



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Biocompatibilización superficial de stents de nitinol mediante recombinaómeros tipo elastina

Autora:

Irene García Lara

Tutores:

Israel González de Torre

Julio Fernández Fernández

Valladolid, julio de 2023

Contenido

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	5
1.RESUMEN.....	6
2.INTRODUCCIÓN	7
2.1 Stents en la enfermedad coronaria	7
2.2 Polímeros.....	9
2.2.1 Elastina.....	9
2.3 Recombinámeros tipo elastina (ELRs).....	11
2.4 Layer by layer	13
2.5 Metodología click.....	13
3.OBJETIVOS	15
4.MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 ELRs utilizados	16
4.2 Otros reactivos	16
4.3 Preparación de los polímeros	16
4.4 Caracterización de los polímeros	17
4.4.1 Espectrometría infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	17
4.4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	18
4.4.3 Electroforesis SDS-PAGE	20
4.4.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	22
4.5 Limpieza y activación de superficies	23
4.6 Mirobalanza de Cuarzo con Disipación (QCM-D)	26
4.6.1 Silanización de las superficies.....	26
4.6.2 Biofuncionalización de las superficies con los ELRs.....	28
4.7 Ángulo de contacto.....	29
4.8 Estudio de la viabilidad celular	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
5.1 Caracterización de HRGD-N3 y VKV-ciclooctino	35
5.1.1 Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	35
5.1.2 Cálculo de la Temperatura de Transición Inversa	37
5.1.3 Estimación del peso molecular.....	37
5.1.4 Cálculo del porcentaje de polímero modificado.....	38
5.2 Microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D)	42
5.2.1 Silanización de las superficies.....	42

5.2.2 Biofuncionalización de las superficies con los ELRs.....	46
5.3 Ángulo de contacto.....	50
5.4 Viabilidad celular	51
5.4.1 Viabilidad celular a las 24 horas.....	53
5.4.2 Viabilidad celular a las 96 horas.....	56
6. CONCLUSIONES Y LINEAS FUTURAS	62
Bibliografía	64
ANEXO.....	68
A1. Gráficas DSC.....	68
A2. Resultados test ANOVA	71
A.3 Presupuesto.....	74

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ELRs – Elastin-like recombinamers (Recombinámeros tipo elastina)

HFF1 – Human Foreskin Fibroblast (Fibroblasto de Prepucio Humano)

ITT – Inverse temperatura transition (Temperatura de transición inversa)

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier)

DSC – Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría Diferencial de Barrido)

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

RMN – Resonancia magnética nuclear

QCM-D – Quartz Crystal Microbalance dissipation (Microbalanza de Cuarzo con Disipación)

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

DMSO – dimetilsulfóxido

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio Eagle modificado de Dulbecco)

FBS – Fetal Bovine serum (Suero bovino fetal)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)

1.RESUMEN

La biocompatibilidad de los implantes es un aspecto fundamental en la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. En particular los stents cardiovasculares son dispositivos ampliamente utilizados para tratar la estenosis arterial y restablecer el flujo sanguíneo, una vez implantados están en contacto constante con la sangre y los tejidos vasculares. Sin embargo, la interacción entre los stents y los tejidos circundantes pueden desencadenar respuestas inflamatorias y complicaciones a largo plazo.

Una estrategia prometedora para conseguir mejoras en la biocompatibilidad de los stents es mediante la modificación de su superficie. En este contexto, los recombinámeros tipo elastina (ELRs) pueden ser una opción interesante debido a sus propiedades bioactivas y capacidad para imitar las características mecánicas de los tejidos biológicos.

Los recombinámeros tipo elastina son moléculas sintéticas obtenidas mediante técnicas recombinantes diseñadas para presentar una secuencia de aminoácidos similar a la de la elastina, una proteína clave en la elasticidad y flexibilidad de los tejidos. Estos recombinámeros pueden ser utilizados como recubrimientos superficiales en los stents, creando una interfaz bioactiva capaz de promover la interacción con los tejidos circundantes.

En el presente proyecto se pretende evaluar la viabilidad celular en superficies de titanio biofuncionalizadas con capas de ELRs (VKV-ciclo y HRGD-N₃). Para ello se realiza una previa silanización de la superficie y una posterior adición de los recombinámeros. La unión entre las capas sucesivas se produce mediante una reacción click entre los grupos N₃ y ciclooctino. Finalmente se lleva a cabo un estudio de la proliferación celular utilizando células HFF1 (Human Foreskin Fibroblast) sobre las superficies previamente modificadas con el proceso descrito.

2.INTRODUCCIÓN

2.1 Stents en la enfermedad coronaria

La enfermedad coronaria es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Se caracteriza por la acumulación de placa (depósitos de grasa, colesterol, calcio...) en las arterias coronarias, lo que conduce a la reducción del flujo sanguíneo hacia el corazón [1]. Esta condición médica afecta a millones de personas y presenta una carga significativa para los sistemas de salud.

Existen diversos tratamientos para abordar la enfermedad coronaria y mejorar la salud cardiovascular de los pacientes. En primer lugar, es conveniente realizar modificaciones en el estilo de vida de los pacientes con el fin de controlar los factores de riesgo, como el colesterol alto, la hipertensión arterial y la obesidad. Además, se utilizan medicamentos como estatinas, antiplaquetarios y betabloqueantes para reducir el colesterol, prevenir la formación de coágulos y controlar la presión arterial. En casos más graves, se pueden realizar procedimientos invasivos como la angioplastia coronaria con colocación de stent para desbloquear las arterias obstruidas y restablecer el flujo sanguíneo. [2]

Los stents coronarios son pequeños dispositivos tubulares, los cuales se colocan en las arterias estrechadas o bloqueadas. Idealmente deberían poseer características como buena flexibilidad, una fuerza radial intensa, visibilidad radiográfica, baja trombogenicidad y una excelente biocompatibilidad para asegurar tasas bajas de reestenosis y trombosis.[3]

La reestenosis y la trombosis son complicaciones comunes que se pueden dar tras la implantación de estos dispositivos. El primero se refiere al estrechamiento o bloqueo de la arteria tratada debido al crecimiento excesivo de tejido cicatricial. El segundo consiste en la formación de un coágulo sanguíneo en el interior o cerca del stent, lo que puede obstruir completamente el flujo de sangre. Una baja biocompatibilidad de estos dispositivos podría dar lugar a las complicaciones mencionadas. [4]

Existen diferentes tipos de stents utilizados para el tratamiento de la enfermedad coronaria. De forma general se pueden clasificar en tres grupos: stents metálicos, stents farmacoactivos y stents reabsorbibles. [5]

Los stents metálicos en un primer momento se fabricaban de acero inoxidable. En la actualidad, aleaciones como las de platino-cobalto, cromo-cobalto, nitinol (níquel-titanio) han reemplazado dicho material, debido a que ofrecen una resistencia y visibilidad

adecuadas, así como una mayor flexibilidad, lo que facilita su inserción en las arterias estrechas. [6], [5]. Además, presentan una buena resistencia a la corrosión y son relativamente inertes a largo plazo. No obstante, a pesar de la elevada biocompatibilidad que presenta dichos materiales, se ha comprobado que en los tejidos circundantes a los implantes se genera una alta concentración de iones metálicos, lo cual puede desencadenar en reacciones inflamatorias o alérgicas.[7]

Los stents farmacoactivos, presentan una estructura más compleja, generalmente recubiertos con medicamentos antiproliferativos o antirestenóticos que se liberan en la arteria después de la implantación. Este tipo de stents han reducido la tasa de reestenosis en comparación con los stents metálicos. La liberación controlada de medicamento ayuda a promover la cicatrización adecuada de la arteria. [5], [6]

Los stents bioabsorbibles están fabricados con materiales biodegradables que se disuelven gradualmente en el cuerpo después de cumplir su función de apertura de la arteria. Este tipo de stents evita la necesidad de dejar un cuerpo extraño permanente en la arteria.[5] [6], [8]

Estas innovaciones en los materiales y diseños de los stents han permitido mejorar sus propiedades y adaptabilidad, proporcionando opciones más eficientes y seguras para el tratamiento de la enfermedad coronaria. Sin embargo, es importante seguir desarrollando nuevos materiales y tecnologías para optimizar aún más la efectividad y seguridad de los stents.

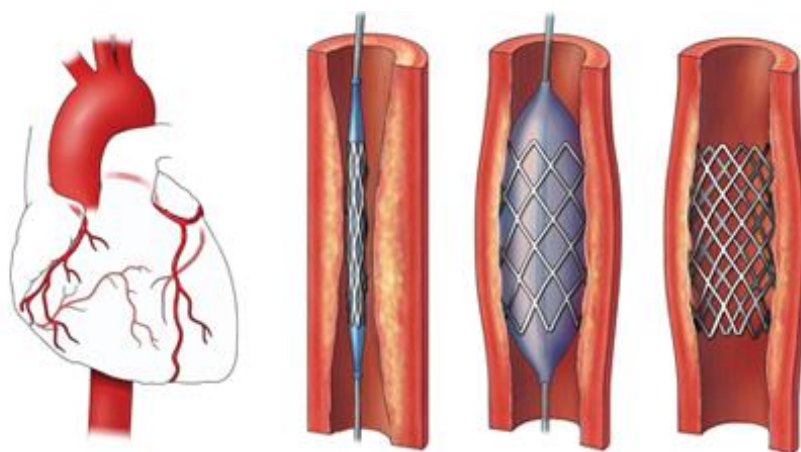


Figura 1. Colocación de un stent coronario

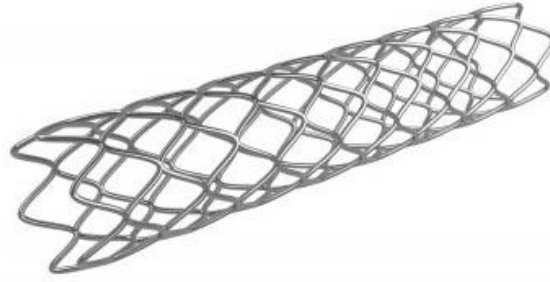


Figura 2. Stent metálico

2.2 Polímeros

Los polímeros son macromoléculas formadas por la repetición de unidades denominadas monómeros. La formación del polímero ocurre gracias a la reacción de polimerización que tiene lugar entre las moléculas que lo conforman.[9]

Dependiendo de su origen, se pueden clasificar en tres grupos. Los polímeros naturales son aquellos que se encuentran en la naturaleza, son sintetizados por organismos vivos y cumplen funciones esenciales en los seres vivos. A este grupo pertenecen el ADN, las proteínas como la elastina y el colágeno, entre otras. Los polímeros artificiales no se encuentran en la naturaleza y son sintetizados de forma industrial por el hombre mediante la manipulación de monómeros. El teflón, nylon y polietileno son ejemplos de este grupo. [10]Por último, los polímeros mixtos se obtienen al transformar polímeros naturales mediante procesos químicos, por esta razón presentan una composición similar a los polímeros naturales, ya que ambos están compuestos por cadenas de monómeros parecidas. [11]

2.2.1 Elastina

La elastina pertenece al grupo de los polímeros naturales. Se trata de una de las proteínas mayoritarias de la matriz extracelular y posee un peso molecular de 70 kDa.[12] Debido a su composición, pertenece al grupo de las haloproteínas, ya que está conformada exclusivamente por una secuencia de aminoácidos. Se trata de una proteína fibrilar, las cuales son generalmente insolubles en medio acuoso. Por dicha razón suele cumplir una función estructural en los tejidos de los que forman parte. [13]

Su estructura primaria está compuesta generalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Al ser secretada al espacio extracelular, se ensambla automáticamente para evitar la interacción con el agua circundante. [9]

La elastina proporciona fuerza, elasticidad e integridad estructural a tejidos como los pulmones, vasos sanguíneos o ligamentos, que son sometidos a cambios repetitivos y deformaciones reversibles, ya que es capaz de recuperarse completamente sin perder sus propiedades mecánicas. [14]

La producción de dicha proteína tiene lugar en las etapas tempranas del desarrollo o cuando un tejido se encuentra muy dañado, con muy poca secreción en adultos, lo que refleja su estabilidad y durabilidad.

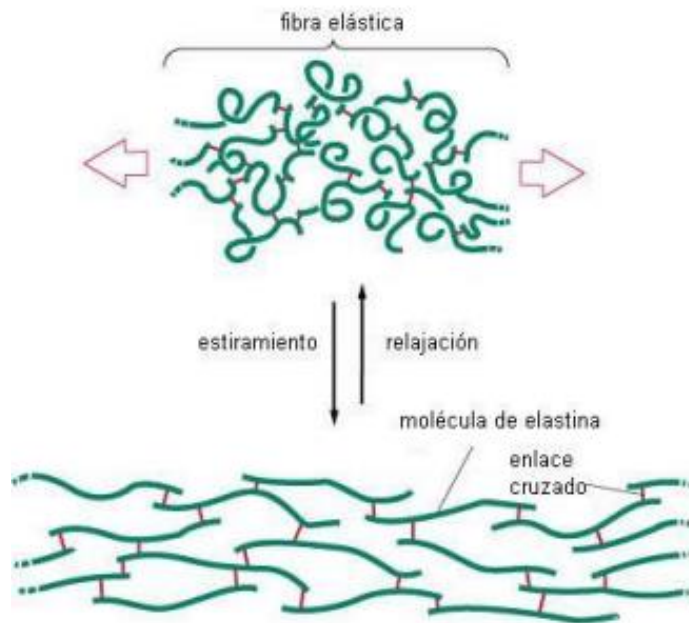


Figura 3. Representación de la estructura cuaternaria de la elastina y su ciclo de estiramiento-relajación.

La elastina aparte de ser importante por su durabilidad y sus propiedades mecánicas también influye en la señalización y regularización celular. Contiene dominios bioactivos capaces de controlar el comportamiento celular tanto en condiciones saludables como en la curación de heridas. [15]

En cuanto a su secuencia de aminoácidos, está compuesta por una parte hidrofóbica y otra hidrofílica y se caracteriza por la repetición de unos motivos concretos como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG, los cuales son responsables de sus propiedades elásticas y permiten ciclos de deformación y recuperación de la forma original sin pérdida de energía. [16]

Las propiedades comentadas, únicas de la elastina, lo convierten en un material muy interesante en la ingeniería de tejidos. El uso de técnicas recombinantes permite la obtención de versiones recombinantes de la elastina, dando lugar a los recombinámeros tipo elastina (ELRs), los cuales, están constituidos por secuencias presentes en la elastina natural. Además, como es un material natural presente en el cuerpo humano, es invisible para el sistema inmunológico, evitando así los problemas de rechazo que surgen cuando se utilizan materiales para la ingeniería de tejidos.

2.3 Recombinámeros tipo elastina (ELRs)

Como se ha descrito anteriormente, la elastina es uno de los componentes principales de la matriz extracelular y sus funciones más importantes consisten en proporcionar elasticidad y resistencia a diferentes tejidos. Además, puede interactuar con receptores de la superficie celular, gracias a diferentes secuencias que posee. Por lo que tiene especial importancia la síntesis artificial de polímeros que simulen la estructura y propiedades de la elastina natural.

Mediante técnicas recombinantes se han sintetizado los denominados recombinámeros tipo elastina (ELRs), los cuales están basados en la repetición del pentapéptido Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Estas moléculas se utilizan para formar estructuras como hidrogeles, nano partículas, nano fibras. [17]

Los ELRs conservan las características más relevantes de la elastina comentadas anteriormente y son utilizados en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, bioactividad y comportamiento termosensible. La biocompatibilidad y la evasión del sistema inmunitario proporciona una gran estabilidad a largo plazo cuando se implantan in vivo sin inducir ninguna respuesta inflamatoria. [17]

Los ELRs exhiben una variación reversible en su fase cuando se someten a cambios de temperatura. A temperaturas inferiores a su temperatura de transición inversa (ITT), las cadenas de polímero se encuentran en estado libre, desordenado y extendido, mientras que están completamente hidratadas. Esta hidratación hidrofóbica ocurre debido a la presencia de clatratos de agua, estructuras que rodean las cadenas laterales apolares de los biopolímeros. Estas estructuras son heterogéneas y su estabilidad puede variar. [18]

Cuando se supera la temperatura de transición inversa, la cadena pierde las moléculas de agua y tiene lugar un reordenamiento de la estructura. La cadena que antes se encontraba

extendida, ahora se pliega y se mantiene gracias a interacciones hidrofóbicas, formando una estructura regular denominada espiral- β . El agua que se encontraba alrededor de polipéptido formando los clatratos se desplaza haciendo que el ELR precipite formando agregados. [18]

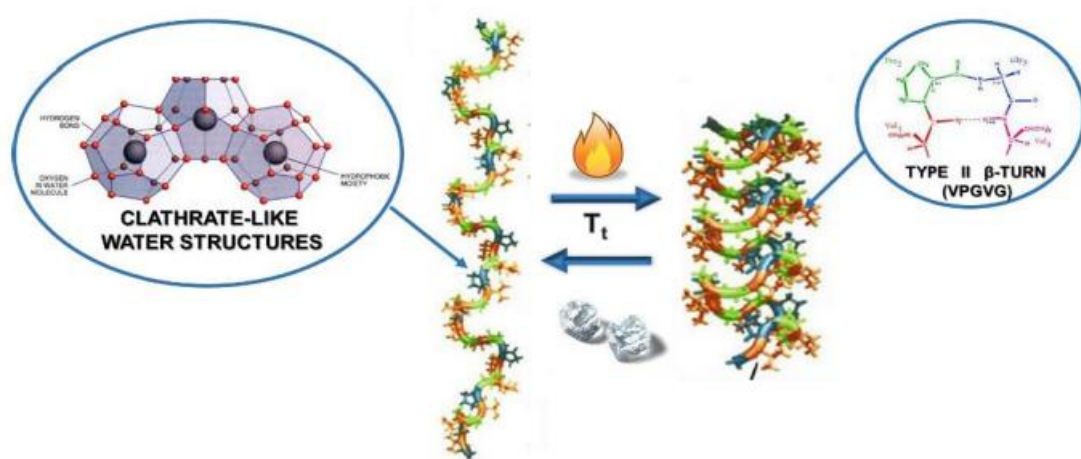


Figura 4. Comportamiento termosensible de los ELRs

La temperatura de transición inversa está totalmente relacionada con el orden y la secuencia de aminoácidos. Dicha temperatura varía en función de la polaridad del aminoácido colocado en la posición (Xaa). Aminoácidos polares provocan un aumento de la temperatura de transición inversa. La temperatura de transición inversa además de depender de la secuencia de aminoácidos, como ya se ha comentado, también depende de otros factores, como el pH, la concentración de sales, la masa molecular, la polaridad del polímero y determinadas moléculas e iones. [19]

Como se ha visto anteriormente, los ELRs están basados en la repetición del pentapéptido Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Todos son funcionales y poseen el comportamiento termosensible. Pero hay que tener en cuenta que la prolina no puede ser sustituida y la primera glicina solo puede ser reemplazada por l-alanina, ya que para estabilizar el estado plegado cada giro de la hélice β necesita glicina y prolina. Por esta razón, para no afectar a la funcionalidad del polímero solo se podría sustituir la alanina. [20]

Los ELRs tienen una gran relevancia en el campo biomédico debido a sus propiedades. Pueden ser utilizados en áreas como la ingeniería de tejidos, la ingeniería de superficies, la administración de fármacos y la generación de nano-dispositivos. [19], [20]

2.4 Layer by layer

La técnica layer by layer (LbL) es utilizada para la construcción de recubrimientos mediante la deposición secuencial de capas alternas de diferentes materiales. Esta técnica aprovecha la interacción entre las monocapas para crear nanoestructuras de múltiples capas unidas mediante interacciones físicas o químicas, dependiendo de los sustratos utilizados.[21]

Los ELRs pueden ser utilizados para la formación de estructuras capa a capa, alterando polímeros diferentes para conseguir que interaccionen entre ellos con el fin de recubrir implantes para mejorar su biocompatibilidad y biofuncionalidad.

Esta técnica proporciona un nivel de control y versatilidad superior en comparación con otras técnicas de deposición.

2.5 Metodología click

La química “click” se refiere al conjunto de reacciones químicas selectivas, de alto rendimiento y con buena cinética de reacción. Son reacciones eficientes y específicas que ocurren con alta facilidad y eficacia bajo condiciones suaves. Pueden ser llevadas a cabo sin catalizadores metálicos, lo que las hace especialmente interesantes desde el punto de vista compatible.[22],

La reacción “click” se produce entre un grupo azida y un grupo alquino (derivados de ciclooctino), para formar un triazol, también conocida como reacción de cicloadición de Huisgen. Esta reacción se lleva a cabo mediante un proceso de cicloadición 1,3-dipolar, en el cual el azida (grupo funcional $-N_3$) y el alquino (grupo funcional $-C\equiv C-$) reaccionan para formar un enlace covalente entre el carbono del alquino y el nitrógeno del azida.[23],[24]

En concreto la utilización de esta técnica para la modificación de superficies con el fin de crear interfaces funcionales con propiedades específicas, es altamente atractiva debido a su selectividad, eficiencia y facilidad de implementación.[25]

Las modificaciones basadas en química click suelen formar enlaces covalentes fuertes y estables, lo que da lugar a una mayor estabilidad y durabilidad de la superficie modificada. Esto es especialmente importante en aplicaciones donde se requiere resistencia a condiciones adversas, como entornos biológicos. Además, se puede adaptar a una amplia gama de superficies como metales, vidrios, materiales biológicos...[25]

A parte de su uso en la modificación de superficies, tiene numerosas aplicaciones en áreas como la química medicinal, la síntesis de compuestos, la construcción de materiales funcionales, entre otras.[26]

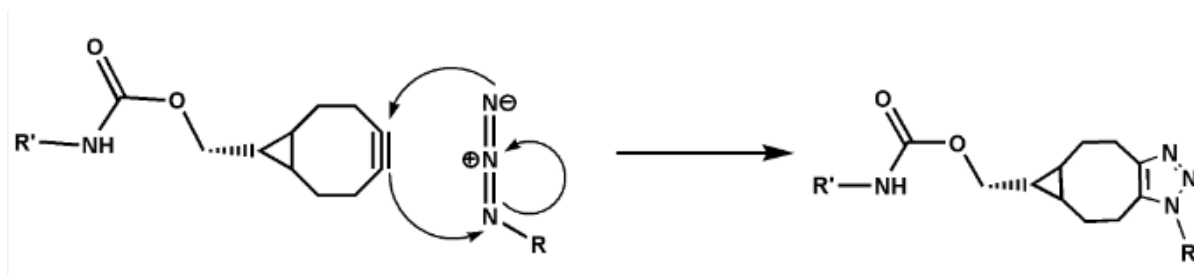


Figura 5. Reacción click entre un grupo azida y un alquino

3.OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo fin de Grado es la biocompatibilización superficial de stents de nitinol mediante recombinámeros tipo elastina, para ello se han planteado los siguientes objetivos secundarios:

1. Caracterización física de los ELRs VKV-ciclooctino y HRGD-N₃
2. Realizar una adecuada modificación de las superficies de titanio mediante un proceso de silanización.
3. Biocompatibilización de las superficies mediante la adición secuencial de capas de recombinámeros tipo elastina.
4. Analizar las características de las superficies biofuncionalizadas, mediante técnicas de análisis de superficies, como la medición del ángulo de contacto. Este análisis permite comparar la hidrofobicidad de las superficies antes y después de su modificación.
5. Estudiar de la masa depositada y espesor de las capas.
6. Evaluar la viabilidad celular en las superficies modificadas con recombinámeros tipo elastina, comparándola con la viabilidad en superficies sin recubrimiento. Para ello se emplearán técnicas de cultivo celular in vitro y se realizarán estudios microscópicos para observar la proliferación en las diferentes superficies.

Mediante el cumplimiento de estos objetivos, se pretende avanzar en el conocimiento sobre la biocompatibilización superficial de stents de nitinol, en busca de mejorar su respuesta biológica y desempeño clínico. Además, se espera aportar evidencias que respalden la utilización de recombinámeros tipo elastina como herramienta efectiva en la funcionalización de superficies de implantes, especialmente en el caso de los stents, con el propósito de favorecer su integración y biocompatibilidad en entornos biológicos.

