación tiene lugar a través de una cascada de fosforilaciones regulada inicialmente por Ras, en la que participan las serina/treoninas citoplasmáticas de la familia Raf (c-Raf y B-Raf, principalmente) y la quinasa de especificidad dual MEK1 y 2(66) (*Figura 33 (izquierda)*). En estado basal, las ERKs se localizan fundamentalmente en el citoplasma, ancladas al mismo mediante su interacción con MEK. Al ser fosforiladas por MEK se rompe dicha interacción, las ERKs dimerizan y se distribuyen por toda la célula, translocándose también al núcleo. Hasta la fecha se han descrito más de 220 proteínas substratos de ERKs distribuidas en distintos compartimentos celulares, incluidos factores de transcripción nucleares (Myc, Elk y otros de la familia Ets); receptores y otras proteínas de membrana (EGFr, ENaC, Syk, GAB2), proteínas citoplasmáticas de variada naturaleza (Rsk, STAT5, MEK, PLA2, COX2, SOS); componentes del citoesqueleto (MAPs, calponina) y proteínas mitocondriales (Bcl-2), etc.(67). Mediante la activación de estos substratos las ERKs llevan a cabo su papel regulador de un sinnúmero de procesos biológicos como, por ejemplo, la diferenciación celular (*Figura 33 (derecha)*)(65).

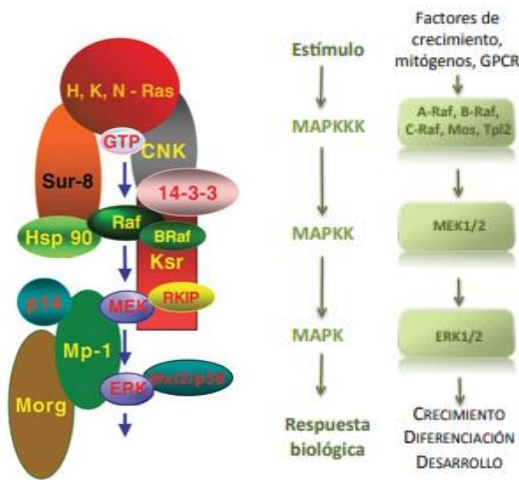


Figura 33: Esquema de la vía de transducción de señales Ras-ERK. Además de las proteínas que directamente componen la ruta, se muestran las principales proteínas que, mediante distintos mecanismos, ejercen funciones reguladoras sobre la ruta(68)(izquierda) y esquema de la cascada de señalización en la que participan ERK1/2. La cascada de señalización Raf-MEK-ERK puede ser activada por diferentes mitógenos y participa en diversas respuestas celulares (derecha).

6.1.3. Tejido óseo

El tejido óseo realiza una serie de funciones importantes englobadas en dos tipos diferentes: mecánicas y biológicas. Entre las funciones mecánicas se encuentran las de protección de órganos y diferentes sistemas corporales, el soporte de cargas y la función dinámica por la que el hueso actúa como una palanca donde se insertan huesos y tendones. Por otro lado, el tejido óseo también actúa como depósito de sales minerales, tiene función hematopoyética y regula la respuesta inmune(69).

El hueso está compuesto principalmente por tejido óseo, pero además presenta nervios, grasa, vasos sanguíneos, etc., y tiene la peculiaridad de que es un tejido conjuntivo duro debido al proceso de mineralización que experimenta(69).

Además de células (2% de la composición del hueso), el hueso se compone de una sustancia extracelular denominada matriz del hueso formada por una fracción orgánica (30% del total) y una fracción mineral (69% del total)(69).

Componente celular

El tejido óseo está formado por tres tipos de células diferentes(69):

- **Osteoblastos** o células formadoras de hueso: forman parte de la línea osteoformadora.
- **Osteoclastos** o células destructoras de hueso: forman parte de la línea de resorción ósea.
- **Osteocitos** o células maduras del hueso: forma parte de la línea osteoformadora.

Los osteocitos son las únicas células permanentes en el tejido óseo, ya que las otros dos tipos de células son elementos transicionales que permiten que el hueso esté en constante actividad, actuando en primer lugar las células destructoras y, finalmente, las formadoras(69).

6.1.3.1. Origen de las células óseas

Los osteoblastos son células que se forman a partir de células madre mesenquimales y que, a su vez, son progenitoras de los denominados pre-osteoblastos. Estos últimos se convierten en osteoblastos maduros y, finalmente, generarán osteocitos o células lineales. Aquellas células que no se transforman en ninguno de estos dos últimos tipos, se destruyen mediante apoptosis. Mientras los osteocitos derivan de los osteoblastos, los osteoclastos por su parte derivan de elementos macrofágicos y monocíticos de la médula ósea, es decir, de elementos sanguíneos(69).

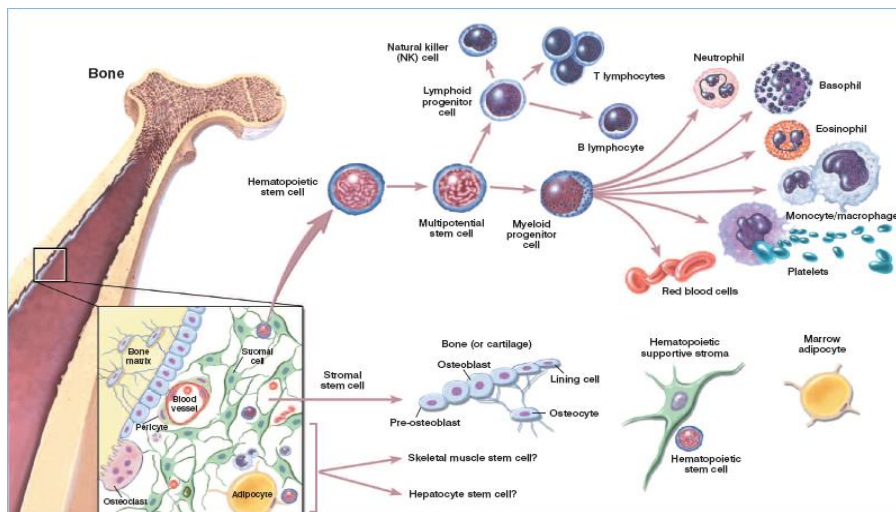


Figura 34: Diferenciación de células óseas(70).

