

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 495**

21 Número de solicitud: 201231969

51 Int. Cl.:

C08L 41/00	(2006.01)	A61K 38/18	(2006.01)
A61L 31/04	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
A61F 2/02	(2006.01)		
A61L 31/16	(2006.01)		
H01B 1/12	(2006.01)		
A61K 31/795	(2006.01)		
A61K 47/30	(2006.01)		
A61K 47/32	(2006.01)		

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.12.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.06.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA
(35.0%)**

**Edf. José Prat, Plaza de la Universidad nº 2
02071 Albacete ES y**

**FUNDACIÓN HOSPITAL NACIONAL DE
PARAPLÉJICOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA
INTEGRACIÓN (65.0%)**

72 Inventor/es:

**COLLAZOS CASTRO, Jorge Eduardo;
POLO SANZ, José Luis;
HERNÁNDEZ LABRADO, Gabriel Raúl y
GARCÍA RAMA PACHECO, Concepción**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Materiales, métodos y dispositivos para estimular y dirigir la proliferación y migración de progenitores neurales y el crecimiento axonal y dendrítico**

ES 2 470 495 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 495**

21 Número de solicitud: 201231969

57 Resumen:

Materiales, métodos y dispositivos para estimular y dirigir la proliferación y migración de progenitores neurales y el crecimiento axonal y dendrítico.

La presente invención consiste en composiciones, métodos y dispositivos para inducir, estimular y dirigir la adherencia, proliferación y migración de precursores neurales y el crecimiento axonal y dendrítico. Comprende sustratos electroconductores en forma de superficies o microfibras biofuncionalizadas para presentar una o varias biomoléculas de interés con el fin de controlar el comportamiento celular. Estos sustratos pueden utilizarse para estudios neurobiológicos, cultivos celulares y ensayos farmacológicos in vitro; así como para implantarse en el sistema nervioso en forma de andamios o dispositivos electrobiológicos, con el fin de promover la reparación del tejido neural o de mejorar la comunicación en la interfaz electrodo/célula neural en sistemas neuroprotésicos. Los efectos celulares se consiguen por el tipo, número y forma de unión de las moléculas a los sustratos, por las propiedades físicas de los mismos y la geometría de los andamios, por la estimulación eléctrica o por la acción combinada de estos factores.

DESCRIPCIÓN

Materiales, métodos y dispositivos para estimular y dirigir la proliferación y migración de progenitores neurales y el crecimiento axonal y dendrítico.

5 La presente invención se encuadra en el sector técnico del desarrollo y funcionalización de materiales y andamios electroconductores para aplicaciones en biomedicina, biotecnología, ingeniería eléctrica, bioingeniería, ingeniería tisular y bioquímica; y proporciona compuestos, métodos y dispositivos para inducir, estimular, controlar y dirigir la adherencia, proliferación, migración y diferenciación de
10 progenitores neurales y el crecimiento de axones y dendritas.

Más específicamente, esta invención se refiere a composiciones y métodos de preparación y biofuncionalización de polímeros electroconductores, a métodos para inducir la proliferación y migración de progenitores neurales y el crecimiento axonal y
15 dendrítico de forma dirigida, y a dispositivos y celdas para cultivo celular que incorporan estos métodos y composiciones para obtener los fenómenos neurobiológicos mencionados con fines de investigación biomédica, ensayos de fármacos, investigación de terapias celulares, y en general para el diseño de estrategias terapéuticas para las lesiones del sistema nervioso. Esta invención
20 también se refiere a dispositivos y andamios que incorporan los métodos y composiciones en implantes con el fin de promover la reparación del tejido neural *in vivo*, y a sistemas neuroprotésicos que incorporan los polímeros biofuncionalizados para inducir el crecimiento axonal o dendrítico sobre o alrededor de los electrodos.