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ELRs utilizados

Para la investigación se utilizaron los ELRs VKV-ciclooctino y HRGD-N₃ sintetizados mediante técnicas recombinantes por el grupo de investigación Bioforge.

El ELR HRGD6, el cual contiene la secuencia de adhesión RGD y su secuencia de aminoácidos es la siguiente: MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP [(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂AVTGRGDSPASS[(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂.

El ELR VKVx24, el cual contiene una estructura similar a la primera, pero sin la secuencia bioactiva, el cual presenta la siguiente secuencia de aminoácidos: MESLLP VG VPGVG [VPGKG(VPGVG)₅]₂₃ VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGV

Para que ocurra la reacción click, son necesarios grupos reactivos, para ello, los ELRs producidos fueron químicamente modificados. En el caso del HRGD6, se introdujeron azidas directamente en las posiciones de las lisinas, mientras que en el VKVx24 las lisinas fueron sustituidas por grupos ciclooctino. De esta manera se obtuvo HRGD-N₃ y VKV-ciclo, ELRs “clickables”.

4.2 Otros reactivos

En el proyecto de investigación se utilizaron los siguientes reactivos:

Reactivos	Casa comercial
DMSO	Carlo Erba
Etanol	Merck
EDTA	Sigma Aldrich
FBS	VWR Intern.Milermium
PBS	Gibco
11-azidoundecyltriethoxysilane	Sikemia

Tabla 1. Reactivos utilizados

4.3 Preparación de los polímeros

Para la preparación de las disoluciones de los polímeros se usó agua ultrapura MiliQ, en ella se disolvió la cantidad de polímero correspondiente para conseguir una disolución de 5mg/ml y las disoluciones de ambos polímeros se conservaron a una temperatura de 4°C.

4.4 Caracterización de los polímeros

Para llevar a cabo este trabajo se han utilizado los ELRs mencionados anteriormente, modificados por miembros del grupo de investigación Bioforge. Con el fin de observar las modificaciones realizadas se han llevado a cabo técnicas para la caracterización de dichos polímeros.

4.4.1 Espectrometría infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) es una técnica analítica utilizada para estudiar la composición química de muestras, en la que se identifican tanto los grupos funcionales presentes como ciertos enlaces químicos. Es especialmente útil para comparar los espectros antes y después de realizar una modificación química. [27], [28]

Se basa en la interacción de la luz infrarroja con las moléculas presentes en la muestra, al absorber dicha radiación a frecuencias determinadas se produce resonancia entre los enlaces moleculares. Al someter a los enlaces a una radiación de frecuencia igual que su frecuencia de resonancia, se producirá una vibración intramolecular que amplificará la intensidad de la señal. Una forma de analizar esta información es utilizando un interferómetro de Michelson, el cual está compuesto por: una fuente de luz, un divisor de haz, un espejo fijo, otro móvil y un detector. La muestra que se desea estudiar se coloca sobre el detector ubicado a la salida del sistema. La radiación infrarroja emitida se divide, una parte va hacia el espejo fijo mientras que la otra se refleja en el espejo móvil gracias al divisor de haz. Los dos haces reflejados se recombinan, interaccionan con la muestra y se produce un interferograma. [27], [29]

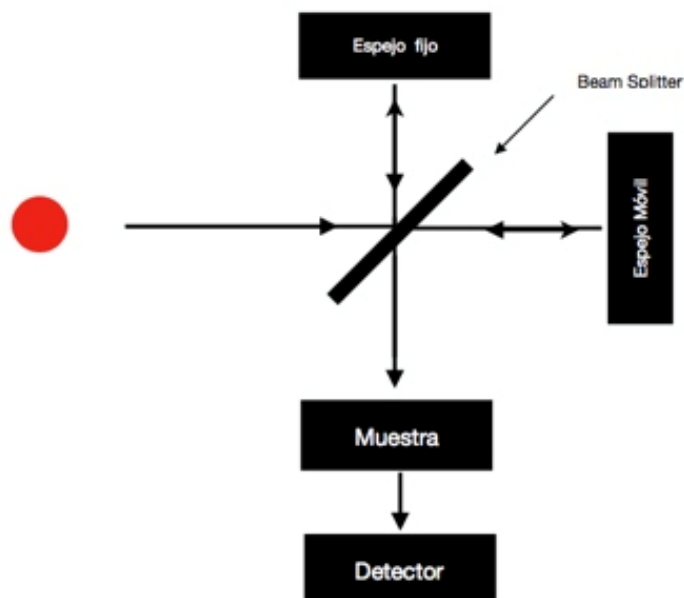


Figura 6. Esquema de un espectrofotómetro FTIR con interferómetro de Michelson

Para obtener la información sobre los enlaces presentes en la muestra, se aplica la Transformada de Fourier a los datos obtenidos. Esta operación matemática permite obtener un espectro en el dominio de las longitudes de onda. Cada tipo de enlace absorbe la radiación infrarroja en determinadas longitudes de onda, características de los grupos funcionales. De esta manera se puede obtener un espectro de absorción único para cada sustancia. [30]

En el presente trabajo de investigación se ha utilizado el equipo Tensor 27 fabricado por Bruker, el cual utiliza el software OPUS para la toma de datos. Las mediciones permitidas por este equipo se encuentran entre los $600 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Para la obtención del espectro, se limpió el sensor con acetona y se depositó sobre este una muestra de unos 5mg de polímero. Antes de la toma del espectro se realizó una medida de ruido de fondo. Los datos obtenidos mediante esta técnica permitieron comprobar las modificaciones químicas realizadas en el HRGD6 y VKVx24.

4.4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry) es una técnica muy utilizada en el ámbito de la Ciencia de Materiales debido a su alta sensibilidad y velocidad de análisis. Mediante esta técnica es posible determinar la cantidad de calor absorbido o liberado por una sustancia, cuando se mantiene a temperatura constante durante un periodo de tiempo determinado o cuando se enfría y

calienta a velocidad constante en un rango de temperaturas. La información obtenida mediante esta técnica permite la caracterización de las propiedades físicas de materiales y cómo varían con la temperatura, por lo que puede aprovecharse para medir la capacidad calorífica aparente, determinar tanto las temperaturas de transición o transformación, como la estabilidad térmica de los materiales, además también es posible analizar la cinética de cristalización de materiales, entre otras aplicaciones. [31]

El equipo de DSC se compone de dos sondas de temperatura sobre las cuales se colocan crisoles de aluminio. En uno de los crisoles se deposita la disolución con la muestra que se desea estudiar, mientras que en el otro contiene únicamente el solvente utilizado, actuando como referencia. Es importante que la masa depositada en ambos crisoles sea la misma, ya que se analizarán los intercambios de calor entre ellos. Cuando ocurre un cambio en la capacidad calorífica de la muestra, se produce una transferencia de calor entre los dos crisoles utilizando una célula de Peltier, la cual actúa como dispositivo termoeléctrico que utiliza el efecto de Peltier para transferir calor desde el crisol que experimenta el cambio en la capacidad calorífica hacia el crisol de referencia. Dicha célula genera una diferencia de potencial eléctrico que es directamente proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas de los crisoles. El propósito de esta transferencia de calor es igualar nuevamente la temperatura en ambos crisoles. Mediante este proceso es posible cuantificar la diferencia de las capacidades caloríficas entre los crisoles mediante la medición de la diferencia de potencial generada por la célula de Peltier. [32]

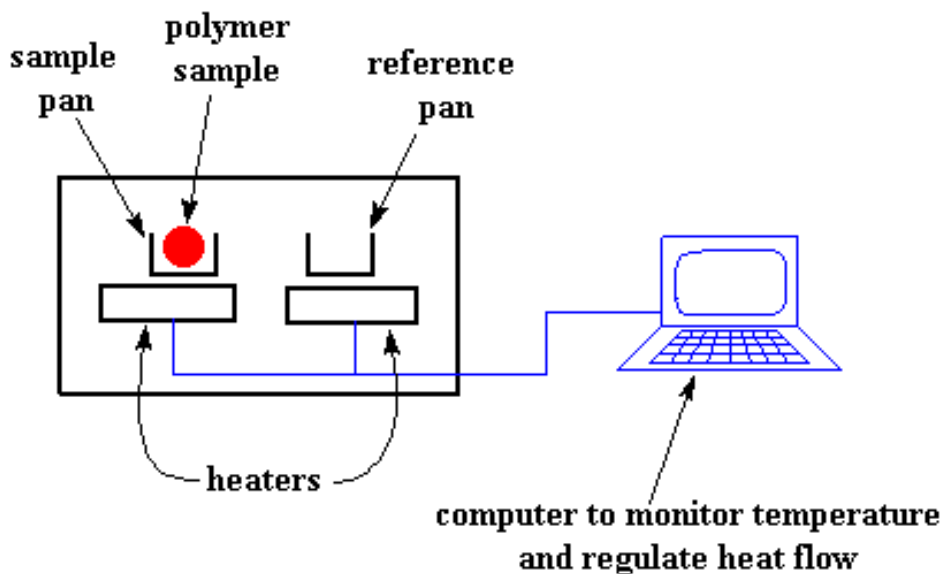


Figura 7. Esquema Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Al realizar mediciones, se representa la energía transferida en forma de calor en función de la temperatura. Esto permite identificar las temperaturas en las que se producen ciertos procesos térmicos gracias a los picos de energía presentes en las gráficas. Estos picos corresponden a cambios significativos en la capacidad calorífica de la muestra y brindan información sobre determinados procesos térmicos.

En este proyecto se empleó un equipo de DSC *Mettler Toledo 822e*, con refrigeración mediante nitrógeno líquido. Para tomar las medidas se realizó una disolución de HRGD-N₃ en agua miliQ a 50mg/ml y otra de VKV-cyclo en el mismo medio a la misma concentración, ambas muestras se mantuvieron a 4°C hasta la realización del experimento. Se ajustó el pH de ambas muestras, hasta conseguir un pH neutro, igual a 7. Para cada medida se introdujeron 20µl de disolución en un crisol de aluminio y la misma cantidad de agua miliQ en el crisol de referencia. Para asegurar la misma masa en ambos crisoles, se empleó una balanza de precisión *XS105 Mettler Toledo* colocada sobre una mesa de granito anti-vibraciones con una mampara de vidrio alrededor de la balanza para evitar corrientes de aire que puedan afectar las mediciones y con una alta precisión permitiendo la medición de masas con una exactitud de centésimas de miligramo. Para la toma de datos se utilizó el software Mettler, seleccionando en primer lugar un programa de enfriamiento, en el que se llevan las muestras a 0°C y se mantienen a esa temperatura durante 5 minutos. Posteriormente, se selecciona un programa para calentar las muestras de 5°C a 60°C a 5°C por minuto. Por último, se analizaron las gráficas resultantes en las que los picos endotérmicos, en los que la muestra absorbe energía, apuntan hacia abajo y se determinó la temperatura de transición inversa del polímero empleando, haciendo la media entre las medidas tomadas.

4.4.3 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es una técnica utilizada en bioquímica y biología molecular para separar proteínas en función de su tamaño, longitud de las cadenas polipeptídicas y peso molecular. Mediante esta técnica es posible determinar el peso molecular aproximado de una muestra de proteína mediante comparación con un marcador de peso molecular conocido.

Esta técnica consiste en hacer pasar las muestras a través de un gel poroso de poliacrilamida mientras se aplica una diferencia de potencial entre los bordes superior e inferior del gel. Un disolvente aniónico, desnaturaliza las proteínas desplegando su estructura tridimensional y las confiere una carga negativa proporcional a su masa, lo que

permite que la diferencia de potencial aplicada ejerza una fuerza similar entre todas las muestras. Esta igualdad de fuerzas facilita la migración de las proteínas a través del gel poroso.[33] Las proteínas más pequeñas tienen mayor facilidad para moverse por los poros del gel, lo que les permite migrar más rápidamente hacia el cátodo. Por otro lado, las proteínas de mayor tamaño encuentran más resistencia al pasar por los poros, por lo que se desplazan más lentamente. Estas proteínas más grandes tienden a quedarse en las partes más altas del gel, más cerca del ánodo. [34]

Para llevar a cabo esta técnica es necesario preparar el gel de poliacrilamida siguiendo un determinado protocolo [35], en función del peso de los polímeros estudiados se puede variar la concentración del gel entre 8 y 15%. En este caso se utilizó un gel al 12%.

Después de haber preparado el gel, se preparan las muestras en frío para asegurar que el polímero sigue disuelto. Se disuelven los polímeros en agua miliQ a una concentración 1mg/ml. A continuación, se mezclan 16 μ l de dicha disolución con 4 μ l de un tampón buffer de concentración 5X, obteniendo una muestra teñida de 20 μ l.

Por último, se introducen las muestras teñidas y el marcador en los diferentes pocillos del gel. Dependiendo del número de pocillos se introduce una cantidad determinada de muestra y de marker, según se indica en la Tabla 2. Una vez introducidas tanto las muestras a analizar con el marker en los pocillos del gel, se conecta a una fuente de tensión de 25mA durante 80 minutos. Pasado ese tiempo, se utiliza sulfato de cobre para teñir el gel y se obtiene una fotografía del resultado. De esta manera se pueden comparar las bandas correspondientes a cada polímero con las del marker para obtener el peso molecular aproximado.

Pocillos	Marker	Muestra
10	5 μ l	4 μ l
15	4 μ l	2,4 μ l

Tabla 2. Cantidades de marker y muestra en función del número de pocillos

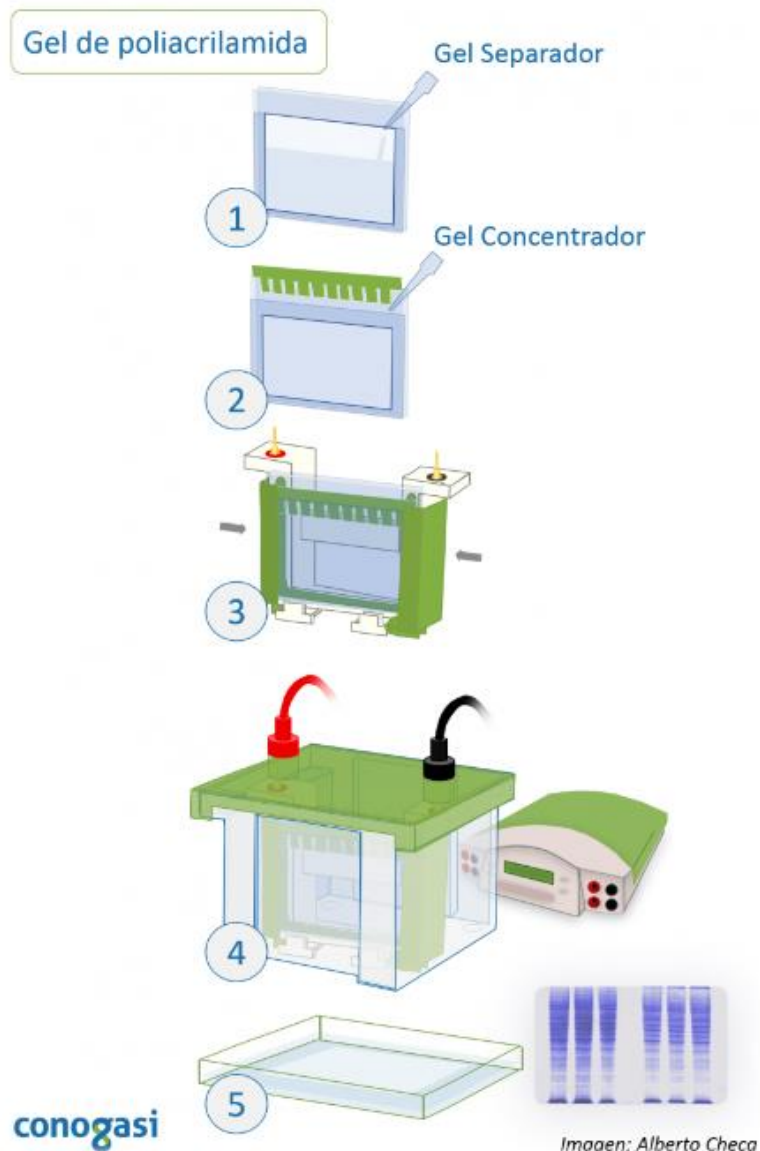


Figura 8. Pasos a seguir para llevar a cabo la electroforesis SDS-PAGE

4.4.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica utilizada para estudiar el comportamiento de núcleos atómicos en presencia de un campo magnético externo. Al aplicar un campo magnético, los niveles de energía degenerados del spin nuclear se desdoblán, lo que permite la inducción de transiciones entre ellos mediante la absorción de radiación electromagnética a una determinada frecuencia, conocida como frecuencia de resonancia. La frecuencia de resonancia, la energía absorbida y la intensidad de la señal en la RMN son proporcionales a la fuerza del campo magnético aplicado. [36], [37]

El análisis de la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un determinado núcleo proporciona información sobre la estructura de las moléculas.

Los núcleos de las moléculas orgánicas se encuentran rodeados de electrones, los actuales actúan como barrera frente al campo magnético externo, se dice que el núcleo está apantallado. Dicho conjunto de electrones en movimiento genera un campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo. Esta oposición, es conocida como diamagnetismo y es causada por la corriente inducida en la nube de electrones alrededor de cada núcleo.[38] Consecuentemente, el campo magnético que llega al núcleo es más débil que el campo externo, por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia, el campo externo debe ser mayor. [39]

En una molécula, los protones no están protegidos o apantallados de la misma manera, ya que se encuentran en entornos electrónicos diferentes, por lo tanto, tienen frecuencias de resonancia distintas. [38]

El espectro obtenido muestra gráficamente la intensidad de la señal en relación con la frecuencia de la energía electromagnética liberada por los diferentes núcleos de la muestra. Los cambios en las frecuencias de absorción debido al fenómeno de apantallamiento, se conoce como desplazamiento químico.

El software de análisis de los espectros realiza un proceso de integración, calcula el área comprendida debajo de un pico, el cual es proporcional al número de átomos de hidrogeno que generan dicho pico.

Esta técnica se ha utilizado para la caracterización estructural de los polímeros y cuantificación del rendimiento de la modificación química. Para ello se ha utilizado el espectrómetro automático “Agilent Technologies NMR 400” perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVa.

4.5 Limpieza y activación de superficies

El Plasma cleaning permite la limpieza uniforme y segura de superficies. A partir de distintas especies gaseosas, como argón y oxígeno. A partir de ellas, se crea un plasma energético o de descarga de barrera dieléctrica capaz de eliminar residuos orgánicos de diferentes superficies. Se utilizan voltajes de alta frecuencia para conseguir ionizar el gas a baja presión. [39]

El plasma, es el cuarto estado de la materia caracterizado por la excitación e ionización parcial de los átomos de un gas, lo que provoca la emisión de los fotones de luz y crea el brillo característico asociado con este estado. Está compuesto por una variedad de especies reactivas, como átomos, moléculas en estados electrónicos excitados, iones, electrones, radicales libres y fotones en el rango de UV de onda corta. Estas especies interactúan con cualquier superficie presente en la cabina del plasma. [40]

Para generar plasma, se lleva a cabo un proceso en condiciones de vacío. Consiste en introducir el gas en una cámara e ionizarlo mediante un generador de alta frecuencia, el cual utiliza energía de campo eléctrico. El generador suministra la energía necesaria para ionizar el gas, lo que implica la transferencia de electrones a los átomos o moléculas presentes en el gas. Esto provoca la formación de especies cargadas eléctricamente en el plasma. [41]

En función del gas ionizado, el plasma muestra un determinado color, blanco (hidrógeno), morado/naranja (argón).

A diferencia de los líquidos, sólidos y gases, el plasma no tiene una forma o volumen definidos, ya que los átomos y moléculas se descomponen en partículas cargadas eléctricamente, como iones positivos y electrones libres. Esta propiedad le otorga al plasma una alta conductividad eléctrica debido a la presencia de cargas eléctricas móviles.[40]

La limpieza de las superficies con el Limpiador de Plasma, como se ha descrito previamente, se basa en la utilización de gases, en este caso el argón y oxígeno. Los átomos e iones activados por plasma descomponen los contaminantes orgánicos presentes en la superficie y son vaporizados y eliminados de la cámara durante el proceso. Los radicales de oxígeno se unen a la superficie del material activándola, para facilitar la unión de otras moléculas. [41]

La limpieza con plasma además de eliminar las impurezas de las superficies aumenta la biocompatibilidad y bioactividad, por lo que son muy utilizados en campos como la ingeniería de tejidos.

Al llevar a cabo esta técnica es necesario considerar ciertas variables como la presión, intensidad de la radiofrecuencia, tiempo de exposición al plasma y caudal del gas para

garantizar la eficacia del proceso y evitar problemas como la inestabilidad del plasma y el sobretratamiento de muestras. [39]

La generación de un plasma inestable tiene lugar cuando no se utiliza la presión correcta y en su lugar se utilizan valores demasiado altos o bajos, lo que afecta negativamente a la eficacia del proceso. [39]

El sobretratamiento de las muestras provocado por una exposición excesivamente prolongada al plasma puede producir la fragmentación física de la muestra.

El flujo de gas utilizado depende del volumen de la cámara, del sistema de bombeo y de la presión de operación. Estos factores influyen en la cantidad y distribución del gas dentro de la cámara de plasma para mantener un entorno adecuado.

En este trabajo, las superficies activadas son cristales de cuarzo recubiertos de titanio (Biolin Scientific, usados como sensores para la QCM-D), los cuales se trataron con el equipo Harrick Plasma Cleaner PDC-002.[42] En primer lugar, se usó plasma de argón durante 10 minutos a alta potencia y posteriormente plasma de oxígeno durante el mismo tiempo para limpiar y activar las superficies.



Figura 9. Harrick Plasma Cleaner PDC-002

4.6 Mirobalanza de Cuarzo con Disipación (QCM-D)

La microbalanza de cuarzo con disipación, también denominada QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Disipation), es un dispositivo para medir cambios en la masa y disipación en una superficie.

El funcionamiento de una microbalanza de cuarzo con disipación se basa en un cristal de cuarzo piezoeléctrico que oscila en su frecuencia de resonancia cuando se le aplica un campo eléctrico alterno. El cristal de cuarzo se coloca en contacto con la muestra de interés y cualquier cambio en la masa o las propiedades viscoelásticas de la superficie afectará a la frecuencia y amplitud de la vibración del cristal. [43]

Cuando se produce un cambio en la masa de la superficie, como adsorción de moléculas o interacciones químicas, la frecuencia de vibración del cristal varía en función de la masa añadida o eliminada. Esto permite cuantificar y seguir en tiempo real los cambios de masa de la superficie. Además de medir cambios de masa, también se puede evaluar la disipación de energía en la superficie. La disipación está relacionada con las propiedades viscoelásticas de la capa adsorbida en la superficie. Al analizar la disipación se puede obtener información sobre la interacción de las moléculas en la superficie. De esta manera registra variaciones de frecuencia y disipación hasta el armónico 13, para detectar adsorción y desorción de masa en el rango de nanogramos, así como las propiedades mecánicas de la capa. [44]

Se utilizó el equipo Q-Sense Explorer System (Biolin Scientific, Suecia) y sensores piezoeléctricos de cuarzo recubiertos de titanio previamente limpiados y activados con el Plasma Cleaner.

4.6.1 Silanización de las superficies

En primer lugar, se realizó un proceso de silanización sobre las superficies activadas, previo a la biofuncionalización con la adición de los biopolímeros. El proceso llevado a cabo fue el siguiente:

Como ha sido descrito anteriormente se activaron las superficies de titanio utilizando un tratamiento de plasma de oxígeno. Consiguiendo eliminar residuos de las superficies y creando grupos hidroxilo (OH⁻) capaces de reaccionar con los grupos silano.

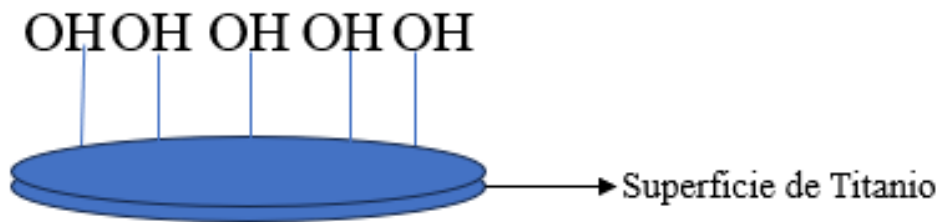


Figura 10. Activación de la superficie con plasma de oxígeno.