Los osteoblastos son células muy activas productoras de elementos que conformarán la fracción orgánica del tejido óseo como colágeno, fosfatasas alcalinas o proteínas no colágenas. Se encargan de iniciar el proceso de resorción ósea. Se encuentran sobre la superficie ósea y producen una sustancia blanda denominada osteoide. Cuando estas células quedan incluidas en el hueso mineralizado pasarán a ser osteocitos (alrededor de un 30% se convierte en osteocitos, el resto, mueren por apoptosis). Los osteocitos están depositados en unas cavidades osteocitarias u osteoplastos con prolongaciones en conductos calcóforos. Estos últimos, se encargan de la homeostasis mineral y tienen orgánulos poco desarrollados(69).

Los osteoclastos se encargan de la destrucción de hueso (resorción ósea) y son las primeras células que actuarán para que luego se pueda formar el nuevo hueso. Participan, por tanto, en el mantenimiento de la homeostasis cálcica. Su efecto de destrucción del hueso se hace evidente gracias a que, en la parte de contacto entre el hueso y osteoclastos, el osteoclasto

desarrolla su actividad y destruye el hueso dejando una cavidades osteoclásticas o lagunas de Howship(69).

6.1.3.2. *Osteogénesis*

La osteogénesis o formación de los huesos puede llevarse a cabo mediante dos vías:

- 1) **Vía de osificación membranosa:** En un primer momento se produce el aumento de la vascularización del tejido y las células mesenquimales se sitúan alrededor de los vasos sanguíneos, constituyendo el centro primario de osificación. Posteriormente, algunas células mesenquimales se transforman en osteoblastos que captan el calcio en forma de cristales de hidroxapatita procedentes de la sangre materna; y a medida que se depositan en la matriz osteoide, ésta se endurece formando hueso. Cuando esto sucede, el osteoblasto queda atrapado en el interior y suspende su actividad osteógena para convertirse en osteocito(71). Los huesos de la bóveda craneal, de la mandíbula o del maxilar superior, entre otros, son de los pocos huesos que siguen esta vía(69).
- 2) **Vía de osificación endocondral:** La mayoría de los huesos de los organismos vertebrados se osifican a través de esta vía. Es uno de los procesos de desarrollo esquelético en los fetos y concluye con la producción del tejido óseo a partir de tejido cartilaginoso. Los huesos, durante el desarrollo embrionario, son un molde de cartílago hialino (tejido conjuntivo duro sin nervios o vasos sanguíneos que no se encuentra calcificado) que va siendo reemplazado de forma progresiva por tejido óseo en un proceso complejo (osificación indirecta)(72). Es en esta primera pieza esquelética de cartílago en la que aparecen las células madre mesenquimales, las cuales se diferencian a condroblastos. Posteriormente aparecen los vasos sanguíneos y osteoclastos que comienzan a osificarla, formando de esta forma el tejido óseo.

Los osteoblastos aparecen en el centro del hueso durante el desarrollo embrionario formando los denominados núcleos de osificación primaria que empieza su actividad osificando el hueso hacia arriba y hacia abajo. Las células destructoras del hueso son las responsables de desarrollar la cavidad medular del hueso. Inmediatamente después del nacimiento, y sobre todo en los extremos de los huesos largos, aparecerán osteoblastos que van a producir hueso, formando el centro de osificación secundaria. Los centros de osificación primaria que aparecen en el centro de los huesos se producen antes del nacimiento, mientras que los secundarios aparecen en otras épocas (no en periodo embrionario)(69).

6.1.3.3. *Diferenciación ósea*

La diferenciación celular es el proceso por el cual una célula cambia de un tipo celular a otro, que normalmente se encuentra más especializado. Las células que se encuentran diferenciadas son células maduras listas para cumplir su función particular. Cada tipo celular

tiene características, funciones, y tiempos de vida que son específicos, a pesar de que se hayan diferenciado a partir de una célula original o cigoto(73).

Las primeras células que proceden del cigoto se denominan **totipotenciales**, puesto que son capaces de diferenciarse en todo tipo de células especializadas. Este proceso comienza a los 4 días de desarrollo embrionario. De una célula totipotencial puede derivar un organismo que sea completamente funcional. A medida que se van diferenciando estas células, se restringe su potencial y dan lugar a células **pluripotenciales**, que pueden desarrollarse en varios tipos celulares, pero ya no en todos ellos, es decir, de estas células ya no podría derivar un organismo(73).

En tanto que avanza la diferenciación celular se van desarrollando los diferentes tejidos del organismo. Muchas de las células van a perder su capacidad de reproducción debido a la especialización y la maduración; sin embargo, otras células, como las células troncales o células madre, van a seguir conservando la capacidad de división. En los adultos, estas células sólo pueden diferenciarse en un tipo concreto de célula especializada como, por ejemplo, las células sanguíneas. A estas células madre indiferenciadas de un tejido que pueden diferenciarse a células especializadas de dicho tejido se las conoce como **multipotenciales** (células de la médula ósea que se convierten a células sanguíneas, por ejemplo)(73).