El tratamiento de silanización se llevó a cabo utilizando la microbalanza de cuarzo con disipación. Los grupos hidroxilo se desplazan a los grupos alcoxi en el silano, formando un enlace covalente -Si-O-Si.

Los pasos seguidos para llevar a cabo la silanización de las superficies previamente activadas se describen a continuación:

- 1) Inyectar un flujo de etanol absoluto para definir una línea base estable.
- 2) Silanización con 11-azidoundecyltriethoxysilane. Para ello, inyectar una disolución de 92% etanol, 5% agua miliQ, 3% silano y una gota de ácido acético, durante aproximadamente 15 minutos hasta conseguir una línea estable.
- 3) Realizar un lavado con etanol absoluto con el fin de retirar el exceso de la disolución anterior que no se ha adherido de manera adecuada.

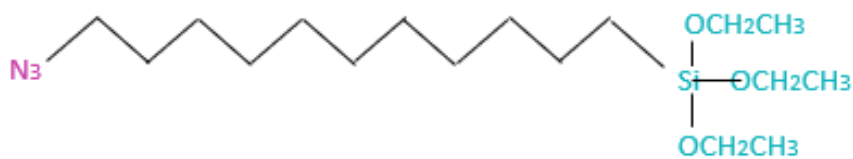


Figura 11. Fórmula 11-azidoundecyltriethoxysilane

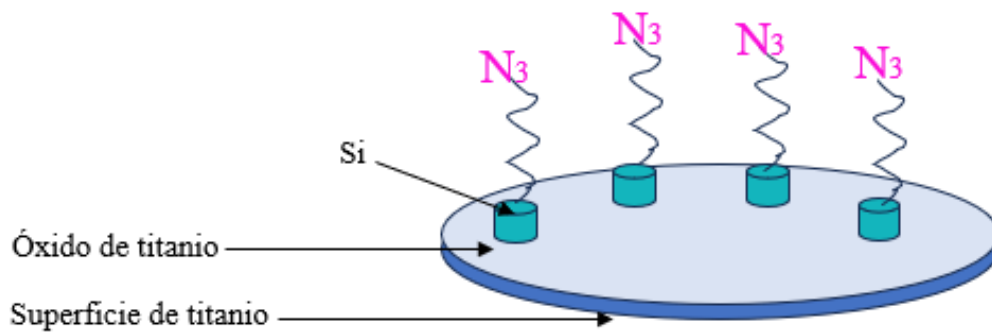


Figura 12. Superficie silanizada

4.6.2 Biofuncionalización de las superficies con los ELRs

Una vez realizado el proceso de silanización se comenzó la biofuncionalización de las superficies con la adición de los polímeros. Este proceso consistió en ciclos sucesivos de deposición de unos determinados ELRs, seguido de periodos de lavado con agua hasta conseguir 2 capas de polímeros.

Para ello, en primer lugar, se hizo pasar un flujo de agua con el fin de conseguir una línea de referencia. Posteriormente se empezó a constituir la primera capa formada por el VKV-ciclooctino y el HRGD-N₃. Para ello se hizo pasar una disolución del primer polímero con una concentración de 5mg/ml, seguida de un proceso de lavado y a continuación la disolución del segundo ELR, con la misma concentración, seguida de su correspondiente lavado. Este proceso se repitió una vez más para conseguir una segunda capa igual que la primera. Las capas interaccionaron entre si mediante reacciones click producidas entre sus grupos funcionales (N₃ – ciclooctino).

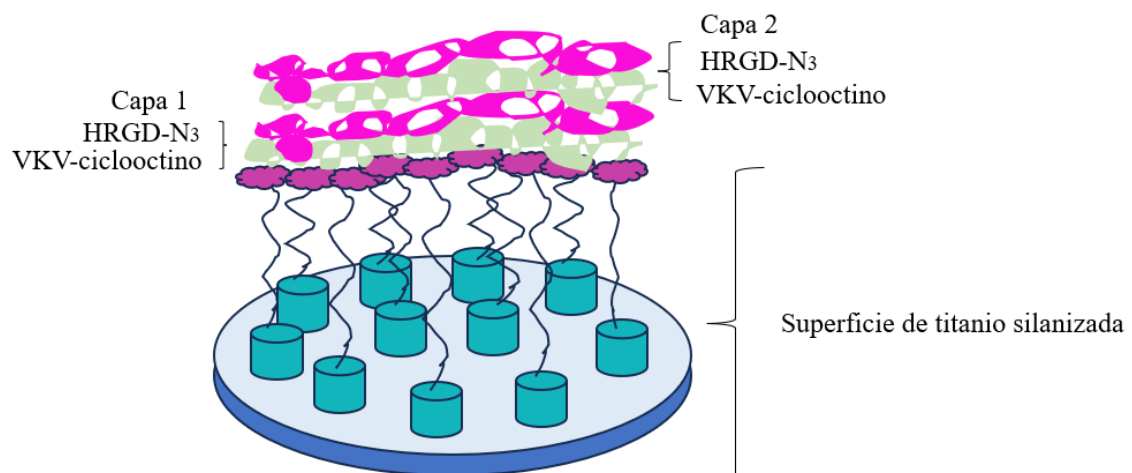


Figura 13. Superficie de titanio biofuncionalizada

Las mediciones se llevaron a cabo a 10°C manteniendo todas las disoluciones en hielo para evitar la transición de los polímeros. El caudal utilizado fue de 20µl/min, suministrado por una bomba peristáltica.

Los datos experimentales se analizan y describen utilizando modelos matemáticos disponibles en el software Biolin Scientific. Este software permite un tratamiento adecuado de los datos obtenidos.

En particular, el software Q-sense D-find proporciona modelos de dos capas basados en el modelo Voigt. Estos modelos permiten analizar y comprender las propiedades de las capas.

El programa tiene disponibles tres modelos:

- Sauerbrey: puede ser utilizado cuando los valores de disipación son muy pequeños, es decir, cuando la capa formada es rígida.
- Smartfit y Broadfit se utilizan cuando la monocapa presenta elasticidad, es decir, los valores de disipación son altos. En este caso se utiliza el modelo Smartfit para el ajuste de los datos.

El modelo Dfind Broadfit evalúa los datos experimentales y selecciona el mejor ajuste para cada intervalo de tiempo. Es decir, se ajusta el modelo de dos capas a los datos y elige el ajuste que mejor se adapte a los datos experimentales en cada intervalo de tiempo específico. El ajuste se realiza evaluando los datos de atrás hacia adelante. Por otro lado, el Dfind Smartfit asume que los datos representan cambios suaves en la capa superficial. Realiza el ajuste analizando los datos de adelante hacia atrás. Este enfoque presenta dos mejores soluciones de resultados continuos, ofrece los dos ajustes que mejor representen los cambios en la capa superficial a lo largo del tiempo. [45]

4.7 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una propiedad que nos indica como de hidrófoba o hidrofílica es una superficie. Se calcula midiendo el ángulo formado entre el líquido y el sólido cuando entran en contacto. Este ángulo depende principalmente de la relación entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido, así como de las fuerzas cohesivas dentro del mismo líquido. El ángulo de contacto muestra cómo se forma una interfaz entre la fase sólida y la líquida en la superficie del sólido. [46], [47]

Para la determinación del ángulo de contacto entre la fase líquida y la sólida Las gotas se formaron con agua ultrapura y se establecieron los parámetros de drenaje en el software Data Physics OCA 20, determinando un volumen de 1 μl por gota y una velocidad de salida de 5.78 $\mu\text{l/s}$.

En este procedimiento, se coloca una gota en cualquier ubicación de la superficie de los sensores de titanio. Posteriormente, con el fin de conseguir una imagen con bordes claros se ilumina con luz difusa. La imagen obtenida se proyecta sobre un microscopio equipado con un goniómetro graduado. El goniómetro es un dispositivo circular o semicircular para medir ángulo en un rango de 180 a 360 grados, dicho dispositivo permite medir los ángulos entre la fase líquida y la sólida en la imagen proyectada.

Con ayuda de una cámara de video se pueden 8 proyectar las imágenes en blanco y negro en un monitor para su análisis. Se realizan 4 repeticiones de este proceso para realizar un análisis estadístico. Se determinó el ángulo en cada superficie en diferentes ocasiones. En función de la variación del valor del ángulo de contacto se puede determinar la hidrofobicidad de la superficie.

Cuando las fuerzas de adherencia son muy altas, el líquido se ve atraído por la superficie y se expande, se trata de una superficie hidrofílica (ángulo entre de 10° - 90°), si el ángulo formado es menor de 10°, se trata de una superficie superhidrofílica. En caso de que las fuerzas de atracción sean bajas, la superficie repelerá el líquido y el ángulo será mayor que en el caso anterior, ya que se tratará de una superficie hidrofóbica (ángulo entre 90°- 120°). Si el ángulo es superior a 120°, la superficie es superhidrofóbica.

4.8 Estudio de la viabilidad celular

Se llevó a cabo un estudio de la viabilidad celular sobre las superficies previamente modificadas con los ELRs, superficies silanizadas y superficies de titanio utilizadas como controles. Para ello, se cultivaron HFF1 (Human Foreskin Fibroblast) in vitro sobre dichas superficies y se evaluó su proliferación a las 24 y 96 horas utilizando un microscopio óptico y llevando a cabo una tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El procedimiento seguido se describe a continuación:

Descongelar líneas celulares de fibroblastos:

Las células son congeladas en nitrógeno líquido a muy bajas temperaturas, entre los -80°C-196°C. De esta manera se ralentiza cualquier actividad biológica y es posible

conservarlas sin que sufran ningún daño. La criopreservación hace posible el correcto mantenimiento de las células impidiendo la pérdida de sus propiedades para que estén en perfectas condiciones para ser utilizadas al ser descongeladas.

En la congelación de las células se utilizan diferentes agentes crioprotectores, los cuales son sustancias solubles en agua y de baja toxicidad capaces de disminuir el punto eutéctico de una solución, es decir, la temperatura a la que solidifica será menor. Esto aumenta la hidratación de la célula y disminuye el gradiente osmótico al que estará sometido.[48] Para la congelación de fibroblastos se ha utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector. Debido a su bajo peso molecular, es capaz de penetrar rápidamente a través de la membrana de las células y reemplazar el agua de su interior. De esta manera forma una solución congelable, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares los cuales rompen la estructura de la membrana. Además, también evita la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento. No obstante, puede ser un compuesto tóxico para las células, por esta razón hay que optimizar las condiciones de criopreservación para cada línea celular.[48][49]

Para llevar a cabo la descongelación de las células se sigue un determinado protocolo constituido por los siguientes pasos: [50]

1. Preparar medio de cultivo específico para la línea celular. En el caso de los fibroblastos se utiliza DMEM 4,5 g/l Glucose; 4mM Gln 1mM NaPYR; 1,5g/l Na_2CO_3 + 15% FBS P/S.
2. Extraer el vial que contiene las células deseadas del tanque de congelación.
3. Descongelar dicho vial rápidamente en un baño de agua a 37°C.
4. Transferir las células descongeladas a un flask y cubrir su base con el medio de cultivo específico.
5. Incubar a 37°C con 10% de CO_2

Cambio de medio de cultivo

Cuando las líneas celulares experimentan un crecimiento óptimo y ocupan una porción considerable de la superficie del recipiente de cultivo, se produce un agotamiento de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, así como la acumulación de productos de desecho. Con el propósito de restablecer los nutrientes agotados y eliminar los productos de degradación, se lleva a cabo un cambio de medio de cultivo pasado un determinado

tiempo dependiendo de la línea celular. En este caso se realizó a las 48 horas. Durante este proceso se puede observar un cambio en el color del medio de cultivo producido por un cambio de pH debido a su acidificación.

El protocolo para realizar un cambio de medio es el siguiente: [51]

1. Atemperar el medio a 37°C en el baño, con el fin de causar el menor daño posible a las células.
2. Retirar el medio de cultivo sobrenadante con una bomba.
3. Añadir 12-15ml de medio, lo necesario para cubrir el fondo del flask.
4. Incubar a 37°C con 10% de CO₂

Pase de células y contaje

El objetivo del cultivo de fibroblastos es la proliferación de las células con el fin de conseguir la cantidad suficiente para poder cultivarlas sobre las diferentes superficies y de esta manera analizar su comportamiento sobre dichas superficies. Pasadas 24 horas del cambio de medio se realizó un contaje de células para asegurar la existencia de la cantidad necesaria para llevar a cabo el pase de células.

Los pasos seguidos se describen a continuación: [52]

1. Retirar el medio de las células con una bomba y una pipeta de 1ml.
2. Añadir 7-8ml de PBS para lavar las células y dejar durante 15 minutos a 37°C.
3. Retirar el PBS con la bomba.
4. Añadir 3ml de Tripsina + EDTA y rascar.
5. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
6. Añadir 3ml de medio (misma cantidad que de tripsina).
7. Pipetear bien para deshacer agregados.
8. Centrifugar a 220xg durante 5 minutos a 37°C.
9. Resuspender en 2ml de medio.
10. Dejar un poco de medio con células en un trozo de parafilm.
11. Coger 10µl de Trypan blue stain y mezclar bien con 10µl del medio con células del parafilm.
12. Depositar en una cámara de Neubauer y contar células.
13. Hacer la media de la media de las células contadas y convertirlas en cel/ml, para ello se multiplica por 2*10E4.

La cámara de Neubauer consta de una placa de vidrio con un patrón de cuadrículas grabado en su superficie. Esta placa tiene una cámara central dividida en áreas más pequeñas y cuadradas. Para realizar el recuento de células se coloca una muestra de la suspensión celular en la cámara, permitiendo que las células se distribuyan uniformemente sobre la superficie de la cuadrícula. Utilizando un microscopio se cuentan las células presentes en cada cuadrado. La cuadrícula está calibrada de manera que se puede determinar el volumen y concentración de células de la muestra original. [53]

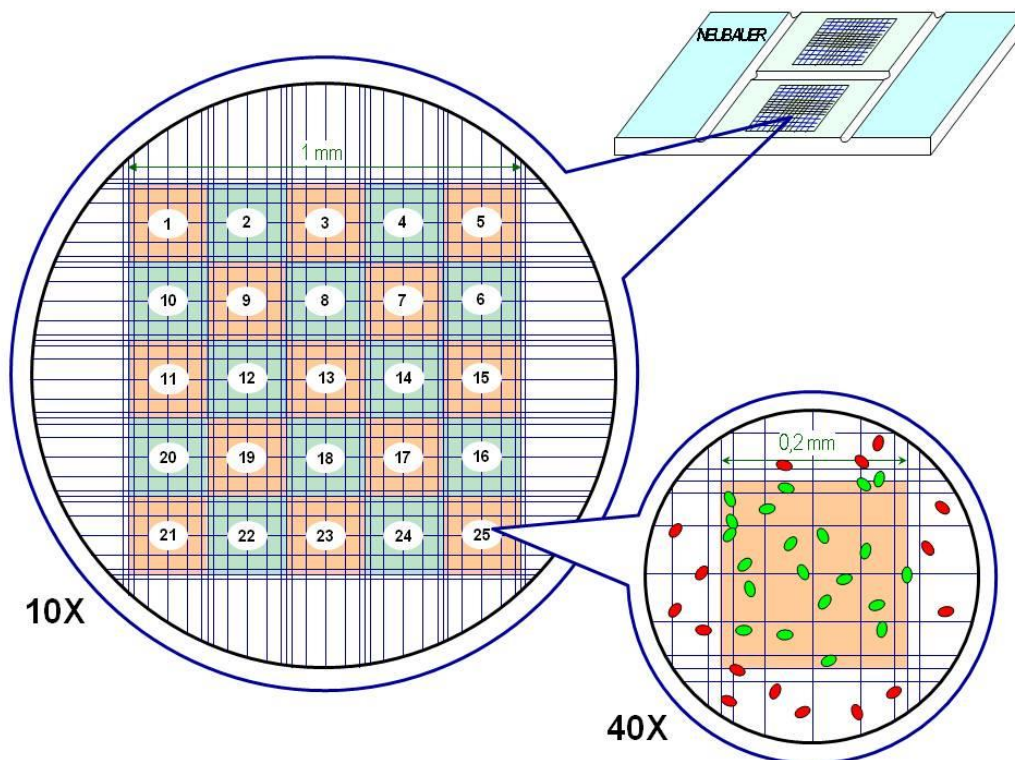


Figura 14. Cámara de Neubauer y cuadrícula de conteo

Una vez realizado el conteo de las células se procedió a efectuar el pase a las diferentes superficies. Se cultivaron 50000 células/superficie, para ello se colocaron las muestras sobre unos pocillos, se depositó la cantidad necesaria sobre las superficies y se añadió medio de cultivo alrededor. Las muestras se incubaron a 37°C.

Viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular consistió en observar el crecimiento de las células sobre las distintas superficies a las 24 y 96 horas, utilizando un microscopio de fluorescencia. A las 96 horas se tiñeron las células con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se trata de una tinción de ácido nucleico fluorescente azul. Su capacidad de selección del ADN y

gran permeabilidad celular permite una tinción eficaz de los núcleos con poco fondo del citoplasma. [54]

En las condiciones adecuadas, las células muertas producen una señal fluorescente cuando se las excita con un láser ultravioleta. De esta manera es posible ver los núcleos de color azul.

El protocolo llevado a cabo para la tinción es el siguiente:

1. Lavar con PBS (2x2ml).
2. Fijar células con Formaldehído al 3,7% en PBS, utilizar la cantidad suficiente para cubrir las células. Dejar durante 10 minutos.
3. Lavar con PBS (2x2ml).
4. Permeabilizar con Tritón x100 0,1% en PBS, utilizar la cantidad suficiente para cubrir las células. Dejar durante 10 minutos.
5. Lavar con PBS (2x2ml).
6. Incubar con PBS y BSA 1% durante 25 minutos.
7. Lavar con PBS (2x2ml).
8. Añadir DAPI (150 μ l) durante 1,5 minutos.
9. Lavar con PBS (2x2ml).

Las muestras se mantuvieron durante 24 horas en oscuridad antes de tomar las imágenes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se van a analizar los resultados obtenidos en las diferentes técnicas realizadas, con el fin de comprobar si se han cumplido los objetivos fijados. En primer lugar, se estudian las modificaciones químicas de los polímeros utilizados, HRGD-N₃ y VKV-ciclooctino, mediante las técnicas de FTIR, DSC, electroforesis y RMN. En segundo lugar, se exponen los resultados obtenidos en la modificación de las superficies de titanio mediante la tecnología Layer by layer utilizando química click. Por último, se valora la proliferación celular sobre las superficies previamente modificadas.

5.1 Caracterización de HRGD-N₃ y VKV-ciclooctino

Los polímeros utilizados fueron modificados por miembros del grupo Bioforge, en este proyecto solo se ha llevado a cabo su caracterización mediante técnicas como FTIR, DSC, electroforesis y RMN.

5.1.1 Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Mediante la espectrometría de infrarrojo de transformada de Fourier se obtiene un espectro del polímero modificado, el cual se compara con el espectro del polímero sin modificar con el objetivo de comprobar la correcta adición del grupo funcional.

HRGD-N₃

El espectro FTIR del polímero RGD-N₃ obtenido se adjunta en la figura:

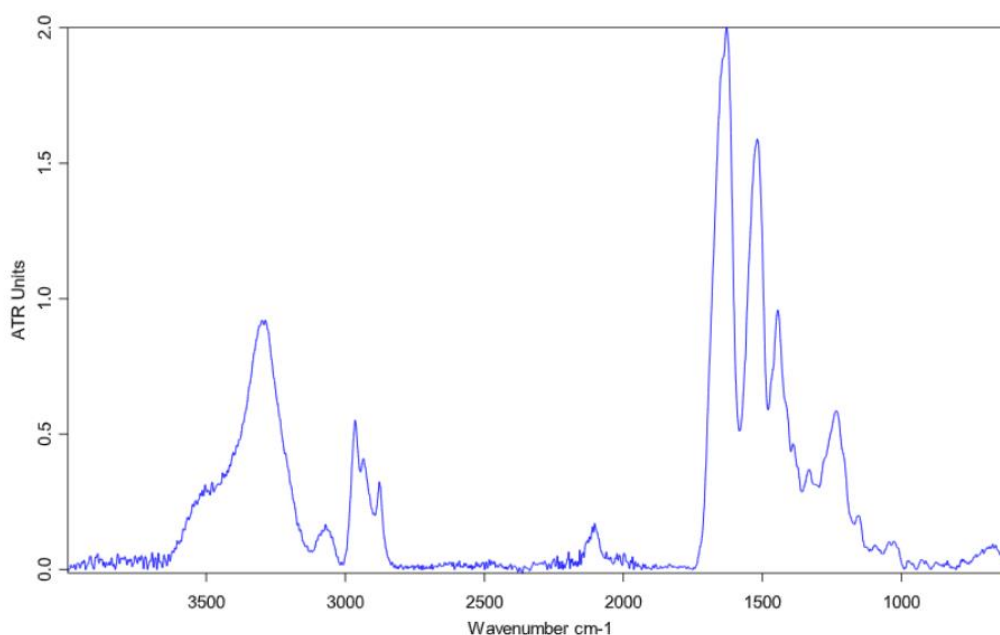


Figura 15. Espectro FTIR de HRGD-N₃

Al analizar el espectro obtenido y compararlo con el correspondiente al HRGD6 sin modificar [55], se puede confirmar la correcta modificación del polímero. El valor teórico de frecuencia del grupo azido (N_3) se encuentra entre los $2160-2120\text{ cm}^{-1}$ y dado que el valor obtenido está alrededor de los $2100-2200\text{ cm}^{-1}$. El resultado experimental indica que el grupo azido sí ha sido añadido al polímero.

VKV-ciclooctino

El espectro FTIR del polímero VKV-ciclooctino obtenido se adjunta en la figura:

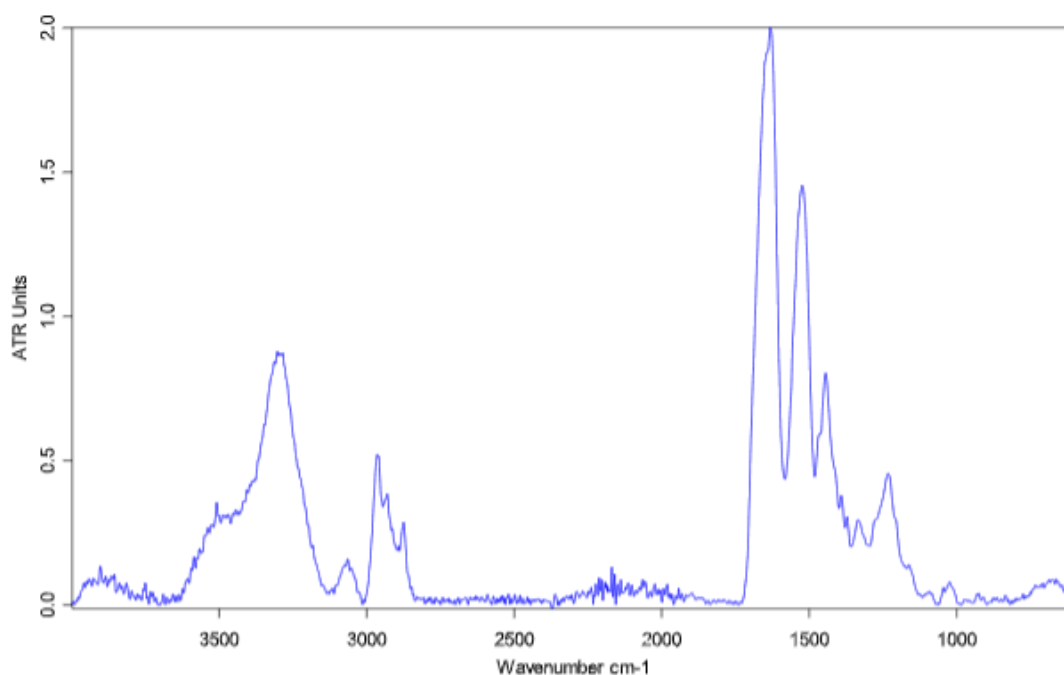


Figura 16. Espectro FTIR de VKV-ciclooctino

A diferencia del HRGD- N_3 , en este caso, no es posible determinar si se ha producido correctamente la modificación química únicamente analizando el espectro, ya que al comparar el espectro del VKV-ciclooctino con el del VKVx24 puro, sin modificar [56], no se observan diferencias significativas. Debido a la simetría del anillo del ciclooctino no es posible detectar la señal del triple enlace en la región $2500-2000\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de los enlaces de los grupos añadidos en la modificación química, ya que la vibración del triple enlace entre los átomos de carbono experimenta una cancelación de los dipolos. Para complementar la caracterización, se realiza una Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

5.1.2 Cálculo de la Temperatura de Transición Inversa

Se ha utilizado la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la temperatura de transición inversa (TTI) de los polímeros VKV-ciclooctino y HRGD-N₃. Para ello se siguieron los pasos descritos en el apartado 4.3.2 en el que se hace referencia a esta técnica.

Para calcular la temperatura de transición inversa se realizaron 3 medidas de DSC con las disoluciones preparadas y se calculó la media de los picos de transición obtenidos de dichas medidas, así como su desviación estándar. Las gráficas correspondientes a cada medida se encuentran en el anexo (A1).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Para la disolución de VKV-ciclo se obtuvo una temperatura de transición inversa de 19.89 ± 0.20 °C, mientras que la temperatura medida para el HRGD- N₃ se de 16.19 ± 0.17 °C.

Los ELRs tienen un comportamiento termosensible, como ya se ha descrito en el apartado 3.3. A temperaturas inferiores que su temperatura de transición inversa, las cadenas permanecen extendidas y al superar dicha temperatura se produce un reordenamiento de su estructura, ésta se pliega formando una estructura regular mantenida gracias a interacciones hidrofóbicas. Puesto que las temperaturas de transición inversa de ambos polímeros son inferiores que la temperatura fisiológica (37°C), se puede confirmar que los ELRs formarán agregados a dicha temperatura.

ELR	Temperatura de transición inversa (°C)
VKV-ciclo	19.89 ± 0.20
HRGD-N ₃	16.19 ± 0.17

Tabla 3. Resultados de la temperatura de transición inversa para el VKV-ciclo y HRGD-N₃

5.1.3 Estimación del peso molecular

La electroforesis se utiliza para estimar el peso molecular de una muestra de un polímero mediante la comparación con un marcador de peso molecular conocido.

Siguiendo los pasos descritos en el apartado 4.3.4 se llevó a cabo la electroforesis SDS-PAGE para determinar de manera aproximada el peso molecular de los dos polímeros modificados, HRGD-N₃ y VKV-ciclooctino.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17. La imagen se extrajo directamente del sistema de captura de imágenes Gel Doc EZ.

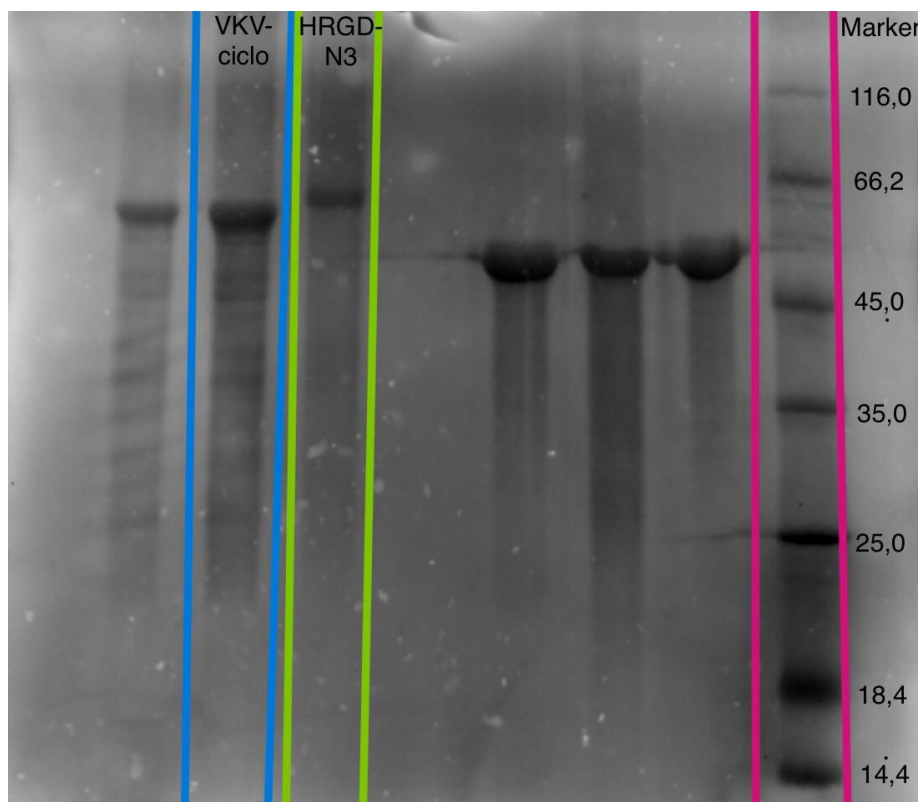


Figura 17. Gel de electroforesis con las muestras de HRGD-N3 (verde), VKV-ciclooctino (azul) y el marker (rosa).

El peso molecular de ambos polímeros se encuentra ligeramente por debajo del indicador de 66.2KDa, siendo el del VKV-ciclooctino levemente inferior al del HRGD-N₃.

El peso molecular teórico del VKV-ciclooctino es 61.783 KDa y el del HRGD- N₃ es ligeramente superior, 62.243 KDa[57]. Se puede confirmar que los valores obtenidos son correctos comparando las estimaciones obtenidas con el peso molecular teórico de los polímeros. No obstante, los resultados proporcionados por esta técnica son aproximados, por lo que hay que complementar la caracterización con los resultados proporcionados por otras técnicas como el FTIR, DSC, RMN, las cuales aportan información complementaria sobre las características de los polímeros modificados.

5.1.4 Cálculo del porcentaje de polímero modificado

Se lleva a cabo una espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) con el fin de comprobar la correcta modificación de los polímeros HRGD-N₃ y VKV-ciclooctino y calcular el porcentaje de modificación de estos.

Los resultados obtenidos al llevar a cabo el RMN de los polímeros modificados, se puede comparar con el espectro correspondiente del polímero sin modificar, con el objetivo de observar las diferencias entre ambos.

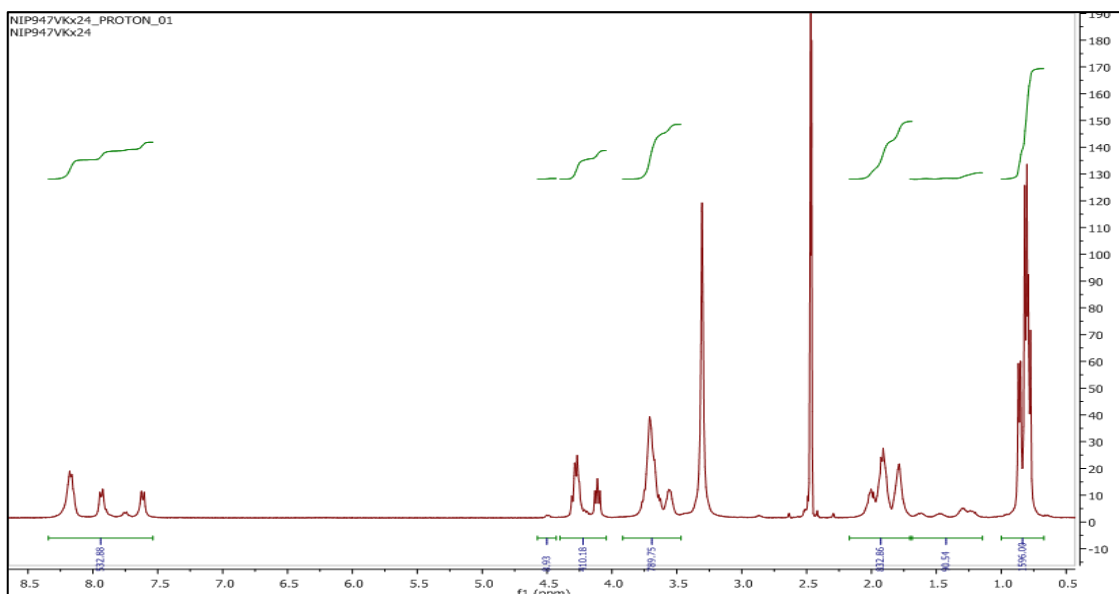


Figura 18. RMN ELR sin modificar

En la Figura 19 se muestra el espectro de RMN del HRGD-N₃, donde se han integrado las señales para determinar la cantidad de lisinas modificadas. Analizando la secuencia de aminoácidos del polímero HRGD6 puro, se obtienen las siguientes cantidades de grupos funcionales [58]

- 1356 CH₃ cuyos protones salen en torno a 1ppm.
- 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.

A continuación, se va a comparar con el del HRGD-N₃ obtenido. Para ello, se toma la línea base de referencia en los protones de los metilos imponiendo una integral de 1356. Entre 1 – 2 ppm se obtienen señales cuya suma de las integrales coincide de manera aproximada con el valor de los protones del HRGD6 puro en la zona esperada para los CH₂. En la región 3.5 – 4.5 ppm, la suma de los valores de la integral también corresponde con los protones de CH₂. El valor de la integral 520.91 en 8 ppm coincide con los protones de los NH.

Los picos situados en 7.3 ppm, 3 ppm y 4 ppm no se corresponden con el espectro del HRGD6 sin modificar, por lo tanto, esas señales son las que se corresponden con las lisinas modificadas. Esta señal se integra a 13.11, lo que indica que se han modificado 13.11 grupos amino de las 24 lisinas. El resultado obtenido se corresponde con una modificación del 54.63%.

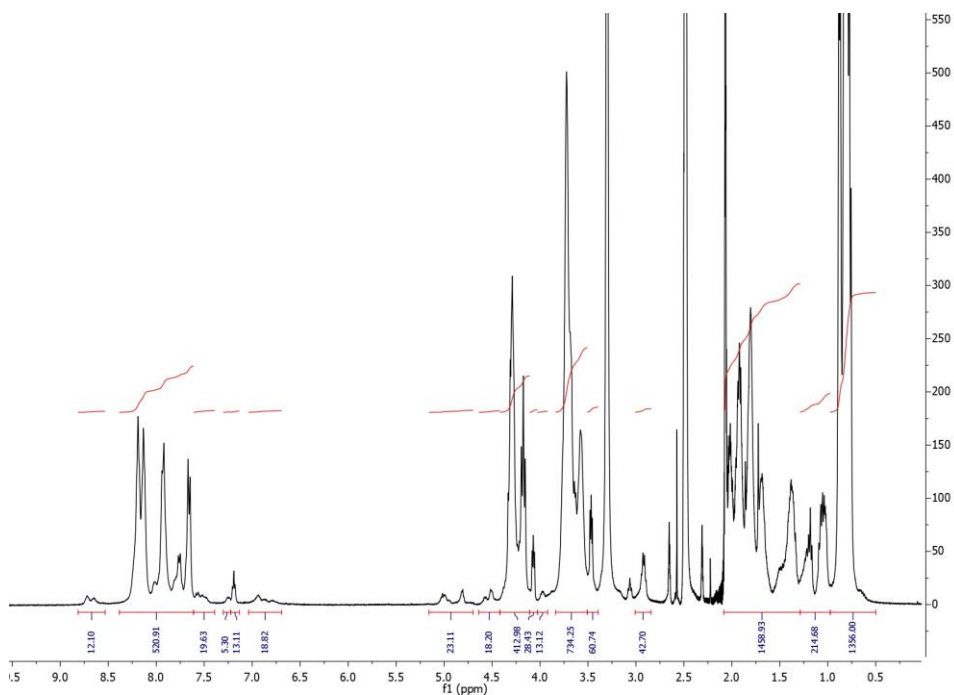


Figura 19. RMN HRGD-N3

VKV-ciclooctino

En la Figura 20 se muestra el espectro de RMN del VKV-ciclooctino, Analizando la secuencia de aminoácidos del polímero VKVx24 puro, se obtienen las siguientes cantidades de grupos funcionales [59]

- 1596 CH₃ cuyos protones salen en 1ppm.
- 564.69 NH cuyos protones salen en 8 ppm.
- 422.7 CH cuyos protones salen en 1.7 - 1.8 ppm.
- 838.46 CH₂ cuyos protones salen en 2.0 – 2.7 ppm
- 1261.15 CH₂ cuyos protones salen en 3.5 – 4.5 ppm.

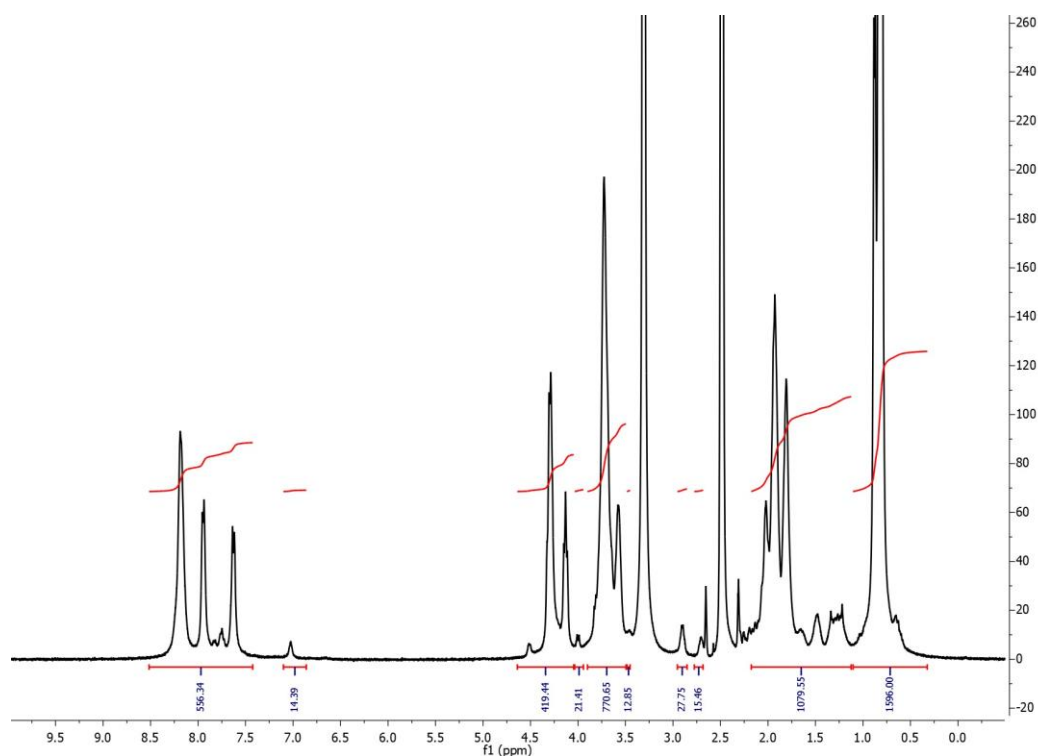


Figura 20. RMN del VKV-ciclooctino

En el espectro obtenido del polímero modificado, se impone la línea base de referencia en los protones del CH₃, cuya integral se establece a 1596. Los valores de los protones del resto de grupos dependen del ajuste de dicha línea base, por lo que sus mediciones podrían verse afectadas si la línea base se selecciona de manera incorrecta.

Al analizar el espectro, se pueden ver señales entre 1.0 – 2.7 ppm que integran a 1079.55 y 15.46 cuya suma equivale aproximadamente a la suma de los protones del VKVx24 puro en esa región donde aparecen los primeros grupos CH₂. En la región entre 3.5 – 4.5 ppm la suma de las integrales es 1224.35 que es aproximadamente el valor de los protones teóricos de los CH₂ en esa zona. Por último, en 8ppm se encuentran los portones de los grupos aminos que integran en 556.34 ppm.

Además, aparecen tres picos adicionales en 3, 4 y 7 ppm que en el espectro del polímero puro no aparecían, los cuales corresponden con la modificación química del polímero. El pico situado a 7 ppm se debe a la sustitución de los protones en el grupo amina de la lisina por un protón adicional enlazado al grupo amida. Los picos visibles a 3 y 4 ppm indican otras modificaciones en la estructura del polímero debido a la introducción de grupos ciclooctinos.

La proporción de lisinas modificadas se obtiene con la integral del pico en 7 ppm, ya que nos ofrece mayor precisión en la medida debido a su aislamiento con respecto a otras señales. La integral de dicho pico indica la existencia de 14.39 lisinas modificadas de las 24 que había en el polímero puro. Por tanto, el porcentaje de modificación es 59.96%. Durante la modificación química se altera aproximadamente el 60% de las lisinas del polímero.

5.2 Microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D)

Se empleó la técnica de la microbalanza de cuarzo para estudiar tanto la masa depositada durante los procesos de silanización y biofuncionalización de las superficies como el espesor de las capas formadas. Se evaluaron las variaciones de frecuencia y disipación, las cuales están relacionadas con el espesor y rigidez de las capas de polímero depositadas. Para ello se midieron la frecuencia y disipación en varios armónicos, desde el fundamental hasta el treceavo, no obstante, los datos de los armónicos 1 y 13 se descartaron ya que conducen a una pérdida de señal.

5.2.1 Silanización de las superficies

En la figura 21 se muestra la curva obtenida con la microbalanza correspondiente al proceso de silanización. Se han representado las frecuencias y disipaciones correspondientes a los armónicos 3,5,7,9 y 11.

Se pueden distinguir tres eventos. El primero corresponde a un flujo de etanol absoluto sobre el sensor previamente activado con el Plasma Cleaner, el cual define la línea base. El segundo representa la deposición de la disolución de silano y el tercero hace referencia a un proceso de lavado y estabilización, realizado de nuevo con etanol puro, el cual determina el espesor de la capa final de silano depositada.

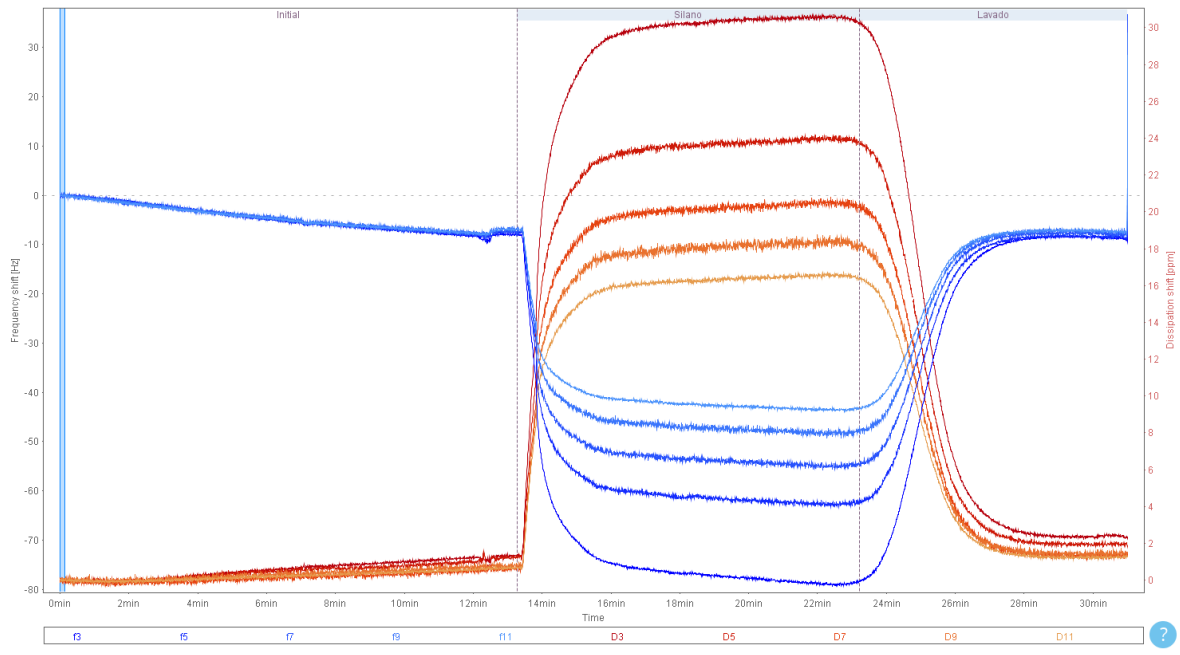


Figura 21. Curva representativa de los armónicos 3,5,7 y 9 obtenida con la Microbalanza de Cuarzo con Disipación en el proceso de silanización

En la figura 22 se ha representado la evolución temporal de la frecuencia. Se observa una caída precipitada de ésta en la fase de deposición, demostrando una correcta deposición de la disolución sobre el sustrato, ya que la disminución de la frecuencia indica un aumento de la masa sobre el sensor. Por otro lado, en la fase de lavado se observa un aumento notable de la frecuencia, producido por pérdidas importantes de masa.

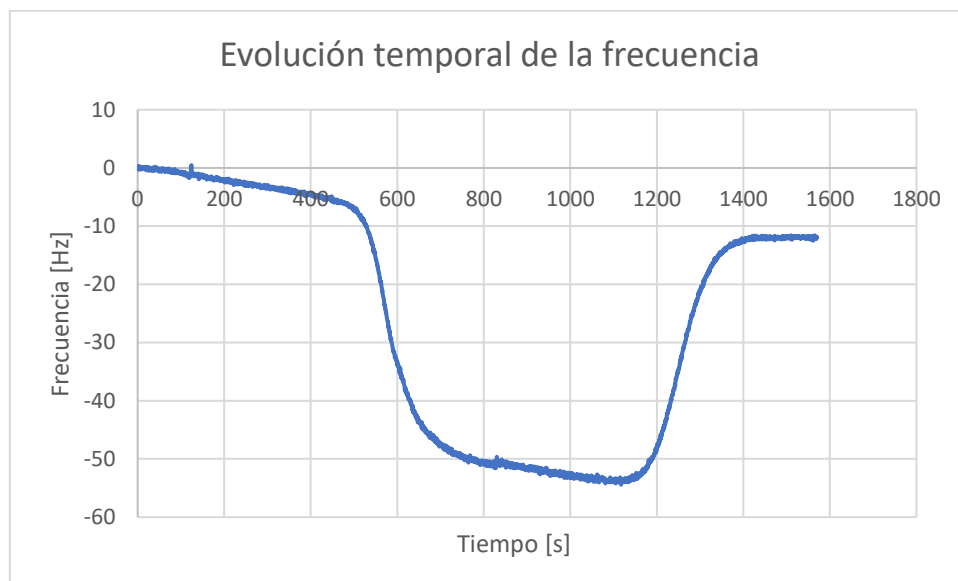


Figura 22. Evolución temporal de la frecuencia durante el proceso de silanización

En la figura 23 se muestra la evolución temporal de la disipación. En dicha imagen se puede observar la variación de este parámetro en las tres fases. Durante el periodo de deposición se observa un aumento de la disipación, lo que se asocia con un ablandamiento de la película formada. Mientras que, durante la fase de lavado, la disipación disminuye. A medida que se va eliminando el exceso depositado durante la fase anterior, el cual no se ha adherido correctamente, la rigidez de la capa formada aumenta, observándose como una disminución de la disipación.



Figura 23. Evolución temporal de la disipación durante el proceso de silanización

En la tabla 4 se muestran los valores del espesor y masa correspondientes a las fases de deposición y lavado durante el proceso de silanización. Tanto en los valores de espesor como de masa se puede observar una disminución en el proceso de lavado, debido a la eliminación de los restos no adheridos correctamente a la superficie durante la deposición.

Espesor (nm)		Masa (ng/cm²)	
Deposición	Lavado	Deposición	Lavado
72,98 ± 7,14	31,73 ± 6,54	6133,00 ± 598,27	2703,14 ± 661,23

Tabla 4. Medidas de espesor y masa obtenidas con la QCM-D ajustadas con el modelo Smartfit durante la deposición y lavado en el proceso de silanización

5.2.1.1 Análisis de los resultados

Los resultados se obtuvieron como la media y la desviación estándar de siete medidas. Los análisis estadísticos se realizaron con SigmaPlot15 usando análisis de varianza

significativa de un factor ANOVA. Un p valor menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

En los informes obtenidos del análisis de la variación tanto del espesor como de la masa entre la etapa de deposición del silano y la correspondiente al lavado, se ve reflejada la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos periodos. Debido a la pérdida de materia durante el lavado.