Las **células madre mesenquimales (CMM)** son células adultas multipotentes, capaces que autorrenovarse y diferenciarse a linajes mesenquimales como el osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico(74). Por otro lado, presentan características como la expresión de los antígenos CD73 (glicoproteína relacionada con mecanismos de adhesión celular), CD90 (marcador de precursores mesenquimales tempranos) y CD105(75)(76), que permiten identificar las CMM(77)(78). Adicionalmente, estas células son adherentes al plástico, lo que facilita su mantenimiento en cultivos celulares(79). Además, tienen propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas, haciéndolas atractivas para su empleo en protocolos de terapia celular (79)(80)(81).

En un estudio llevado a cabo por Rauch et al.(82) se caracterizaron los cambios transcripcionales y epigenéticos asociados a la diferenciación de osteoblastos a partir de CMM humanas. Con objeto de estudiar los mecanismos moleculares de especificación e inducción de genes ontogenéticos, estos investigadores analizaron segmentos de ADN denominados potenciadores, que regulan la transcripción y, por lo tanto, la expresión de un determinado gen. Estos potenciadores pueden estar presentes a cientos o miles de pares de bases río arriba o río debajo de un gen y se pueden considerar amplificadores de la expresión génica. Cuando se encuentran en una posición abierta, permiten la unión fácil de proteínas denominadas factores de transcripción (FT). Los elementos potenciadores y los FT interactúan con un gen para aumentar su expresión. Sin embargo, cuando los potenciadores se encuentran en una posición cerrada, los FT no se pueden unir a ellos y disminuye la expresión génica. Se observó

que los factores que regulan la expresión génica específica de los osteoblastos, como la fosfatasa alcalina asociada a la mineralización (ALPL), ya se encontraba en una posición abierta en las CMM indiferenciadas, lo que permitía de este modo un mejor acceso a los FT y diferenciación de un osteoblasto. Se identificaron hasta 12 factores de transcripción claves, que estaban altamente expresados y que podían unirse a motivos específicos (secuencias de ADN) en las regiones potenciadoras regulando de este modo la expresión génica que da lugar a la osteogénesis. El silenciamiento de estos factores de transcripción inhibió de forma significativa la diferenciación de las CMM en un osteoblasto, disminuyó la expresión de ALPL y moderó la mineralización(82)(83).

6.1.4. Influencia del motivo peptídico RGD en la diferenciación de células mesenquimales

6.1.4.1. *Matriz extracelular y motivo RGD*

La matriz extracelular es el componente extracelular de los tejidos que no sólo proporciona el andamiaje físico para las células, sino que se encarga de transmitir los estímulos bioquímicos y biomecánicos necesarios para la morfogénesis, diferenciación y la homeostasis de los tejidos. Se compone principalmente de agua, proteoglicanos y diferentes tipos de proteínas. Cada tejido tiene una MEC con una composición y topología únicas generadas en el momento de desarrollo de los tejidos. La adhesión celular a la MEC sucede a través de receptores de membrana como son las integrinas, receptores de dominio de la discoidina y los sindecanos(84)(85)(86)(87). Por otro lado, la MEC es una estructura muy dinámica que se remodela constantemente, de manera enzimática o no enzimática, y cuyos componentes se encuentran sujetos a innumerables modificaciones post-transduccionales. La matriz extracelular proporciona las propiedades mecánicas y bioquímicas a cada órgano, como su resistencia a la tracción y a la compresión y su elasticidad, además de dirigir la organización morfológica y la función fisiológica esencial de los tejidos, mediante factores de crecimiento (GFs) e interactuando con los receptores de la superficie celular para provocar la transducción de la señal y regular la transcripción de los genes(88).

La MEC está compuesta por dos grandes bloques de macromoléculas: proteoglicanos (PG) y proteínas fibrosas. Entre estas últimas se encuentra el colágeno, la elastina, la fibronectina y la laminina. Los PGs ocupan la mayor parte del espacio intersticial extracelular y se encargan de proporcionar las propiedades de resistencia mecánica de la MEC(88).

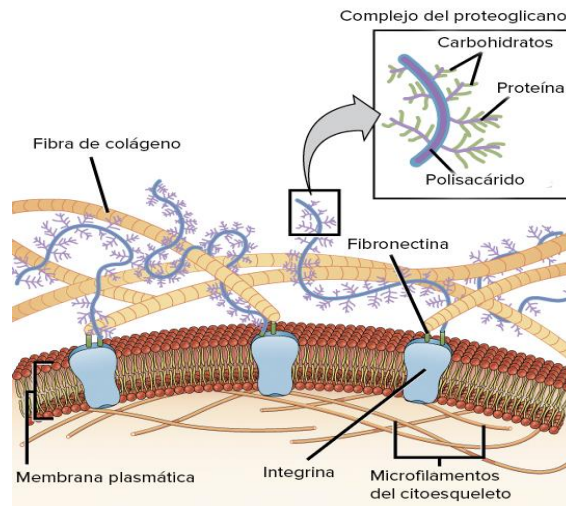


Figura 35: Esquema de la composición de la matriz extracelular(89).

La fibronectina es una proteína de la MEC que une otras proteínas también de la MEC (colágeno, fibrina, proteoglicano y fibronectina) y moléculas de adhesión celular (integrinas y sindecanos). Estas proteínas juegan un papel clave en el comportamiento celular como la adhesión, migración y diferenciación, así como en la morfogénesis y cicatrización de heridas. Existen en los humanos más de 20 isoformas de empalme alternativo de fibronectinas y estructuralmente es una glicoproteína dimérica de alto peso molecular (aprox 440 kDa), compuesta por dos subunidades casi idénticas (aprox 250 kDa) unidas de forma covalente por enlaces disulfuro (Figura 36)(90). Cada una de estas subunidades consta de tres tipos diferentes de repeticiones: tipo I, II y III(91).