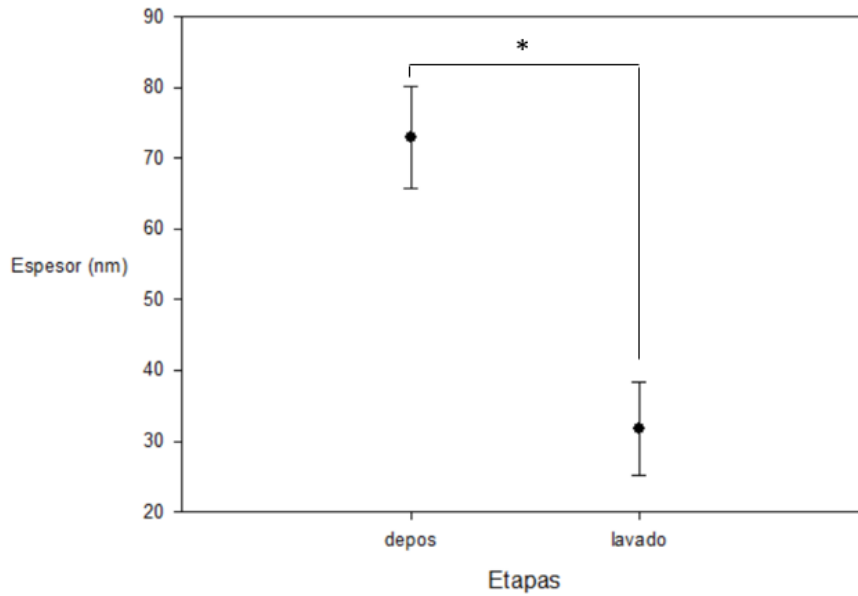


Figura 23. Espesor de las superficies silanizadas en la etapa de deposición y lavado

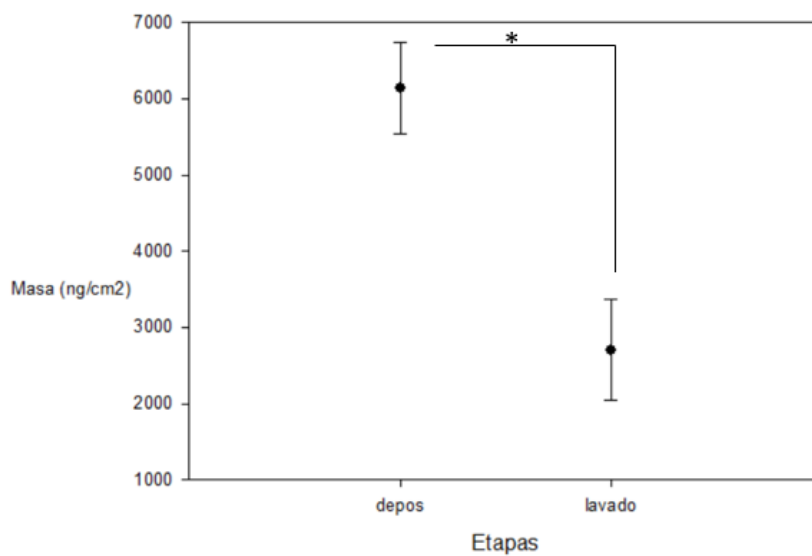


Figura 24. Masa de las superficies silanizadas en la etapa de deposición y lavado

5.2.2 Biofuncionalización de las superficies con los ELRs

En la figura 25 se muestra la curva obtenida con la microbalanza correspondiente al proceso de biofuncionalización de las superficies silanizadas utilizando los ELRs VKV-ciclooctino y HRGD-N₃. Se han representado las frecuencias y disipaciones correspondientes a los armónicos 3,5,7,9 y 11.

Se pueden distinguir varios eventos. El primero corresponde a un flujo de agua sobre el sensor silanizado, el cual define la línea base. Los periodos restantes hacen referencia a ciclos sucesivos de deposición de los ELRs – lavado, con el fin de conformar dos capas de polímeros. Cada capa está constituida para dos monocapas, la primera de VKV-ciclooctino y la segunda de HRGD-N₃.

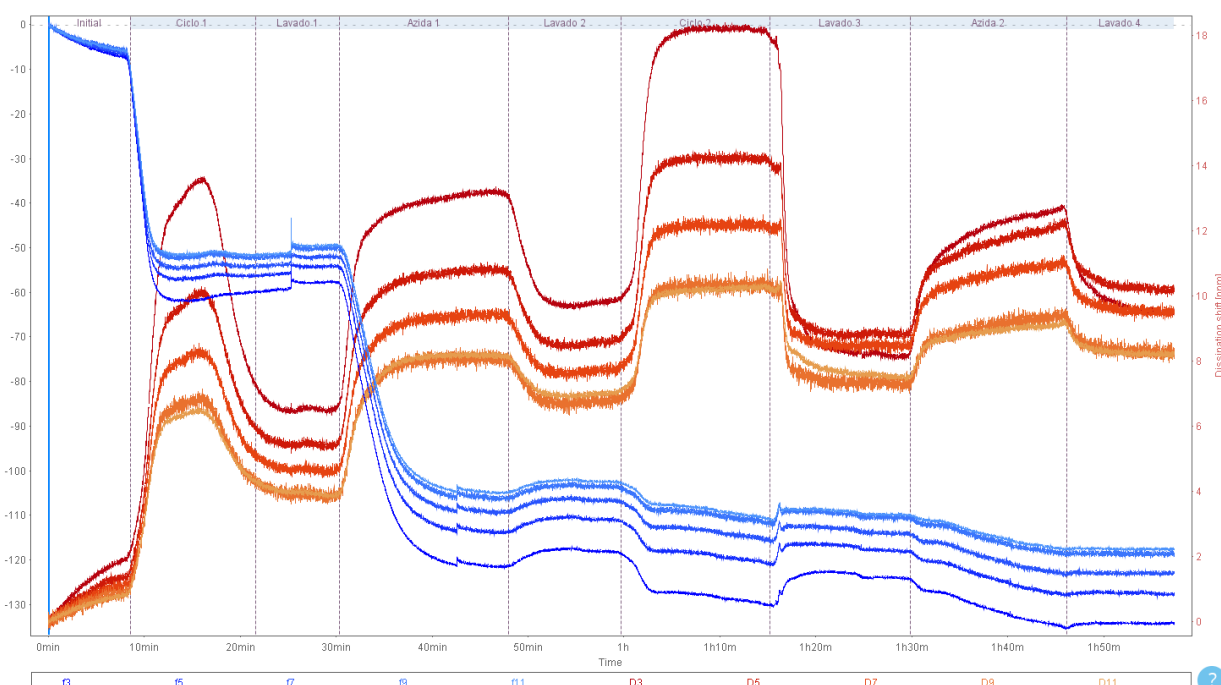


Figura 25. Curva representativa de los armónicos 3,5,7 y 9 obtenida con la Microbalanza de Cuarzo con Disipación en el proceso de biofuncionalización

En la figura 26 se ha representado la evolución temporal de la frecuencia. Al igual que en el proceso de silanización, se observa una caída de la frecuencia en las etapas correspondientes a la deposición de los polímeros, haciendo referencia a un aumento de la masa depositada en el sensor. Por otro lado, en este caso, el aumento de la frecuencia en los lavados llevados a cabo después de cada ciclo de deposición es muy pequeño, lo que indica una muy buena adhesión entre los polímeros depositados debido a la reacción click producida entre ellos, ya que la masa eliminada durante el lavado es mínima.

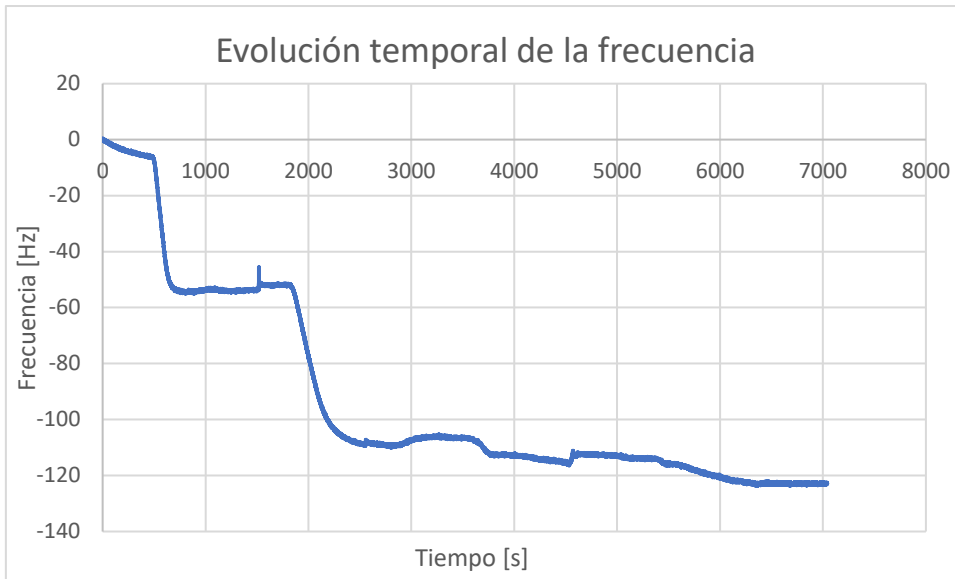


Figura 26. Evolución temporal de la frecuencia durante el proceso de biofuncionalización

En la figura 27 se muestra la evolución temporal de la disipación. En dicha imagen se puede observar la variación de este parámetro en las distintas fases. Al igual que en el proceso de silanización descrito en el apartado 5.2.1, durante los periodos de deposición se observa un aumento de la disipación, mientras que en los lavados la disipación disminuye. Las variaciones de este parámetro hacen referencia a los cambios en la rigidez de la capa formada.



Figura 27. Evolución temporal de la disipación durante el proceso de biofuncionalización

En la tabla 5 se muestran los valores del espesor y masa correspondientes a las fases de deposición y lavado durante el proceso de biofuncionalización. Tanto en el caso del espesor como en la masa se puede observar un cambio importante al depositar el HRGD-N₃ en la primera capa. Las variaciones posteriores en ambos parámetros son mínimas.

	Espesor (nm)	Masa (ng/cm²)
Ciclo 1	2,87 ± 0,22	310, 69 ± 28,87
Lavado 1	3,00 ± 0,13	327,76 ± 13,75
Azida 1	9,31 ± 2,24	1023, 87 ± 246, 90
Lavado 2	9,09 ± 2,11	999, 76 ± 232, 76
Ciclo 2	10,05 ± 2,31	1104, 86 ± 256, 42
Lavado 3	10,31 ± 2,04	1131, 45 ± 226, 76
Azida 2	11,36 ± 2,26	1249, 56± 243, 90
Lavado 4	11,41 ± 2,32	1258, 03± 252, 15

Tabla 5. Medidas de espesor y masa obtenidas con la QCM-D ajustadas con el modelo Smartfit durante la deposición y lavado en el proceso de biofuncionalización

5.2.2.1 Análisis de los resultados

Los resultados se obtuvieron como la media y la desviación estándar de tres medidas. Los análisis estadísticos se realizaron con SigmaPlot15 usando análisis de varianza significativa de un factor ANOVA. Un p valor menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

En los informes obtenidos del análisis de la variación tanto del espesor como de la masa entre las diferentes etapas de modificación de la superficie, se observa la existencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto al espesor y la masa conseguida después de la silanización y las dos últimas monocapas de ELRs.

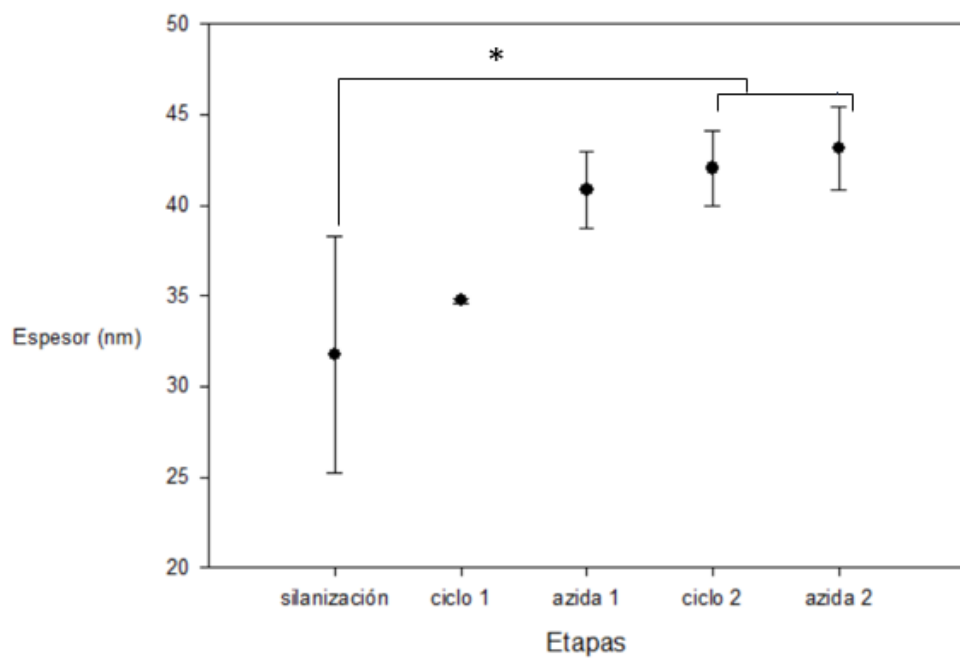


Figura 28. Espesor de cada monocapa

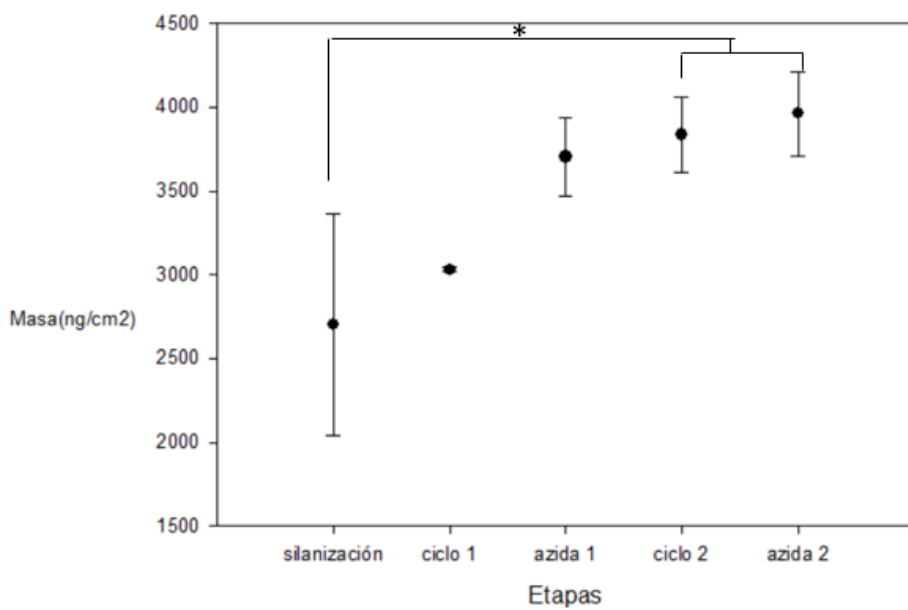


Figura 29. Masa de cada monocapa

5.3 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se utilizó como método para controlar la evolución de las superficies de titanio después de cada proceso de tratamiento de las superficies utilizado. En la figura 30 se puede observar la variación en los valores del ángulo de contacto después de los diferentes procesos.

Se estudió el ángulo de contacto en varias ocasiones, en primer lugar, sobre la superficie de titanio antes de la limpieza con plasma, en segundo lugar, sobre las superficies activadas con el Plasma Cleaner, a continuación, sobre las superficies después del proceso de silanización y por último sobre las superficies modificadas con los polímeros VKV-ciclooctino y HRGD-N₃.

Las superficies antes de la limpieza con plasma presentaban un ángulo de contacto de $74,1^\circ \pm 2,64^\circ$. Una vez activadas con plasma, las superficies de titanio se volvieron mucho más hidrofílicas, con valores de ángulo de contacto de $8,24^\circ \pm 1,38^\circ$. Después de la silanización de las superficies, el ángulo de contacto aumentó obteniendo valores de $77,05^\circ \pm 5,35^\circ$. Después de la modificación con los polímeros VKV-ciclooctino y HRGD-N₃, las superficies se volvieron extremadamente hidrofóbicas, con un ángulo de contacto de $98,43^\circ \pm 2,66^\circ$.

Se realizó un análisis estadístico utilizando SigmaPlot15 usando análisis de varianza significativa de un factor ANOVA. Un p valor menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

En el informe obtenido del análisis de la variación del ángulo después de los diferentes tratamientos, se observa la existencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto al valor obtenido entre la superficie de titanio original y la modificada con ELRs, la superficie original y la activada con plasma, entre la superficie activada y las superficies tras la silanización y la biofuncionalización y por último, entre las superficies silanizadas y las biofuncionalizadas.

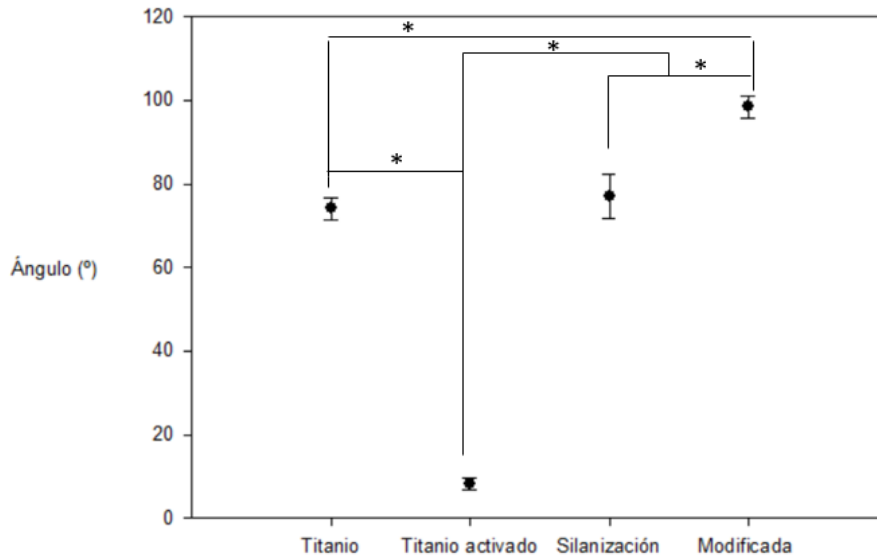


Figura 30. Ángulo de contacto para la superficie de titanio inicial, la superficie de titanio limpia con plasma, la superficie después de la silanización y la modificación con los ELRs

Superficie	Ángulo de contacto (°)
Titanio	74,1 ± 2,64
Titanio activado	8,24 ± 1,38
Silanización	77,05 ± 5,35
Modificada	98,43 ± 2,66

Tabla 6. Ángulo de contacto para la superficie de titanio inicial, la superficie de titanio limpia con plasma, la superficie después de la silanización y la modificación con los ELRs

5.4 Viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular se ha utilizado como método para determinar la compatibilidad de las células con las diferentes superficies. Se cuenta con superficies de titanio sin modificar utilizadas como control, superficies de titanio silanizadas con 11-azidoundecyltriethoxysilane y superficies modificadas con VKV-ciclooctino y HRGD-N₃. Los resultados obtenidos in vitro muestran claras diferencias entre las muestras control, muestras silanizadas y muestras modificadas con los ELRs en los dos estudios realizados, tanto a las 24 como a las 96 horas. Se puede decir que existen diferencias en la biocompatibilidad dependiendo del tratamiento de cada superficie.

Al analizar las imágenes obtenidas, se puede observar crecimiento celular sobre las superficies de titanio sin tratar. Esto se debe a la gran biocompatibilidad y resistencia a la corrosión que presenta dicho material, gracias a la formación espontánea de una capa de óxido de titanio sobre su superficie, encargada de proteger las capas profundas del metal. Como consecuencia, se forman unas uniones inespecíficas entre el titanio y las células lo que permite su proliferación.

En el caso de las superficies de titanio recubiertas con 11-azidoundecyltriethoxysilane, la proliferación celular es muy escasa. En este caso el tratamiento de la superficie no permite la formación de uniones inespecíficas con los fibroblastos.

Las superficies biofuncionalizadas con ELRs han demostrado una mejora en la biocompatibilidad respecto a los dos casos anteriores, ya que se puede observar un aumento notable en la proliferación celular. Este fenómeno se debe a la capacidad de los recombinámeros tipo elastina de imitar a la matriz extracelular, debido a su secuencia de aminoácidos, la cual está formada por la repetición de secuencias encontradas en la elastina natural. De esta manera se vuelve invisible para el sistema inmunológico, evitando así los problemas de rechazo

A continuación, se muestran las fotografías tomadas durante el estudio, donde se pueden apreciar las diferencias en el crecimiento celular sobre las distintas superficies.

5.4.1 Viabilidad celular a las 24 horas

Superficie control



Figura 31. Fotografía de la superficie de titanio control tomada con el microscopio a las 24 horas

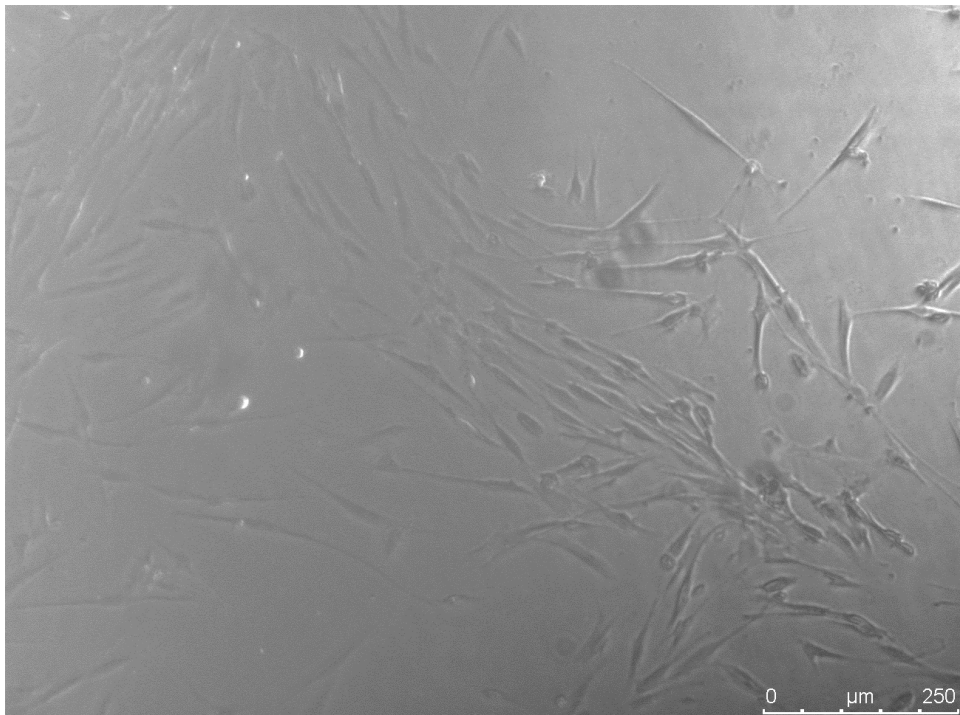


Figura 32. Fotografía de la superficie de titanio control tomada con el microscopio a las 24 horas

Superficie silanizada

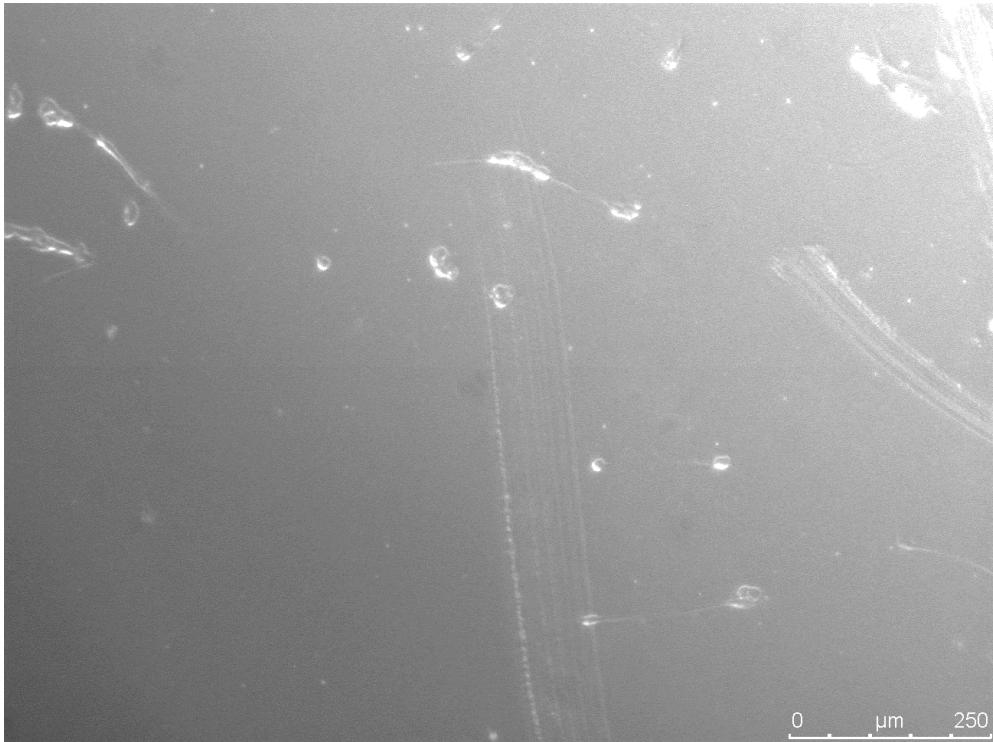


Figura 33. Fotografía de la superficie de titanio silanizada tomada con el microscopio a las 24 horas

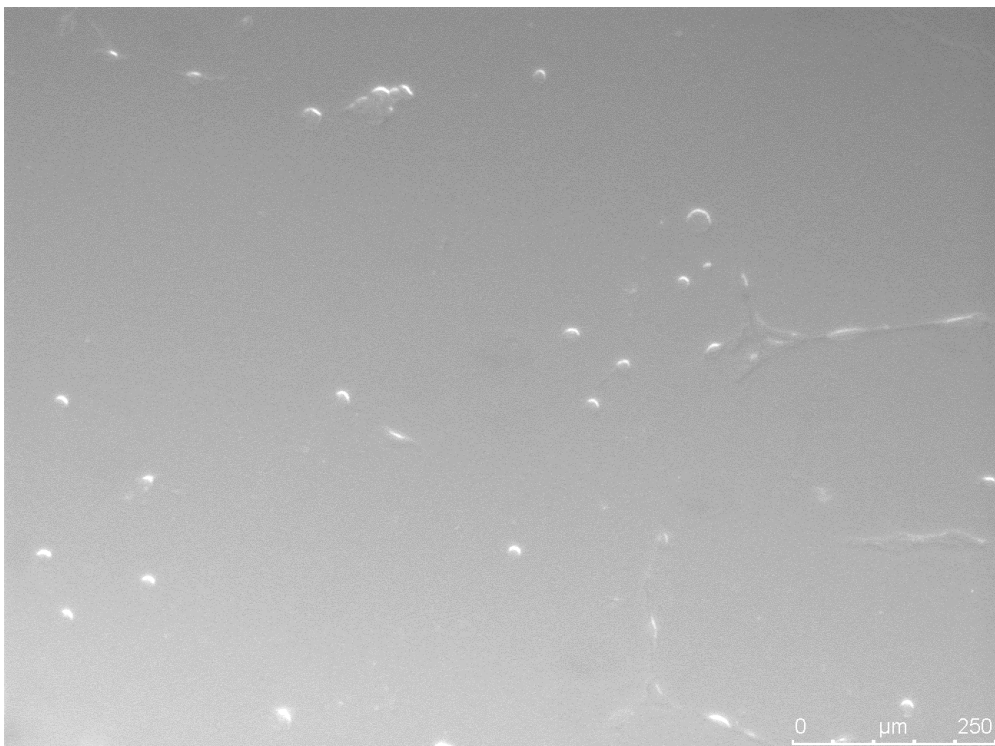


Figura 34. Fotografía de la superficie de titanio silanizada tomada con el microscopio a las 24 horas

Superficie modificada con ELRs

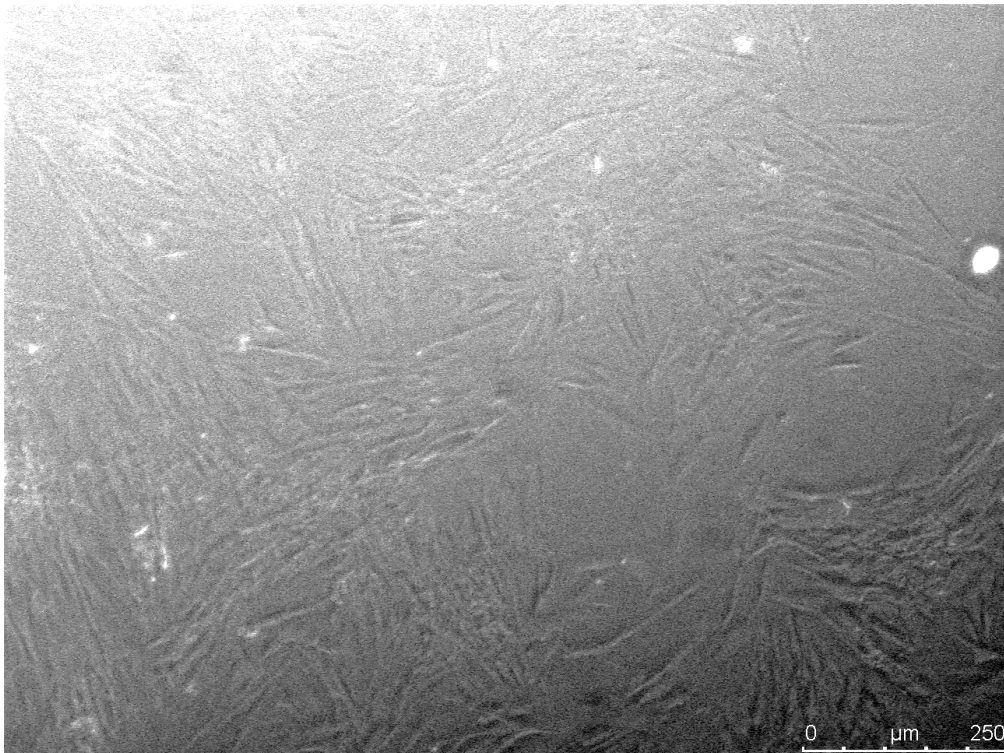


Figura 35. Fotografía de la superficie de titanio modificada con ELRs tomada con el microscopio a las 24 horas

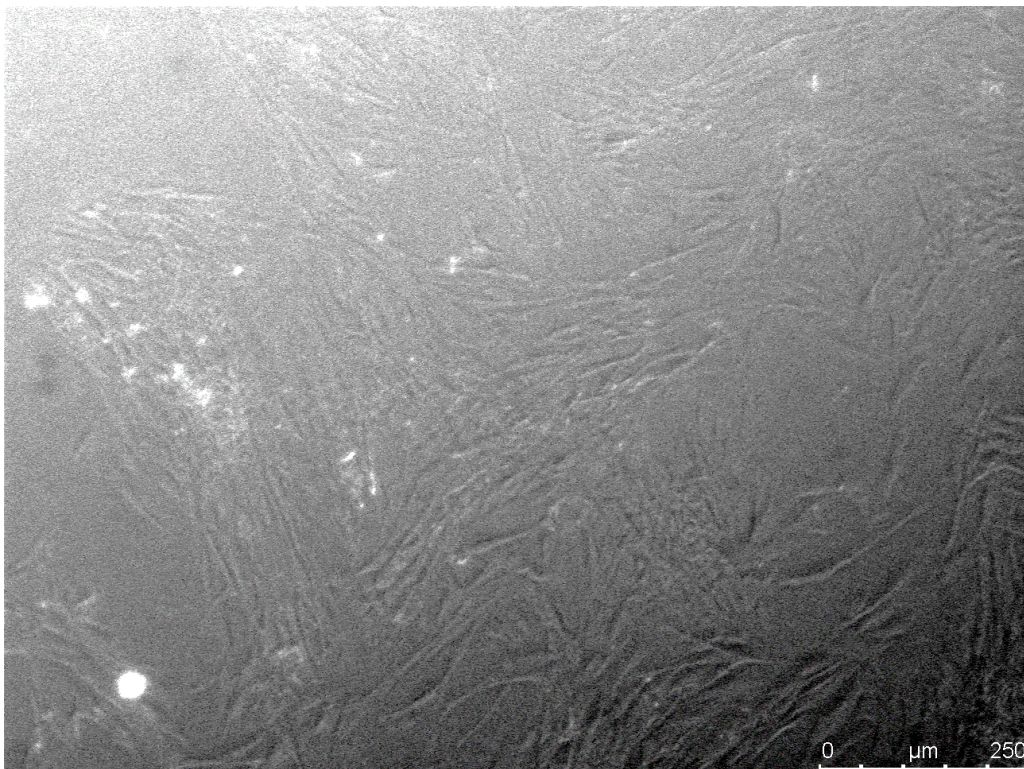


Figura 36. Fotografía de la superficie de titanio modificada con ELRs tomada con el microscopio a las 24 horas

5.4.2 Viabilidad celular a las 96 horas

Superficie control

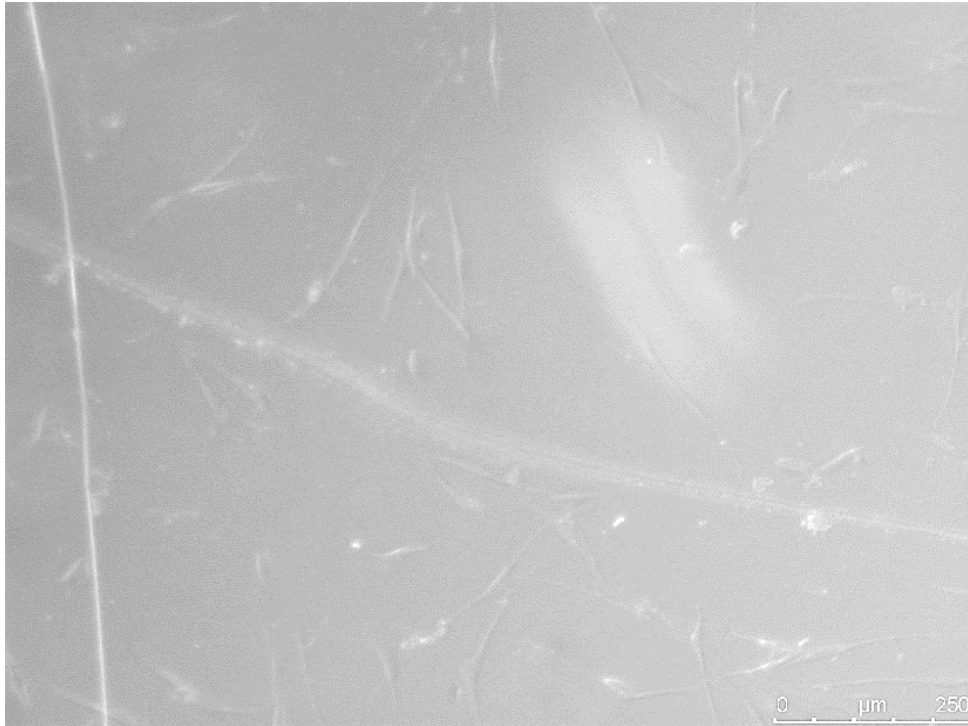


Figura 37. Fotografía de la superficie de titanio control tomada con el microscopio a las 96 horas

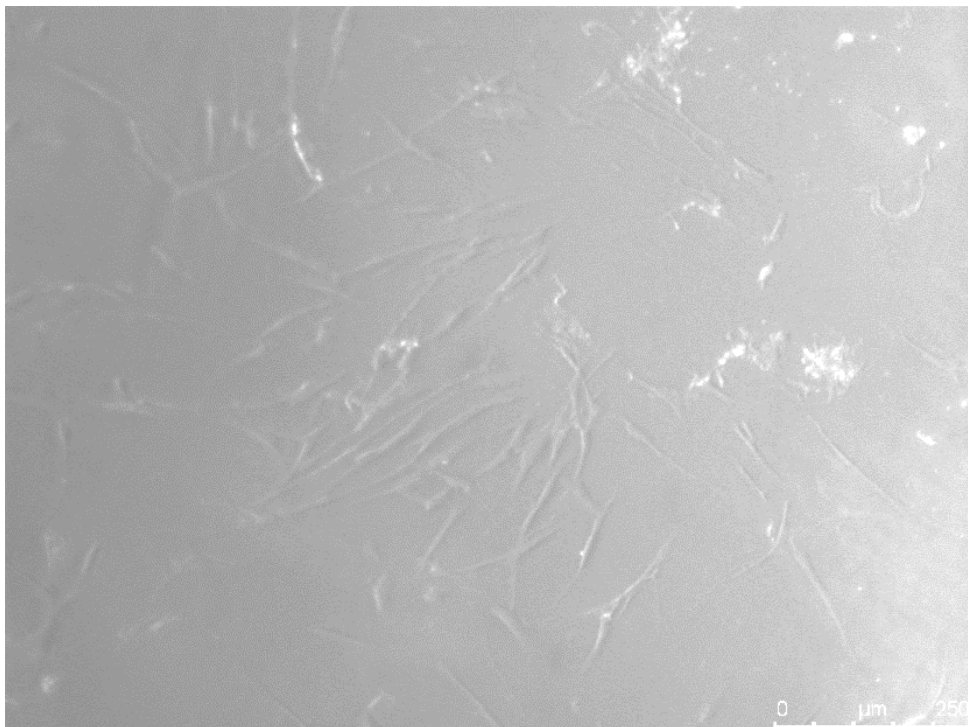


Figura 38. Fotografía de la superficie de titanio control tomada con el microscopio a las 96 horas

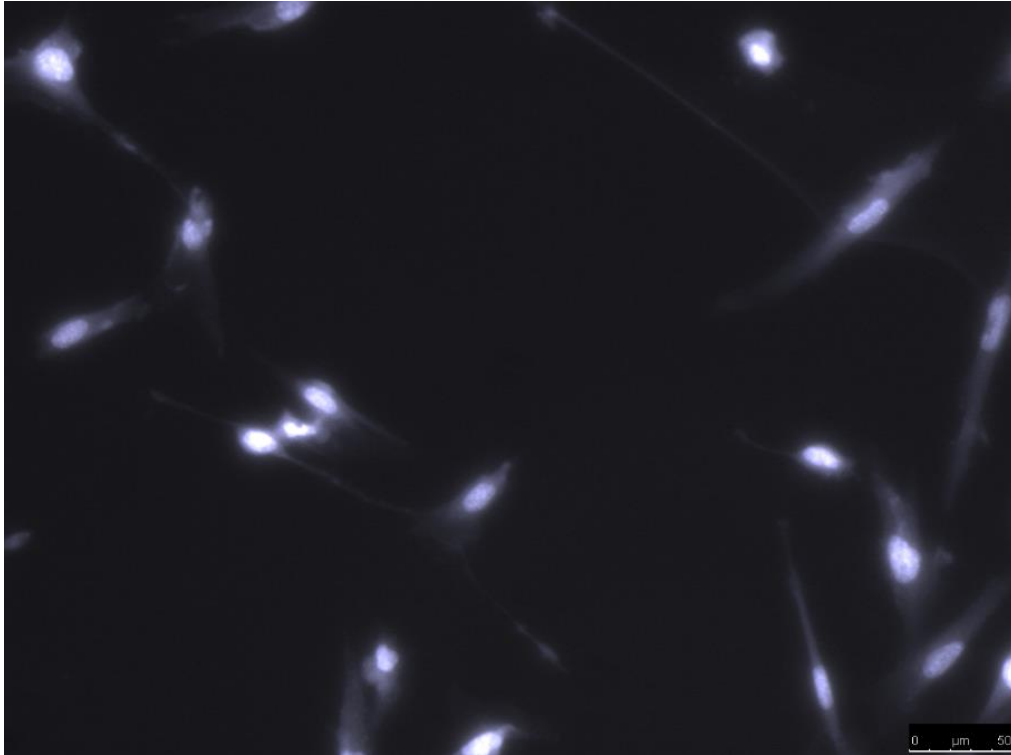


Figura 39. Fotografía de la superficie de titanio control teñida con DAPI tomada con el microscopio de fluorescencia a las 96 horas

Superficie silanizada

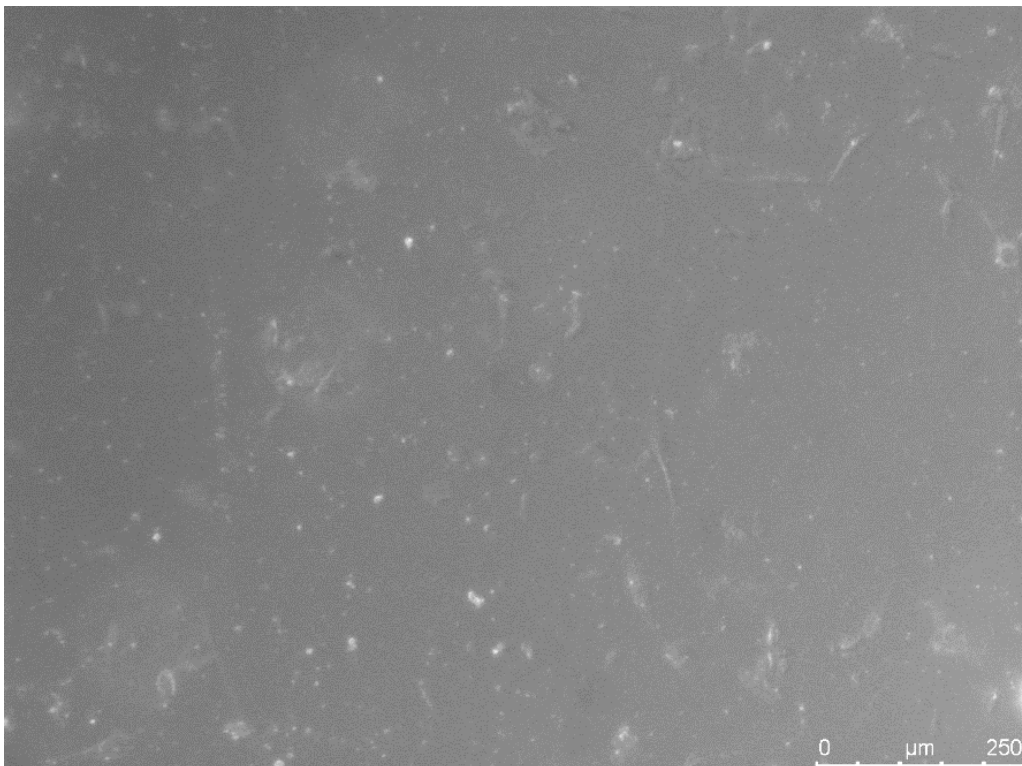


Figura 40. Fotografía de la superficie de titanio silanizada tomada con el microscopio a las 96 horas

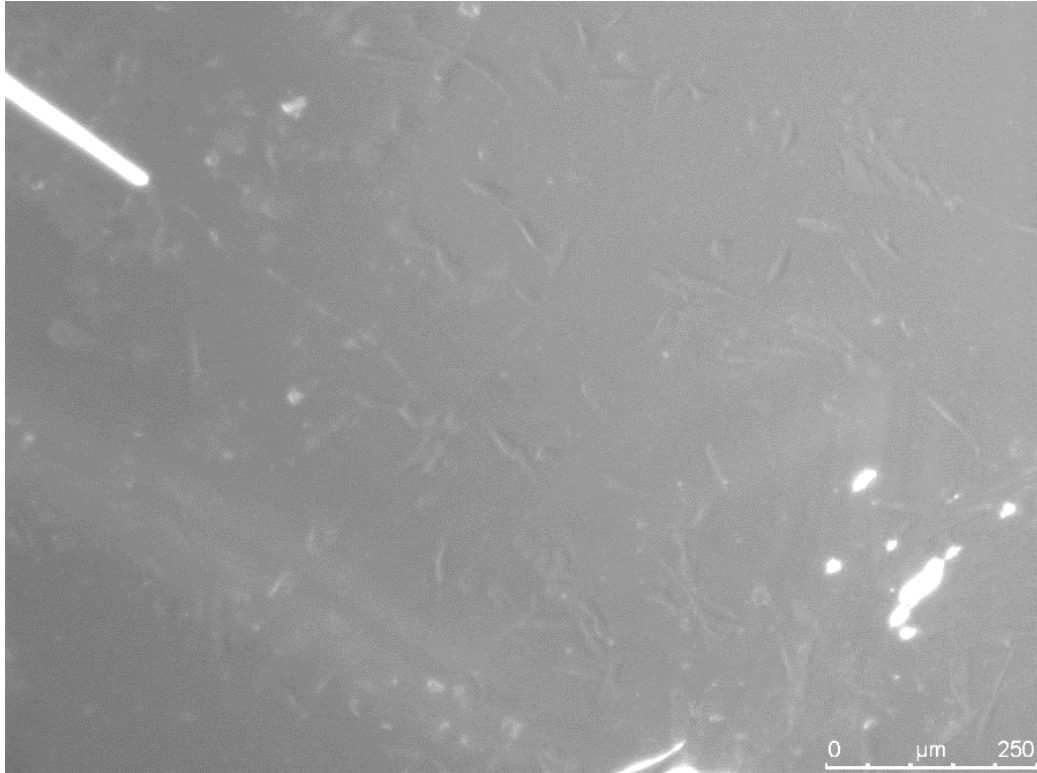


Figura 41. Fotografía de la superficie de titanio silanizada tomada con el microscopio a las 96 horas

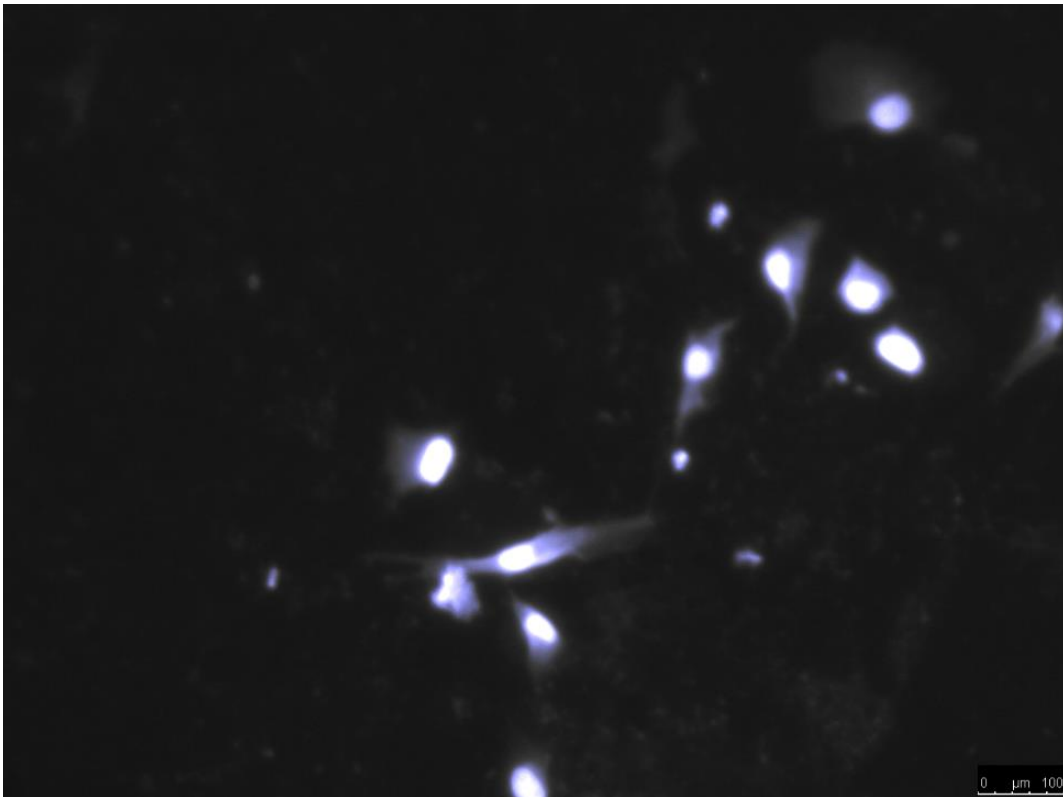


Figura 42. Fotografía de la superficie de titanio silanizada teñida con DAPI tomada con el microscopio de fluorescencia a las 96 horas