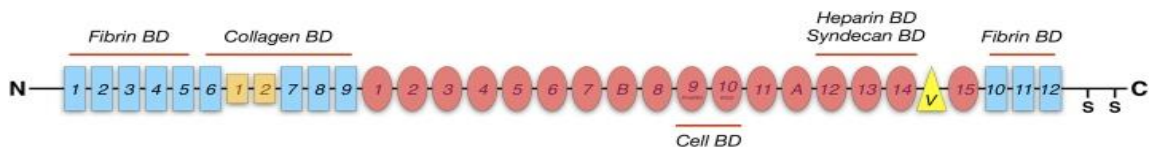


Figura 36: Estructura de la fibronectina. Aparecen las repeticiones y los dominios de unión.

La comunicación de las fibronectinas con las células ocurre a través de la unión a la integrina. Las integrinas son los principales receptores de la superficie celular que median la adhesión a la matriz celular, alguno de los cuales se expresan de manera ubicua, mientras que otros son específicos de cada tipo de tejido. En cuanto a su estructura, las integrinas son heterodímeros formados por el acoplamiento de subunidades $18\text{-}\alpha$ y $8\text{-}\beta$ que se unen de manera específica a diferentes moléculas de la MEC. Cada subunidad presenta un gran dominio extracelular con una enorme especificidad y selectividad para determinados ligandos de la MEC, un dominio transmembrana y una corta cola citoplasmática. Las integrinas no poseen actividad enzimática intrínseca, por ello la cola citoplasmática de la subunidad β está estructurada para acoplarse a las moléculas de señalización intracelular después de la dimerización y para activar la vía de la transducción mediada por la integrina(92)(93).

Hay muchas integrinas diferentes que reconocen la fibronectina (FBN) y cuya unión depende en gran medida de la conformación estructural de esta última y de la sensibilidad de los residuos de tipo III al desdoblamiento. Un ejemplo de receptor clásico de la FBN es la integrina $\alpha 5\beta 1$, la cual reconoce y se une a la FBN mediante una secuencia tripéptido aislada compuesta por arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que se encuentra en la décima repetición de tipo III de la FBN que se coordina con otra secuencia, la prolina-histidina-serina-arginina-asparagina (PHSRN) de la novena repetición adyacente de tipo III de la FBN(94)(91).

Este motivo RGD es conocido como la secuencia peptídica mínima y esencial para la adhesión celular articulada por las integrinas. Desde su descubrimiento se han encontrado secuencias RGD de adhesión celular en muchas otras proteínas de la matriz extracelular como la vitronectina, fibrinógeno, trombospondina o laminina. Se sabe que alrededor de la mitad de las 24 integrinas conocidas se unen a las moléculas de la matriz extracelular a través de este motivo RGD(3).

6.1.4.2. Diferenciación de células madre mesenquimales potenciadas por andamios moleculares funcionalizados con el motivo RGD

Se han realizado estudios sobre la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales promovidas por diferentes andamios moleculares formados por péptidos anfipáticos(95), hidrogeles de OPF (oligo-(poli(etilenglicol) fumarato)(96), híbridos de quitosano-hidroxiapatita (CS-HA)(97) y diacrilato de poli(etilenglicol) (PEODA)(98). Estos tipos de andamios no sólo han de ser biocompatibles y proporcionar soporte estructural a las células, sino que deben estimular la adhesión, proliferación y viabilidad de las células. Para ello, va a ser necesario en muchos casos incorporar en estos andamios, motivos proteicos o señales mecánicas, que serán los que interaccionen con las moléculas de señalización de las células. Por esta razón, en todos estos andamios anteriores se incorporó el motivo peptídico RGD con el objetivo de demostrar su potencial osteoinductivo para este tipo de células y de esta forma poder aplicarlos como futuros materiales en ingeniería de tejidos óseos(97).

La adhesión celular es la capacidad que poseen las células pluricelulares de unirse a elementos del medio externo o a otras células. Sólo después de adherirse a la superficie adecuada y comenzar a extenderse, las células pueden diferenciarse y proliferar. Para mejorar la capacidad de adhesión celular al andamio, se pueden incorporar algunas moléculas de señalización y factores de crecimiento mediante uniones de tipo covalente o mediante interacciones más débiles tipo enlaces de hidrógeno o interacciones más débiles tipo enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas(97).

Zhiwei Qu et al.(97) incorporaron el motivo RGD en los andamios de CS-HA por adsorción física y confirmaron la adhesión celular inicial, diseminación y diferenciación hacia un fenotipo osteogénico de las células estromales de médula ósea (CMMs). Se evaluó la adhesión celular al cultivar las células mesenquimales en andamios CS-HA funcionalizados con dominios RGD,

utilizando los andamios no funcionalizados como control, mediante técnicas de microscopía confocal, fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, se realizaron ensayos con células madre mesenquimales viables (CMMVs) muertas/vivas tanto con microscopía de fluorescencia como en confocal. Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran que apenas aparecen células muertas y que las vivas se adhieren de forma homogénea a los poros del andamio de CS-HA funcionalizado con RGD. Por otro lado, las imágenes del ensayo de célula muertas/vivas con CMMs nos muestra a través de la microscopia confocal que cuando el andamio no presenta RGD hay un descenso acentuado de CMMs adheridas, lo que sugiere que el motivo peptídico RGD presenta un papel crucial en la adhesión de MSCs en los andamios CS/HA. En cuanto a las imágenes por SEM, una vez más se observó el comportamiento esperado, la adhesión de un mayor número de células cuando el andamio está funcionalizado(97). El efecto del RGD en la diferenciación celular de las CMMs se evaluó mediante medición de la actividad de la fosfatasa alcalina ALP. Para ello, las CMMs se cultivaron durante 14 días en CS-HA con y sin RGD, observándose que el RGD-CS-HA expresó fosfatasa alcalina en nivel mucho más alto (del 103%) que el andamio sin RGD. La ALP es una proteína marcadora de huesos de edad temprana y una enzima esencial para la osificación, y se trata de un marcador bien definido para la diferenciación de las CMMs a un linaje osteogénico. De esta forma se demostró que el RGD mejora la diferenciación hacia un fenotipo osteogénico. Los resultados de este estudio indicaron, por lo tanto, que los andamios RGD-CS-HA son adecuados y demuestran una adecuada adhesión y diferenciación osteogénica para poder ser aplicados en ensayos clínicos(97).

En otro estudio, llevado a cabo por Joel M Anderson et al.(95), se utilizaron andamios formados a partir de péptidos anfipáticos (PA) con diferentes motivos peptídicos como RGD, DGEA y KRSR, con el objetivo de evaluar la diferenciación osteogénica también de células madre mesenquimales humanas (CMMhs). Se descubrió que los andamios de PAs que contenían el dominio RGD promovían un mayor nivel de expresión fenotípica en comparación con los otros de DGEA o KRSR. Además, el potencial osteoinductivo se estudió con medios de cultivo que presentan o en ausencia de suplementos osteogénicos como dexametasona, β -glicerol fosfato y ácido ascórbico. La dexametasona, un glucocorticoide sintético, induce la diferenciación osteogénica en las CMM humanas (99)(100), y el β -glicerol fosfato (101) promueve la formación de una matriz mineralizada, actuando como una fuente potencial de iones fosfato, y generando finalmente osteocitos. En primer lugar, se evaluó la diferenciación provocada por los PA biofuncionalizados, en ausencia de estos suplementos, que viene promovida únicamente por el motivo peptídico RGD para valorar su eficacia terapéutica en condiciones fisiológicas. Finalmente se comparó con la diferenciación obtenida para los andamios de PA biofuncionalizados y en presencia de medios de cultivo con suplementos. Se evaluó mediante tinción histoquímica para la fosfatasa alcalina, realizando un análisis cuantitativo en tiempo real por PCR de los principales marcadores osteogénicos. Se comprobó que el PA modificado con RGD, junto con el medio con suplementos, mostraba los mejores

niveles de la fosfatasa alcalina y la expresión de genes osteogénicos en comparación con las otras superficies de control que no presentaban biofuncionalidad mostrando la sinergia del dominio RGD y los medios celulares con suplementos. Las respuestas osteoinductivas obtenidas se justifican en función de las interacciones de las integrinas con los motivos peptídicos específicos. El motivo RGD promueve interacciones mediadas por la integrina capaces de influir en las cascadas de señalización intracelular, presentando una mayor afinidad por la integrina alfa5-beta1 ($\alpha 5\beta 1$)(102). Además, se ha demostrado que la ruta de señalización de las MAP quinasas, en concreto la ERK1 y ERK2 pueden promover la diferenciación osteogénica vía intracelular(103). Finalmente se observa que la señalización mediada por la integrina $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ induce la diferenciación osteogénica de las CMMs preferentemente a través de la vía intracelular de FAK/ERK 1/2-MAPKs(104).

Sin embargo, se debe seguir investigando una solución para garantizar al máximo la osteogénesis promovida independientemente de alguna estimulación exógena, lo que permitiría aplicaciones clínicas in vivo. La versatilidad de los PA osteoinductivos, especialmente los que contienen el ligando RGD, es muy prometedora para las futuras terapias regenerativas del tejido óseo pudiéndose mejorar la funcionalidad biológica de estos combinando dos o más ligandos bioactivos e investigando los mecanismos de las vías osteogénicas iniciadas por dichos motivos peptídicos(95).

Los hidrogeles de OPF modificados con RGD presentan también un gran potencial en la inducción de la diferenciación y mineralización in vitro de CMMs cultivadas en un medio sin suplementos osteogénicos solubles(96). Cultivando las CMM durante 16 días en hidrogeles de RGD-OPF, el número de células adheridas entre los días 0 y 5 dependía de la concentración de péptidos, mientras que en el día 10 este valor ya comenzó a ser independiente de la concentración. Además, se detectó un marcador característico de la diferenciación, la osteopontina (OPN), para cada grupo de prueba. Sin embargo, los niveles de OPN fueron significativamente mayores en los RGD-OPF en comparación con, por ejemplo, en poliestireno tratado para cultivos de tejidos. En conjunto, los resultados indicaron que el péptido de señalización (RGD) crea un microambiente favorable para que las CMM se diferencien en osteoblastos y produzcan matriz mineralizada. Por ello, el uso de hidrogeles de OPF como andamios para la regeneración ósea guiada resulta prometedor para futuras aplicaciones en el terreno de la ingeniería de tejidos(96).

Como se mencionó al inicio de la sección, el otro hidrogel que puede emplearse como andamio celular es el diacrilato de poli(etilenglicol) (PEODA). En un estudio realizado en la Universidad de Johns Hopkins(98), se pretendía que este hidrogel no sólo actuara como un soporte estructural para las células, sino que interactuase con éstas de una forma biológica específica. Para ello fue necesario incorporar covalentemente el péptido de adhesión celular RGD y se evaluó su efecto de dosificación sobre la osteogénesis de CMMs en un entorno tridimensional. La expresión de la osteocalcina (OCN) y la fosfatasa alcalina aumentó de forma significativa al

incrementar la concentración de RGD. Cuando se comparaba con la ausencia RGD, el RGD de 2,5 mM mostró un aumento del 1344% en producción de ALP y un aumento de 277% en la acumulación de OCN. Por tanto, se pudo concluir que el hidrogel PEODA-RGD promovía la osteogénesis de las CMMs de manera dependiente a la dosis, siendo 2,5 mM la concentración óptima de hidrogel(98).