Superficies modificadas

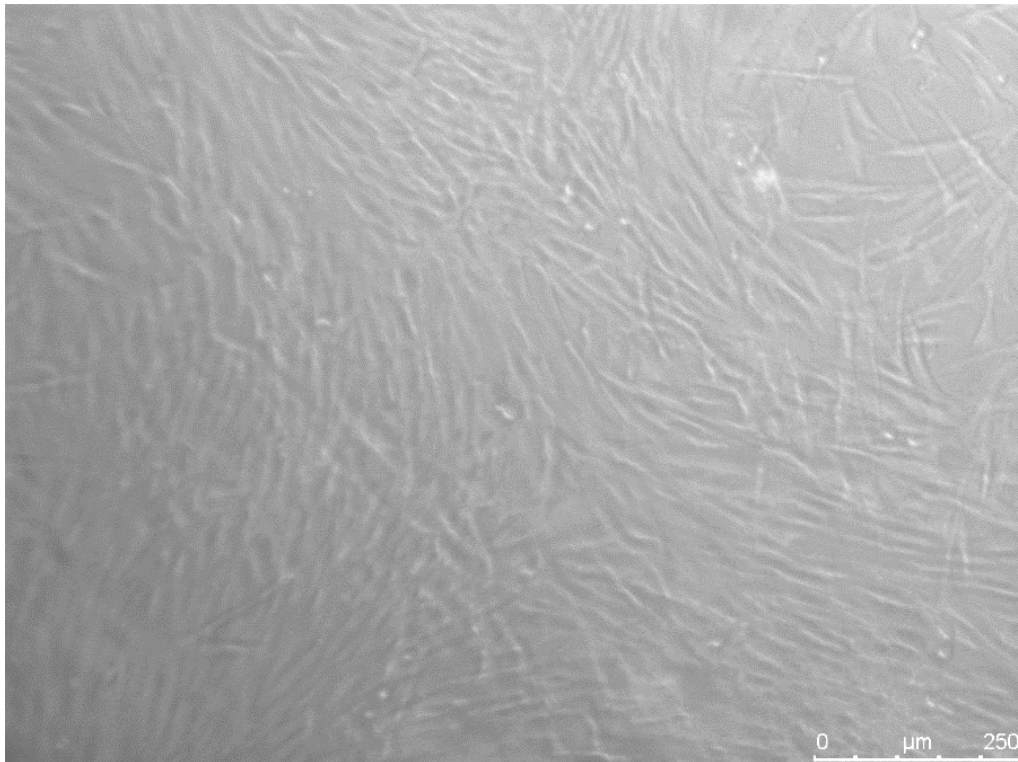


Figura 43. Fotografía de la superficie de titanio modificada con ELRs tomada con el microscopio a las 96 horas

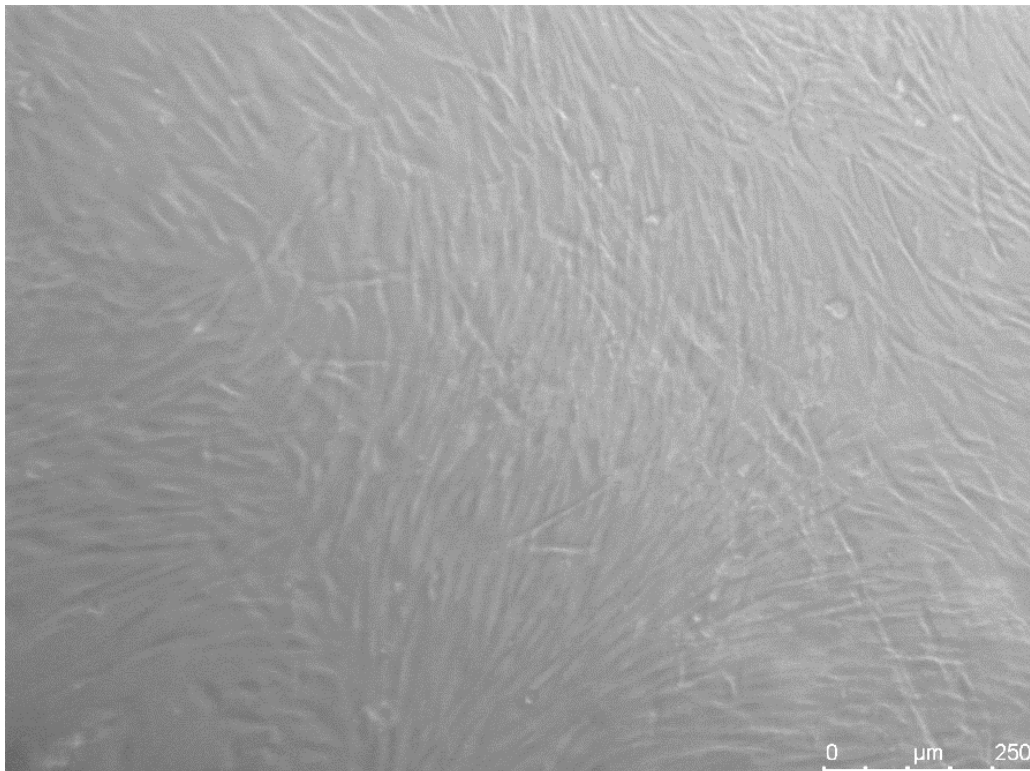


Figura 44. Fotografía de la superficie de titanio modificada con ELRs tomada con el microscopio a las 96 horas

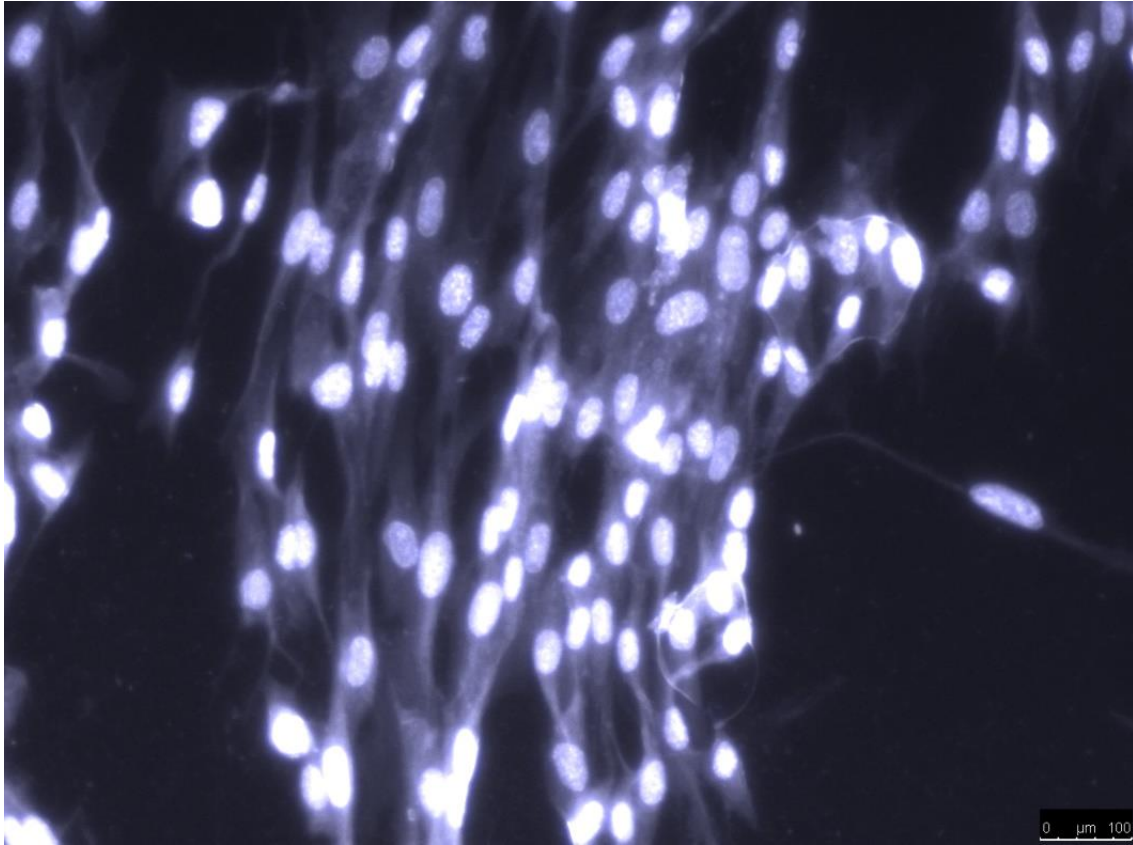


Figura 45. Fotografía de la superficie de titanio modificada con los ELRs teñida con DAPI tomada con el microscopio de fluorescencia a las 96 horas

Resultados de la viabilidad a las 24 horas:

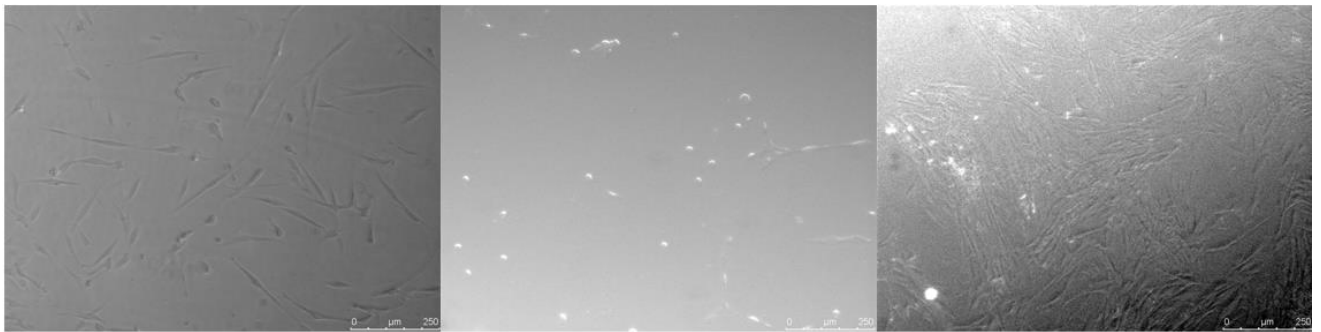


Figura 46. A: Superficie control, B: Superficie silanizada, C: Superficie biofuncionalizada

Resultados de la viabilidad a las 96 horas:



Figura 47. A: Superficie control, B: Superficie silanizada, C: Superficie biofuncionalizada

6. CONCLUSIONES Y LINEAS FUTURAS

En este Trabajo Fin de Grado se ha estudiado el posible uso de ELRs como material de recubrimiento de stents metálicos para mejorar su biocompatibilidad.

Para comenzar se realizó la caracterización de los polímeros VKV-ciclooctino y HRGD-N₃ a través de técnicas como el FTIR, electroforesis, DSC y RMN, con el fin de observar las modificaciones químicas realizadas en los polipéptidos originales y determinar sus características.

Se usó la microbalanza de cuarzo con disipación para biofuncionalizar las superficies de titanio y estudiar las propiedades mecánicas de las capas de ELRs formadas a través del análisis de la evolución de la frecuencia y disipación durante los periodos de deposición y lavado.

El ángulo de contacto fue útil para comprobar la correcta modificación de las superficies, evaluando los cambios en éste antes y después de la funcionalización.

Por último, se llevó a cabo un estudio de la viabilidad celular, en el que se comparó la proliferación celular en las superficies recubiertas con ELRs y en las superficies de titanio sin modificar.

En resumen, los resultados obtenidos en las diferentes pruebas llevadas a cabo fueron prometedores, consiguiendo una correcta modificación de las superficies de titanio mediante un proceso de señalización y una posterior biofuncionalización utilizando recombinámeros tipo elastina. Dicha funcionalización de las superficies mejoró significativamente su biocompatibilidad, observándose una mayor proliferación de células en comparación con las superficies no modificadas.

Los resultados positivos obtenidos en este estudio ofrecen diversas oportunidades para futuras investigaciones en esta área. Algunas líneas futuras sugeridas son las siguientes:

- Optimización de la modificación superficial, con el fin de investigar diferentes técnicas de modificación superficial para maximizar la adhesión y estabilidad de los recombinámeros tipo elastina.
- Análisis de la composición de la superficie una vez biofuncionalizada mediante la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).
- Contaje de células mediante programas como ImageJ.
- Análisis de las superficies por microscopio de fuerza atómica (AFM).

- Estudios a largo plazo para evaluar la estabilidad de los stents modificados en condiciones cercanas a las fisiológicas.
- Realizar estudios in vivo en animales.

Bibliografía

- [1] P. Libby and P. Theroux, “Pathophysiology of coronary artery disease,” *Circulation*, vol. 111, no. 25, pp. 3481–3488, Jun. 28, 2005. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878.
- [2] P. A. McCullough, “Coronary artery disease,” *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 2, no. 3, pp. 611–616, May 2007, doi: 10.2215/CJN.03871106.
- [3] J. Nicolas, C. A. Pivato, M. Chiarito, F. Beerkens, D. Cao, and R. Mehran, “Evolution of drug-eluting coronary stents: a back-and-forth journey from the bench to bedside,” *Cardiovasc Res*, May 2022, doi: 10.1093/cvr/cvac105.
- [4] G. W. Stone *et al.*, “A Polymer-Based, Paclitaxel-Eluting Stent in Patients with Coronary Artery Disease,” 2004. [Online]. Available: www.nejm.org
- [5] J. Zong, Q. He, Y. Liu, M. Qiu, J. Wu, and B. Hu, “Advances in the development of biodegradable coronary stents: A translational perspective,” *Materials Today Bio*, vol. 16. Elsevier B.V., Dec. 01, 2022. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100368.
- [6] B. Tomberli, A. Mattesini, G. I. Baldereschi, and C. Di Mario, “A Brief History of Coronary Artery Stents,” *Rev Esp Cardiol*, vol. 71, no. 5, pp. 312–319, May 2018, doi: 10.1016/j.recesp.2017.11.016.
- [7] M. Kaur and K. Singh, “Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 102. Elsevier Ltd, pp. 844–862, Sep. 01, 2019. doi: 10.1016/j.msec.2019.04.064.
- [8] C. Caorsi, V. Barra, R. Kauffmann, and F. Pineda, “INVESTIGACION CLINICA Nueva generación de Stents, con polímero bio-compatible: resultados y seguimiento clínico,” 2009.
- [9] F. López-Carrasquero, “FUNDAMENTOS DE POLÍMEROS,” 2014, doi: 10.13140/RG.2.1.2573.0000.
- [10] J. , M. Pérez Porto, “Polímeros - Qué es, definición, clasificación y origen.” <https://definicion.de/polimeros/> (accessed Jul. 12, 2023).
- [11] Dianelys OndarseÁlvarez, “Polímeros naturales y artificiales.” <https://www.ejemplos.co/polimeros-naturales-y-artificiales/> (accessed Jul. 12, 2023).
- [12] U. de Valladolid, “Eduardo Pérez del Río Síntesis y caracterización de nuevos polímeros recombinantes tipo elastina fusionados a eGFP para la formación de nanopartículas.”
- [13] A. J. Cocciolone, J. Z. Hawes, M. C. Staiculescu, E. O. Johnson, M. Murshed, and J. E. Wagenseil, “Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease,” *REVIEW Extracellular Matrix in Cardiovascular Pathophysiology Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 315, pp. 189–205, 2018, doi: 10.1152/ajpheart.00087.2018.-Large.
- [14] A. Girotti, D. Orbanic, A. Ibáñez-Fonseca, C. Gonzalez-Obeso, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Recombinant Technology in the Development of Materials and Systems for Soft-Tissue Repair,” *Adv Healthc Mater*, vol. 4, no. 16, pp. 2423–2455, Nov. 2015, doi: 10.1002/adhm.201500152.
- [15] V. Sarangthem, T. D. Singh, and A. K. Dinda, “Emerging Role of Elastin-Like Polypeptides in Regenerative Medicine,” *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 10, no. 5, pp. 257–269, May 2021, doi: 10.1089/wound.2019.1085.

- [16] A. G. M. I. L. F. J. A. J. C. R.-C. A. FERNÁNDEZ-COLINO, “1 Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas”.
- [17] J. Guillem-Martí *et al.*, “Functionalization of 3D-Printed Titanium Scaffolds with Elastin-like Recombinamers to Improve Cell Colonization and Osteoinduction,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 3, p. 872, Mar. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15030872.
- [18] D. Matilde, A. Rodrigo, J. Carlos, and R. Cabello, “TESIS DOCTORAL: BIOFUNCTIONAL HYDROGELS BASED ON ELASTIN-LIKE RECOMBINAMERS AS EXTRACELLULAR MATRIX ANALOGUES.”
- [19] A. I. Fonseca, J. Carlos, and R. Cabello, “SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A SILK-ELASTIN-LIKE RECOMBINAMER FUSED TO ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN (SELR-EGFP) FOR THE ACHIEVEMENT OF SELF-ASSEMBLED FLUORESCENT NANOPARTICLES AND PHYSICALLY CROSS-LINKED HYDROGELS.”
- [20] J. C. Rodríguez-Cabello, A. Girotti, A. Ribeiro, and F. J. Arias, “Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 811, pp. 17–38, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-388-2_2.
- [21] M. C. Urrejola *et al.*, “Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly) Polymeric Nanoparticle Systems: Structure, Elaboration Methods, Characteristics, Properties, Biofunctionalization and Self-assembly Layer by Layer Technologies,” 2018.
- [22] CAS Sciece Team, “Fundamentos de la química click y la química biortogonal.” <https://www.cas.org/es-es/resources/cas-insights/emerging-science/key-insights-click-chemistry-and-bioorthogonal-chemistry> (accessed Jun. 20, 2023).
- [23] Alejandro Savin, “Química organica - Química click.” <https://www.quimicaorganica.org/blog-usuarios-quimica-organica/918-qu%C3%ADmica-click-2.html> (accessed Jun. 20, 2023).
- [24] P. Guadarrama, L. J. López-Méndez, N. C. Cabrera-Quiñones, and C. A. Cruz-Hernández, “Versatile as no other, click chemistry and its relevance in multiple areas: From materials science to pharmaceutical research,” *Educacion Química*, vol. 34, no. 1, pp. 60–69, Jan. 2023, doi: 10.22201/fq.18708404e.2023.1.84649.
- [25] J. C. Jewett and C. R. Bertozzi, “Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology,” *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 4, pp. 1272–1279, Mar. 2010, doi: 10.1039/b901970g.
- [26] M25Academia, “La Química click.” <https://www.academiam25.com/actualidad/quimica-click/#:~:text=La%20qu%C3%ADmica%20click%20ha%20sido%20utilizada%20en%20la%20fabricaci%C3%B3n%20de,la%20medicina%20y%20la%20energ%C3%ADa> (accessed Jul. 06, 2023).
- [27] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy,” *Photosynthesis Research*, vol. 101, no. 2–3, pp. 157–170, Sep. 2009. doi: 10.1007/s11120-009-9439-x.
- [28] ThermoFisher scientific, “Espectroscopia FTIR.” <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/safety-security-threat->

- detection/technologies.html?gclid=Cj0KCQjw7uSkBhDGARIsAMCZNJu6WKXw_Nt3zCxzq-ZX73Of_jm02ImNCOaYQeWLBjtZbxYv5OG9ze0aAvo4EALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw7uSkBhDGARIsAMCZNJu6WKXw_Nt3zCxzq-ZX73Of_jm02ImNCOaYQeWLBjtZbxYv5OG9ze0aAvo4EALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL13652!3!645185338292!b!!g!!fourier%20transform%20infrared&gad=1#fitr-spectroscopy (accessed Jun. 21, 2023).
- [29] mks Newport, “Technical Note: Introduction to FTIR Spectroscopy.” <https://www.newport.com/n/introduction-to-ftir-spectroscopy> (accessed Jun. 21, 2023).
- [30] A. B. D. Nandiyanto, R. Oktiani, and R. Ragadhita, “How to read and interpret ftir spectroscope of organic material,” *Indonesian Journal of Science and Technology*, vol. 4, no. 1, pp. 97–118, 2019, doi: 10.17509/ijost.v4i1.15806.
- [31] S. Suriñach, M. D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera, and M. T. Clavaguera-mora, “La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales.”
- [32] L. C. Thomas, “An Introduction to the Techniques of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated DSC ®,” 2005.
- [33] B. J. Davis, “Part II. Clinical Applications DISC ELECTROPHORESIS-II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS*.”
- [34] inc John wiley & Sons, “ELECTROPHORETIC SEPARATION OF PROTEINS.”
- [35] Merck KGaA, “Introduction to SDS-PAGE- Separation of Proteins Based on Size.” <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page> (accessed Jun. 23, 2023).
- [36] Laboratorio de Técnicas instrumentales UVa, “Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.” <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopia-de-resonancia-magntica-nuclear> (accessed Jun. 25, 2023).
- [37] Guillermo Pérez, “Espectroscopia de Resonancia magnética nuclear.” https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nuclear (accessed Jun. 25, 2023).
- [38] “TEMA 10. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.” Accessed: Jun. 25, 2023. [Online]. Available: <https://www.uv.es/jcastell/Espectroscopia.pdf>
- [39] Paula Pastor Calvo, “recubrimiento de membranas de PVDF utilizando recombinámeros tipo elastina, ELRs, para diferenciación osteogénica.”
- [40] “Tecnología de Plasma .” <https://www.henniker-plasma.es/tecnologia-de-plasma#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20y%20qu%C3%A9%20puede,modo%20evitar%C3%ADa%20una%20buena%20adhesi%C3%B3n> (accessed Jun. 26, 2023).
- [41] “Plasma cleaning.” <https://www.plasmaetch.com/plasma-cleaning.php> (accessed Jun. 26, 2023).
- [42] “Harrik Plasma.” <https://harrickplasma.com/plasma-cleaners/expanded-plasma-cleaner/> (accessed Jun. 26, 2023).
- [43] M. A. Zalazar and F. A. Guarnieri, “MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO: DISEÑO Y SIMULACIÓN,” 2009. [Online]. Available: <http://www.amcaonline.org.ar>

- [44] G. Rudolph, A. Hermansson, A. S. Jönsson, and F. Lipnizki, “In situ real-time investigations on adsorptive membrane fouling by thermomechanical pulping process water with quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D),” *Sep Purif Technol*, vol. 254, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.seppur.2020.117578.
- [45] B. Santiago and G. Gonzalez, “estudio de las interacciones de las nanopartículas autoensambladas en un ELR anfílico negativo y neutro utilizando modelos de membranas biológicas.”
- [46] R. E. freng R. W. luis Abraham Ortiz, “El ángulo de contacto y su relación con las propiedades superficiales en un sistema orgánico-líquido-gas”.
- [47] J. T. Burgués, “Medida del ángulo de contacto en materiales ópticos.”
- [48] A. DE Revisión *et al.*, “Revisión de tema FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN Basic points in cryopreservation,” 2006.
- [49] D. Irene Boiso, “Principios básicos de Criobiología,” 2001.
- [50] Lestie B. Gordon, “Protocolo para subcultivar y congelar fibroblastos.” <https://www.progeriaresearch.org/es/fibroblast-cell-culture-protocols/> (accessed Jul. 05, 2023).
- [51] Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica Universidad de Sevilla, “protocolos-cultivos-celulares”.
- [52] “PROTOSCOLOS-PASE-DE-CÉLULAS-Y-CONTAJE”.
- [53] nombre Gallego Albiach, P. Igualada, and L. María, “Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento.”
- [54] ThermoFisher Scientist, “DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride).” <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/62247> (accessed Jul. 05, 2023).
- [55] Pablo Gila Herranz, “Estudio de transiciones líquido-líquido en disoluciones acuosas de polipéptidos sensibles a estímulos”.
- [56] A. Hidalgo Misas Tutor and F. Javier Arias Vallejo Raquel Muñoz Martínez, “Obtención de hidrogeles químicos, mediante metodología ‘click’, a partir de polímeros tipo elastina para liberación controlada de fármacos.”
- [57] A. Hidalgo Misas Tutor and F. Javier Arias Vallejo Raquel Muñoz Martínez, “Obtención de hidrogeles químicos, mediante metodología ‘click’, a partir de polímeros tipo elastina para liberación controlada de fármacos.”
- [58] Paula Pastor Calvo, “Recubrimiento de membranas de PVDF utilizando recombinaeros tipo elastina, ELRs, para diferenciación osteogénica.”
- [59] F. Javier, A. Vallejo, and R. Iglesias Álvarez, “DESARROLLO DE POLIMEROS TIPO ELASTINA CON PROPIEDADES MUCOADHESIVAS MEJORADAS.”