7. Conclusiones

Se ha llevado a cabo la modificación química y caracterización de biopolímeros ELRs, se han recubierto membranas de PVDF mediante la metodología Layer by Layer con otros biopolímeros ELRs a los que se les ha introducido los grupos azido y ciclooctino químicamente para aplicación en ingeniería de Tejidos y, por último, se ha realizado un estudio teórico de la influencia del RGD en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (CMM). Este último estudio se realiza ya que no se ha podido corroborar experimentalmente la diferenciación celular promovida por las membranas recubiertas con ELRs que presentan el motivo de bioadhesión RGD debido a la interrupción que se produjo por la pandemia del COVID-19.

1. Se han modificado químicamente polímeros ELRs, HRGD6, para su aplicación posterior en el recubrimiento de superficies de PVDF.
2. Se han caracterizado los ELRs modificados químicamente mediante las técnicas de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), espectrometría de masas MALDI-ToF y resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN).
3. Se ha realizado el recubrimiento de superficies de PVDF mediante la metodología LbL optimizada en un trabajo previo(2), reforzando las capas mediante una reacción de cicloadición [3+2] azida-ciclooctino promovida por tensión anular.
4. Se ha llevado a cabo la caracterización de las membranas recubiertas mediante las técnicas de FTIR, variación de peso y medida de ángulos de contacto. A través de los resultados, se concluye que el método de recubrimiento de las membranas de prueba resultó satisfactorio y se podría haber procedido con el recubrimiento del nuevo lote de membranas piezoeléctricas provenientes de la Universidad de Valencia si la actividad experimental no hubiera sido cesada debido a la situación de emergencia provocada por el COVID-19.
5. Por último, se ha realizado un estudio bibliográfico sobre la influencia del motivo RGD en la diferenciación de células madre mesenquimales en el terreno de la regeneración de tejidos óseos. A partir de esta investigación se llegó al término de que el RGD influye de forma activa en la adhesión y diferenciación de tejidos óseos y, por lo tanto, la presencia de éste en diferentes andamios biomoleculares puede tener un enorme potencial en el campo del cultivo celular y la Ingeniería de Tejidos óseos.

8. Bibliografía

1. Hildebrand HF. Biomaterials - a history of 7000 years. *BioNanoMaterials*. 2013;14(3–4):119–33.
2. Del Barrio Jubete A. Modificación química de biopolímeros tipo elastina para recubrimiento de membranas porosas de PVDF de aplicación biomédica. Universidad de Valladolid; 2019.
3. Girotti A. Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina. Universidad de Valladolid, Valladolid, España; 2007.
4. Park J, Lakes RS. Biomaterials: An introduction: Third edition. *Biomaterials: An introduction: Third edition*. 2007. 1–561 p.
5. ¿Qué es la biocompatibilidad? [Internet]. [cited 2020 May 9]. Available from: <https://blog.biolinscientific.com/what-is-biocompatibility>
6. Tang L, Thevenot P, Hu W. Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(4):270–80.
7. Ruckenstein E LZ. Surface modification and functionalization through the self-assembled monolayer and graft polymerization. *Adv Colloid Interface Sci*. 2005;113:43–63.
8. Barbosa JN, Madureira P, Barbosa MA, Águas AP. The influence of functional groups of self-assembled monolayers on fibrous capsule formation and cell recruitment. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2006;76(4):737–43.
9. Arima Y IH. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 2007;28:3074–82.
10. Mao C, Qiu Y, Sang H, Mei H, Zhu A, Shen J LS. Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility. *Adv Colloid Interface Sci*. 2004;110:5–17.
11. Sheu MS, Hudson DM LI. Biomaterial surface modification using plasma gas discharge processes. *Encycl Handb Biomater Bioeng Part A Mater Marcel Dekker, Inc*. 1995;865–94.
12. Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater Sci Eng R Reports*. 2002;36(5–6):143–206.
13. Savage CR, Lin JW TR. Molecular control of surface film compositions via pulsed RF plasma polymerization of perfluoropropylene oxide. *Chem Mater*. 1991;3:575.
14. Savage CR, Lin JW TR. Spectroscopic characterization of films obtained in pulsed radio-frequency plasma discharges of fluorocarbon monomers. *Struct relations Polym*. 1993;236:745–68.

15. Rinsch CL, Eberhart RC, Savage CR TR. Film chemistry control during the plasma polymerization of allylamine. *Polym Prepr.* 1995;36:95–7.
16. Rinsch CL, Chen X, Panchalingam V, Eberhart RC, Wang JH TR. Pulsed radio frequency plasma polymerization of allyl alcohol: controlled deposition of surface hydroxyl groups. *Langmuir.* 1996;12:2995–3002.
17. MacEwan SR, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers. *Biopolymers.* 2010;94(1):60–77.
18. Girotti A, Fernández-Colino A, López IM, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ. Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications. *Biotechnol J.* 2011;6(10):1174–86.
19. *Biología Médica: La Matriz Extracelular* [Internet]. [cited 2020 Jun 24]. Available from: <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/09/la-matriz-extracelular.html>
20. *Click Chemistry* [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/click-chemistry.shtm>
21. Casado T. *Desarrollo de Polímeros tipo Elastina con propiedades mucoadhesivas mejoradas.* 2016.
22. Worrell BT, Malik JA, Fokin V V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science (80-)*. 2013 Apr 26;340(6131):457–60.
23. Huisgen R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew Chemie Int Ed English.* 1963 Nov 1;2(11):633–45.
24. *Cicloaddición 1,3-dipolar - Wikipedia, la enciclopedia libre* [Internet]. [cited 2020 Jul 7]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Cicloaddición_1,3-dipolar
25. Firestone RA. On the Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *J Org Chem.* 1968 Jun 1;33(6):2285–90.
26. Huisgen R. The Concerted Nature of 1,3-Dipolar Cycloadditions and the Question of Diradical Intermediates. *J Org Chem.* 1976 Feb 1;41(3):403–19.
27. *Green Chemistry, atom economy and sustainable development* [Internet]. [cited 2020 May 12]. Available from: <http://devdata.worldbank.org/quer/default.htm>
28. Sletten EM, Bertozzi CR. Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. Vol. 48, *Angewandte Chemie - International Edition*. NIH Public Access; 2009. p. 6974–98.
29. Prescher JA, Dube DH, Bertozzi CR. Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature.* 2004 Aug 19;430(7002):873–7.
30. Prescher JA, Bertozzi CR. *Chemistry in Living Systems*. Vol. 1, *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group; 2005. p. 13–21.