ANEXO

A1. Gráficas DSC

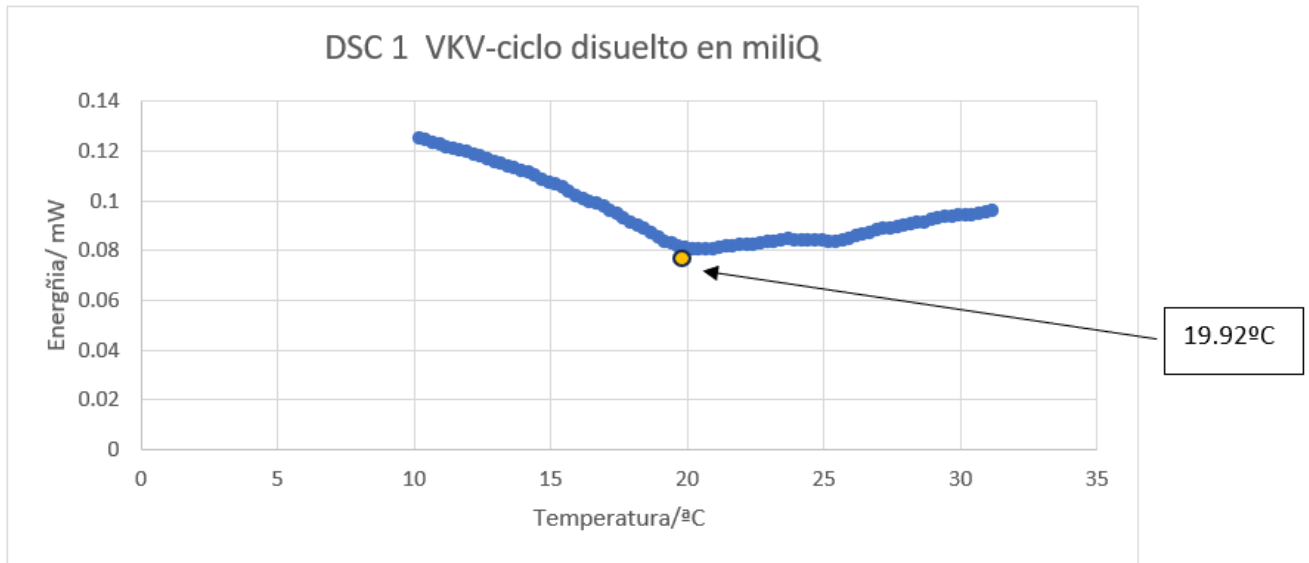


Figura 48. Medida 1 DSC de la disolución de VKV-ciclo en miliQ 50mg/ml

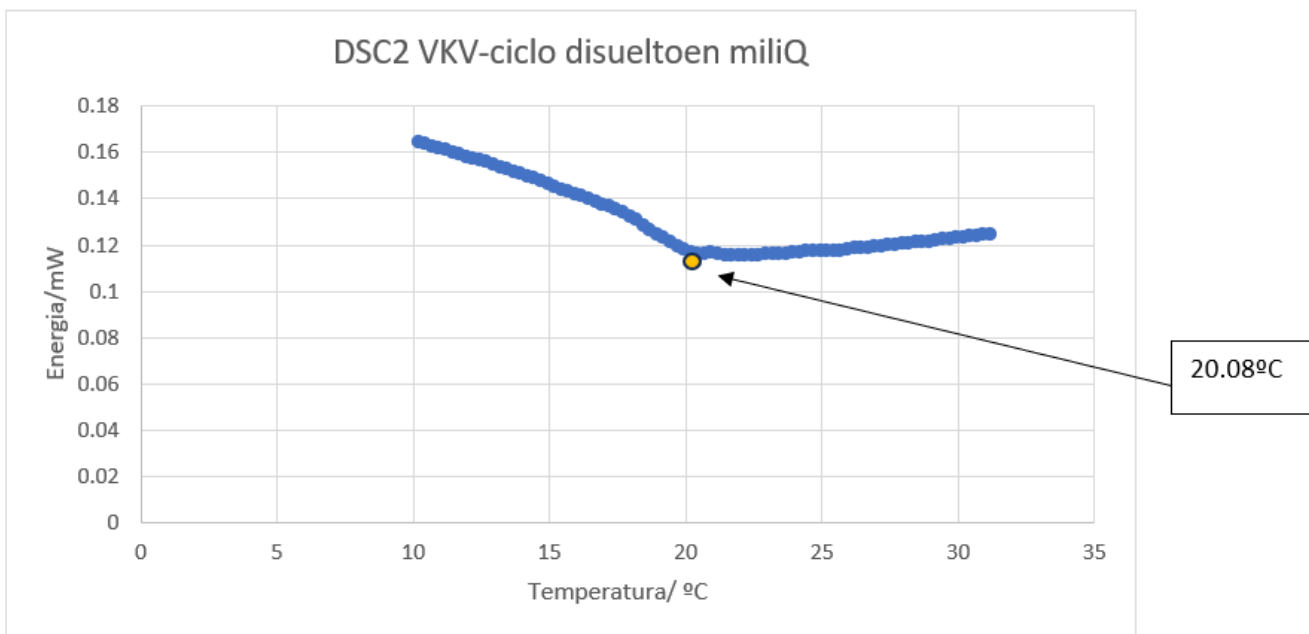


Figura 49. Medida 2 DSC de la disolución de VKV-ciclo en miliQ 50mg/ml

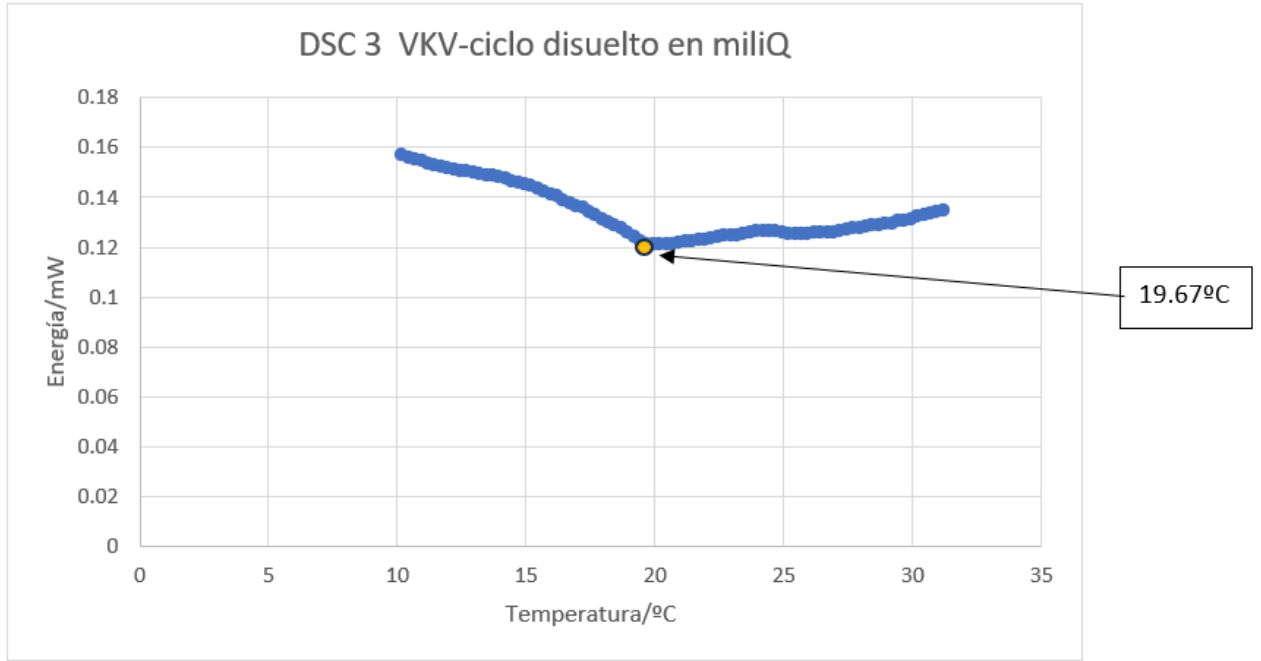


Figura 50. Medida 3 DSC de la disolución de VKV-ciclo en miliQ 50mg/ml

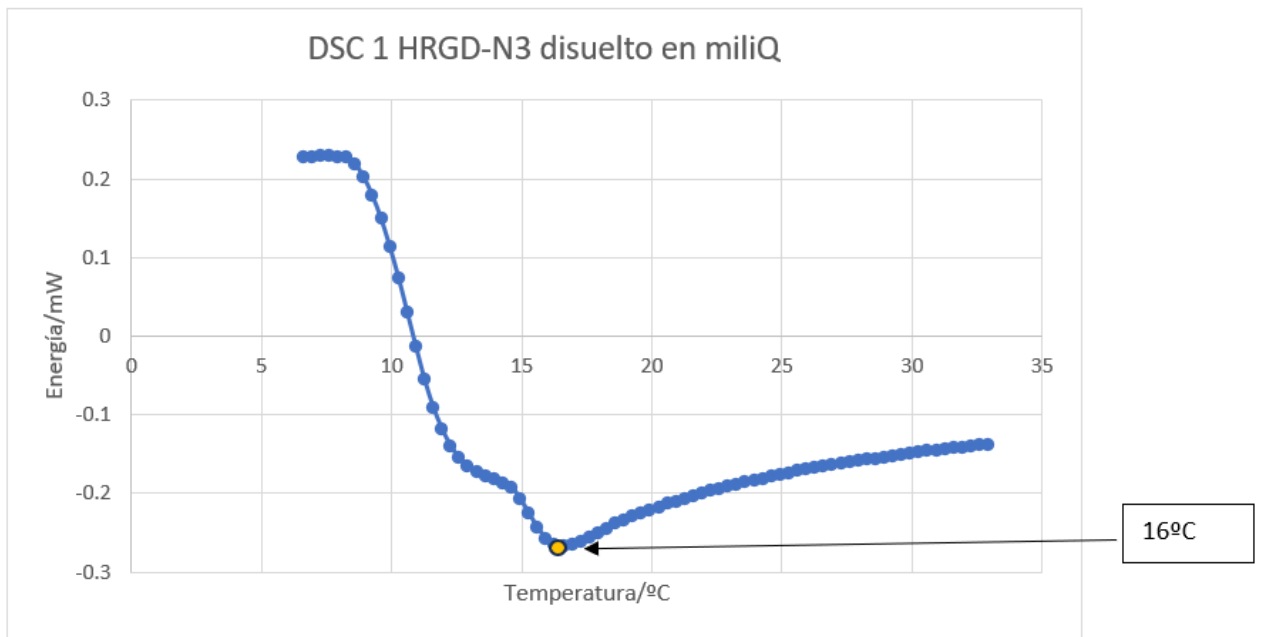


Figura 51. Medida 1 DSC de la disolución de HRGD-N₃ en miliQ 50mg/ml

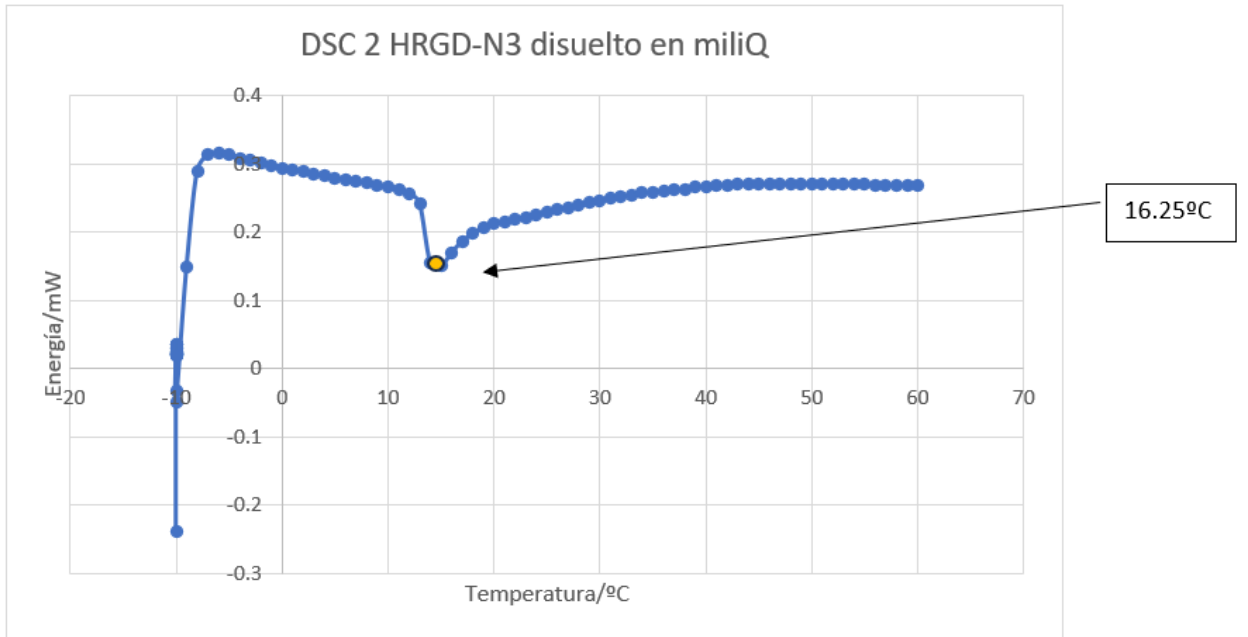


Figura 52. Medida 2 DSC de la disolución de HRGD-N₃ en miliQ 50mg/ml

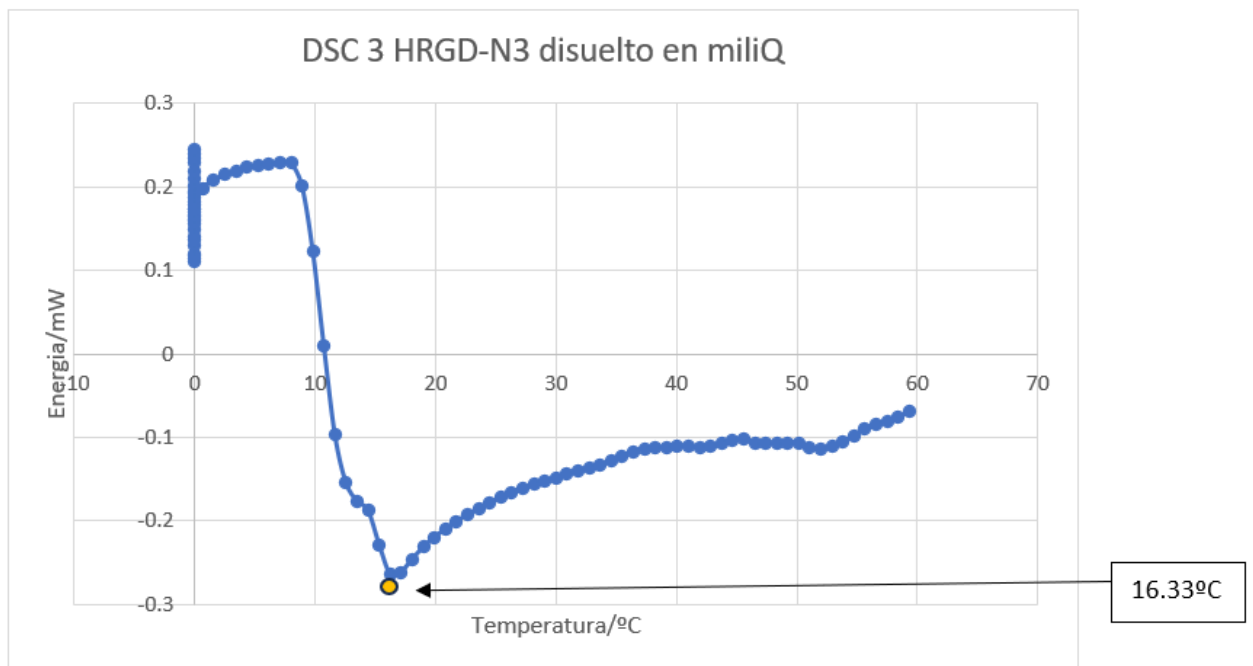


Figura 53. Medida 3 DSC de la disolución de HRGD-N₃ en miliQ 50mg/ml

A2. Resultados test ANOVA

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Depos silano	7	0	72,980	7,140	2,699
Lavado	7	0	31,730	6,540	2,472

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	5955,469	5955,469	127,048	<0,001
Residual	12	562,507	46,876		
Total	13	6517,976			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0,001$).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
Depos sil vs. Lavado	41,250	11,272	<0,001	Yes

Figura 54. Resultado test ANOVA del espesor en el proceso de silanización

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Depos silano	7	0	6133,000	598,270	226,125
Lavado	7	0	2703,140	661,230	249,921

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	41173788,669	41173788,669	103,562	<0,001
Residual	12	4770912,635	397576,053		
Total	13	45944701,303			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0,001$).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
Depos sil vs. Lavado	3429,860	10,177	<0,001	Yes

Figura 55. Resultado test ANOVA de la masa en el proceso de silanización

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1 (sil)	7	0	31,730	6,540	2,472
Row 2 (c1)	3	0	34,730	0,130	0,0751
Row 3 (a1)	3	0	40,820	2,110	1,218
Row 4 (c2)	3	0	42,040	2,040	1,178
Row 5 (a2)	3	0	43,140	2,320	1,339

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	442,861	110,715	5,445	0,007
Residual	14	284,656	20,333		
Total	18	727,516			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,007).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,828

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
Row 5 vs. Row 1	11,410	3,667	0,025	Yes
Row 4 vs. Row 1	10,310	3,313	0,045	Yes
Row 3 vs. Row 1	9,090	2,921	0,086	No
Row 5 vs. Row 2	8,410	2,284	0,240	No
Row 4 vs. Row 2	7,310	1,985	0,341	No
Row 3 vs. Row 2	6,090	1,654	0,473	No
Row 2 vs. Row 1	3,000	0,964	0,823	No
Row 5 vs. Row 3	2,320	0,630	0,902	No
Row 4 vs. Row 3	1,220	0,331	0,935	No
Row 5 vs. Row 4	1,100	0,299	0,935	No

Figura 56. Resultado test ANOVA del espesor en la funcionalización

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1 (sil)	7	0	2703,140	661,230	249,921
Row 2 (c1)	3	0	3030,900	13,750	7,939
Row 3 (a1)	3	0	3702,900	232,760	134,384
Row 4 (c2)	3	0	3834,590	226,760	130,920
Row 5 (a2)	3	0	3961,030	252,150	145,579

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	5364268,861	1341067,215	6,338	0,004
Residual	14	2962082,678	211577,334		
Total	18	8326351,539			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = 0,004$).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 0,896

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
Row 5 vs. Row 1	1257,890	3,963	0,014	Yes
Row 4 vs. Row 1	1131,450	3,565	0,028	Yes
Row 3 vs. Row 1	999,760	3,150	0,055	No
Row 5 vs. Row 2	930,130	2,477	0,172	No
Row 4 vs. Row 2	803,690	2,140	0,267	No
Row 3 vs. Row 2	672,000	1,789	0,394	No
Row 2 vs. Row 1	327,760	1,033	0,785	No
Row 5 vs. Row 3	258,130	0,687	0,877	No
Row 4 vs. Row 3	131,690	0,351	0,928	No
Row 5 vs. Row 4	126,440	0,337	0,928	No

Figura 57. Resultado test ANOVA de la masa en la funcionalización

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1 (titanio)	5	0	74,100	2,640	1,181
Row 2 (activado)	5	0	8,240	1,380	0,617
Row 3 (sil)	5	0	77,050	5,350	2,393
Row 4 (ELRs)	5	0	98,430	2,660	1,190

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	22830,434	7610,145	682,951	<0,001
Residual	16	178,288	11,143		
Total	19	23008,723			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0,001$).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
Row 4 vs. Row 2	90,190	42,720	<0,001	Yes
Row 3 vs. Row 2	68,810	32,593	<0,001	Yes
Row 1 vs. Row 2	65,860	31,195	<0,001	Yes
Row 4 vs. Row 1	24,330	11,524	<0,001	Yes
Row 4 vs. Row 3	21,380	10,127	<0,001	Yes
Row 3 vs. Row 1	2,950	1,397	0,181	No

Figura 58. Resultado test ANOVA del ángulo de contacto

A.3 Presupuesto

Material desechable	Coste por unidad (€)	Unidades	Coste total (€)
Caja guantes (100 und)	0,3445	100	34,45
Caja calzas (100 uds)	0,052	100	5,2
Rollo de papel	9,083	1	9,083
Celo	3,15	1	3,15
Ependorf 5ml (Thermo scientific)	0,3543	25	8,8575
Puntas de 2 µl a 200 µl (1000 unidades, Diamond Gilson)	0,029	15	0,435
Puntas de 100 a 1000 µl (1000 unidades, Diamond Gilson)	0,029	50	1,45
Puntas de 0,1 a 10 µl (1000 unidades, Diamond Gilson)	0,0339	25	0,8475
Pipeta de Pasteur graduada de polietileno (Astik's)	0,0565	5	0,2825
Placas múltiples pocillos (12 pocillos)	3,4158	2	6,8316

estériles, COSTAR			
Tubos de centrifuga de 50ml (Thermo Scientific)	0,602	10	6,02
Etanol (2,5l)	36,60	1	36,60
DAPI	206	1	206
DMEM 1x (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)	140,46	1	140,46
DMSO (Carlo Erba)	106	1	106
PBS, ph 7,4 (Gibco, 1000ml)	29,29	1	29,29
Tripsina-EDTA (GibcoTM)	19,47	1	19,47
FBS	408	1	408
11-azidoundecyltriethoxysilane	167	2	334
Caka Superficies titanio	505	3	1515
Total			2870,9115

Tabla 7. Coste material desechable

Material no desechable	Vida útil (años)	Coste por unidad (€)	Unidades	Coste total (€)
Pinzas	1	16,25	3	48,75
Micropipetas (1a 10 ml, 2 a 20µl, 10 a 100 µl, 0,1 a 10 µl)	3	200	4	266,67
Gradilla universal para tubos (astik's)	10	12,57	1	12,57
Total				327,99

Tabla 8. Coste material no desechable

Equipo	Vida útil (años)	Coste	Coste timestral
Campana de flujo laminar (Telstar Bio-II-A)	6719,85	10	168
Microscopio óptico (Leica DFC3000 G)	11900	10	297,50
Centrifuga (Eppendorf centrifuge 5810R)	5739	10	143,75
Incubadora de CO₂ (Thermo Forma Model 371 Steri-Cycle)	10910	10	272,75
Máquina de hielo	590	10	14,75

DSC (Mettler Toledo)	22000	10	550
FTIR	30500	10	762,5
Microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D)	110000	10	2750
Ángulo de contacto (Data Physics)	18000	10	450
Plasma Cleanner	10000	10	250
Tanques de nitrógeno líquido de almacenamiento de fibroblastos	1596	10	39,9
Total			5699,15

Tabla 9. Coste equipos

Otros	Coste (€)	Cantidad	Coste (€)
Fibroblastos	600	1 criovial	600
HRGD-N₃	1,1 (€/mg)	50 mg	55
VKV-ciclooctino	1,1(€/mg)	50 mg	55
Total			710

Tabla 10. Otrso costes

Coste total (€)	
Sueldo trimestral bruto	3500
Seguridad social (35%)	1225
Total	2275

Tabla 11. Coste humano

Tipo de coste	Coste (€)
Material desechable	2870,9115
Material no desechable	327,99
Equipos	5699,15
Otros	710
Humano	2275
Total	11883,0515

Tabla 12. Coste total