31. Plass T, Milles S, Koehler C, Schultz C, Lemke EA. Genetically Encoded Copper-Free Click Chemistry. *Angew Chemie Int Ed*. 2011 Apr 18;50(17):3878–81.
32. Neef AB, Schultz C. Selective Fluorescence Labeling of Lipids in Living Cells. *Angew Chemie Int Ed*. 2009 Feb 9;48(8):1498–500.
33. Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA et al. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:16793–7.
34. Química bioortogonal - Wikipedia [Internet]. [cited 2020 May 12]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Bioorthogonal_chemistry#cite_note-3
35. Wittig G, Krebs A. On the existence of low-membered cycloalkynes I. *Chem Ber*. 1961;94:3200–75.
36. Ghazzali I. Los dendrímeros y la química click Empleo en VIH. Universidad de Sevilla; 2016.
37. Jewett JC, Bertozzi CR. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev*. 2010 Mar 22;39(4):1272–9.
38. Hernández MA. Biofuncionalización de Superficies de Silicio Monocristalino, Nanoestructurado y Macroporoso. 2006;
39. K.L. Prime GMW. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science* (80-). 1991;252(5009):1164–7.
40. Gopferich A. *Biomaterials* 17. 1996. 103–114 p.
41. Golonka M, Bulwan M, Nowaskowska M, Testera A, Rodriguez-Cavello J, Zapotoczny S. Thermoresponsive multilayer films based on ionic elastin-like recombinamers. *Soft Matter*. 2011;7:9402–9.
42. P. Ott, K. Trenkenschuh, J. Gensel, A. Fery AL. Free-standing membranes via covalent cross-linking of polyelectrolyte multilayers with complementary reactivity. *Langmuir*. 2010;26:18182–18188.
43. Caruso F, Caruso RA, Möhwald H. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1111–4.
44. Donath E, Sukhorukov GB, Caruso F, Davis SA, Möhwald H. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1998;37(16):2201–5.
45. Wu G, Zhang X. Layer-by-Layer Assembly: From Conventional to Unconventional Methods. *Multilayer Thin Film Seq Assem Nanocomposite Mater Second Ed*. 2012;1:43–67.
46. Iler RK. Multilayers of colloidal particles. *J Colloid Interface Sci*. 1966 Jun 1;21(6):569–94.

47. Shim BS, Podsiadlo P, Lilly DG, Agarwal A, Lee J, Tang Z, et al. Nanostructured thin films made by dewetting method of layer-by-layer assembly. *Nano Lett.* 2007 Nov;7(11):3266–73.
48. Donath E, Walther D, Shilov VN, Knippel E, Budde A, Lowack K, et al. Nonlinear hairy layer theory of electrophoretic fingerprinting applied to consecutive layer by layer polyelectrolyte adsorption onto charged polystyrene latex particles. *Langmuir.* 1997 Oct 1;13(20):5294–305.
49. Qi A, Chan P, Ho J, Rajapaksa A, Friend J, Yeo L. Template-free synthesis and encapsulation technique for layer-by-layer polymer nanocarrier fabrication. *ACS Nano.* 2011 Dec 27;5(12):9583–91.
50. Sun J, Gao M, Feldmann J. Electric Field Directed Layer-by-Layer Assembly of Highly Fluorescent CdTe Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2001;1(2):133–6.
51. Wang X, Ramalingam M, Kong X, Zhao L. *Nanobiomaterials: Classification, Fabrication and Biomedical Applications.* In Wiley-VCH Verlag; 2018. p. 169.
52. Luis J, Martínez S. Posgrado en INGENIERÍA DEL AGUA Y DEL TERRENO. CURSO: INSTRUMENTACIÓN Y MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO TEMA: ESPECTROSCOPIA INFRARROJA 1-Fundamentos. Espectroscopia infrarroja.
53. Piqué TM, Vázquez A. USO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) EN EL ESTUDIO DE LA HIDRATACIÓN DEL CEMENTO. Vol. 3. 2012.
54. Espectroscopía de Infrarrojo/ATR [Internet]. [cited 2020 Apr 1]. Available from: http://www.cciqs.uaemex.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=113&Itemid=86
55. Rossi B. *Fundamentos de óptica.* 1977. 138–140 p.
56. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-resonancia-magnetica-nuclear>
57. Espectrometría de resonancia magnética nuclear [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nuclear
58. TEMA 10. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.
59. Rodríguez García-Cebadera Á, González AQ. Estudio del ángulo de contacto y de la mojabilidad a alta temperatura de fases líquidas en la sinterización de metales.
60. GONIÓMETRO | Qué es, para qué sirve, como funciona y su lectura [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: <https://como-funciona.co/un-goniometro/>
61. Plasma Cleaning | Plasma Cleaner | Oxygen Argon Plasma | Plasma Etch, Inc. [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: <https://www.plasmaetch.com/plasma-cleaning.php>
62. Plasma cleaning - Wikipedia [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from:

https://en.wikipedia.org/wiki/Plasma_cleaning

63. Espectrometría de masas MALDI-TOF - Creative Proteomics [Internet]. [cited 2020 Jun 24]. Available from: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
64. Beavis RC, Chait BT, Fales HM. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1989;3(12):432–5.
65. Cooper G, Hausman RE. *La célula* / Geoffrey M.Cooper y Robert E. Hausman. 6ª Ed. 2014. 816 p.
66. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr 1;9(2):180–6.
67. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006 Jan;24(1):21–44.
68. Crespo P. La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. *Redes señalización y estrategias Ter.* 2009;123–37.
69. TEMA 2. FISIOPATOLOGÍA ÓSEA: CONCEPTO Y FUNCIONES. Universidad Complutense de Madrid; 2014.
70. Células Madre de Médula Ósea – Instituto Cugat [Internet]. [cited 2020 Jul 11]. Available from: <https://institutocugat.com/especialidades/tratamientos-biologicos/celulas-madre-de-medula-osea/>
71. López Serna N. Osteogénesis. In: *Biología del desarrollo*. McGraw-Hill; 2018. p. 163.
72. Osificación endocondral - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 2020 Jul 1]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Osificación_endocondral
73. Merino Perez J, Noriega Borge MJ. “Fisiología General: Crecimiento y diferenciación celular.” Universidad de Cantabria;
74. Linero IM, Doncel A, Chaparro O. Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomedica.* 2014;34(1):67–78.
75. Arévalo Romero JA, Pardo VM, Paéz Guerrero DM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova.* 2007;5(8):177.
76. Espinoza F, Aliaga F, Crawford PL. Escenario actual y perspectivas de la terapia con células madre mesenquimales en medicina intensiva. *Rev Med Chil.* 2016;144(2):222–31.
77. Arbosa A, Nicolaua F, Quetglas M, Ramisb JM, Monjob M, Muncunillc J, et al. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología.* 2013;32(1):3–11.

78. Macías-Abraham C, O del Valle L, Galván JA, de la Cuétara K, Socarrás BB, Hernández P, et al. Caracterización fenotípica de células madre mesenquimales humanas de médula ósea y tejido adiposo. Resultados preliminares. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter.* 2014;30(2):162–70.
79. Sánchez-Cruz G, Milián-Rodríguez L. Therapeutic potential of bone marrow stem cells in cerebral infarction. *Rev Neurol.* 2015 May 16;60(10):464–72.
80. Hamidouche Z, Rother K, Przybilla J, Krinner A, Clay D, Hopp L, et al. Bistable Epigenetic States Explain Age-Dependent Decline in Mesenchymal Stem Cell Heterogeneity. *Stem Cells.* 2017 Mar 1;35(3):694–704.
81. Garzón-Perdomo DK, De los Reyes LM, Francis Turner L. Methodologies used in the differentiation of mesenchymal stem cells to neuronal lineage. *Acta Neurológica Colomb.* 2017;33(4):299–306.
82. Rauch A, Haakonsson AK, Madsen JGS, Larsen M, Forss I, Madsen MR, et al. Osteogenesis depends on commissioning of a network of stem cell transcription factors that act as repressors of adipogenesis. *Nat Genet.* 2019;51(4):716–27.
83. Deb A. How Stem Cells Turn into Bone and Fat. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.
84. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Jan 15;122(2):159–63.
85. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands . *J Cell Sci.* 2006 Oct 1;119(19):3901–3.
86. Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. Vol. 26, *Matrix Biology.* Elsevier; 2007. p. 146–55.
87. Xian X, Gopal S, Couchman JR. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. Vol. 339, *Cell and Tissue Research.* 2010. p. 31–46.
88. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. Vol. 123, *Journal of Cell Science.* 2010. p. 4195–200.
89. Clark MA, Choi J, Douglas M. Connections between Cells and Cellular Activities. *OpenStax Biology 2nd Edition;* 2018.
90. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115(20):3861–3.
91. Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, Mozzoni B, Lumetti S, Macaluso GM. A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. Vol. 56, *Japanese Dental Science Review.* Elsevier Ltd; 2020. p. 50–5.
92. Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. Vol. 113, *Journal of Cell Science.* 2000. p. 3563–71.
93. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. Vol. 6, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005. p. 56–68.

94. Mardon HJ, Grant KE. The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett.* 1994 Mar 7;340(3):197–201.
95. Anderson JM, Vines JB, Patterson JL, Chen H, Javed A, Jun HW. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells synergistically enhanced by biomimetic peptide amphiphiles combined with conditioned medium. *Acta Biomater.* 2011;7(2):675–82.
96. Shin H, Temenoff JS, Bowden GC, Zygourakis K, Farach-Carson MC, Yaszemski MJ, et al. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured on Arg-Gly-Asp modified hydrogels without dexamethasone and β -glycerol phosphate. *Biomaterials.* 2005;26(17):3645–54.
97. Qu Z, Yan J, Li B, Zhuang J, Huang Y. Improving bone marrow stromal cell attachment on chitosan/hydroxyapatite scaffolds by an immobilized RGD peptide. *Biomed Mater.* 2010;5(6).
98. Yang F, Williams CG, Wang DA, Lee H, Manson PN, Elisseeff J. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 2005;26(30):5991–8.
99. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul;14(7):1115–22.
100. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli L V. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology.* 1994;134(1):277–86.
101. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988 Nov;254(2):317–30.
102. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003;24(24):4385–415.
103. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, et al. Mesenchymal stem cells: Molecular targets for tissue engineering. Vol. 16, *Stem Cells and Development.* Stem Cells Dev; 2007. p. 7–23.
104. Kundu AK, Khatiwala CB, Putnam AJ. Extracellular matrix remodeling, integrin expression, and downstream signaling pathways influence the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on poly(Lactide-co-glycolide) substrates. *Tissue Eng - Part A.* 2009;15(2):273–83.