25 Por tanto, esta invención encuentra aplicación industrial en las áreas de biotecnología, bioingeniería, bioquímica y biomedicina. Más específicamente, la invención tiene aplicación en la industria de neuroprótesis eléctricas para estimular o registrar la actividad eléctrica neural y sustituir las funciones perdidas; así como en el diseño de neuroprótesis avanzadas para promover la reparación del tejido neural y la restitución
30 de las funciones neurológicas tras lesiones del sistema nervioso. La presente invención también tiene aplicación en la industria biotecnológica, particularmente en el diseño de dispositivos y celdas de cultivo celular para inducir la proliferación, migración y selección de progenitores neurales y el crecimiento axonal. Finalmente, las aplicaciones pueden extenderse a la ingeniería de tejidos y órganos diferentes al

sistema nervioso, y al diseño de biosensores y otros dispositivos bioeléctricos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

5 El desarrollo del sistema nervioso comprende una serie de fenómenos organizados temporal y espacialmente que incluyen la inducción, polarización y regionalización del tejido neural, la proliferación y migración de progenitores neurales y su diferenciación a neuronas o células gliales, el crecimiento y guía de axones y dendritas, la formación y maduración de sinapsis, y la mielinización axonal. Estos fenómenos constituyen áreas
10 de investigación muy activas en la actualidad y existen descripciones pormenorizadas de sus mecanismos celulares y moleculares. Los procesos de proliferación y migración de progenitores neurales y el crecimiento axonal y dendrítico ocurren no solo durante el desarrollo sino también de forma fisiológica en los organismos adultos, o como respuesta a las afecciones del cerebro o la médula espinal, por lo cual son dianas de
15 numerosas estrategias terapéuticas que intentan restituir las funciones neurológicas perdidas.

Las lesiones del sistema nervioso central (SNC) humano se producen por patologías diversas que incluyen el trauma, la hemorragia, trastornos hipóxicos e isquémicos,
20 neoplasias, infecciones, y enfermedades genéticas, metabólicas, inflamatorias, tóxicas y neurodegenerativas. La lesión daña las neuronas, glía y vasos sanguíneos y cursa con una serie de respuestas complejas que terminan en la cicatrización del tejido neural sin que se restauren la anatomía y las funciones normales. La longitud de las lesiones del SNC asociadas con trauma o isquemia en humanos varía desde 1 a 10
25 cm o incluso más. En la zona lesionada se forman cavidades y/o cicatrices fibróticas como resultado de la fagocitosis del tejido necrótico. Común a todos los tipos de lesión es la interrupción (axotomía) de un número variable de axones de distintos tractos y la muerte de neuronas y células gliales en el sitio de la lesión. En general, en el SNC adulto las neuronas muertas no son remplazadas, ni se presenta regeneración
30 espontánea de sus axones debido a moléculas inhibitorias presentes en la zona de lesión y a limitaciones en la expresión de moléculas promotoras del crecimiento neural. Además de esos factores, las cicatrices fibróticas y las cavidades que se forman tras la lesión constituyen una barrera mecánica que impide el crecimiento regenerativo de los axones y la migración celular, y también interfieren la presentación de señales

topográficas y moleculares que de otra forma ayudarían a la reparación.

En estudios previos se han transplantado células gliales en ratas con contusión medular cervical C7, cuyas lesiones son muy semejantes a las humanas en lo que
5 respecta al daño neural y la formación de cavidades. A pesar del tamaño pequeño de las lesiones (3 mm), el trasplante por inyección de las células llevó a la aglomeración celular dentro del tejido, lo que impidió la regeneración de los axones lesionados y provocó la colateralización aberrante y sin dirección de tractos no lesionados. Por consiguiente, además de administrar células o moléculas promotoras del crecimiento
10 neural, para conseguir la reparación efectiva del tejido deben implantarse estructuras tridimensionales que den soporte, estimulen y guíen el crecimiento axonal y la migración celular a través de la zona de lesión. En este sentido, diversos autores han señalado la necesidad de implantar un “puente” o “andamio” fabricado con materiales artificiales en forma de tubos o fibras recubiertas de moléculas para estimular la
15 adhesión y el crecimiento axonal y guiarlo a través de la zona de lesión. Se han evaluado distintas estructuras para la reparación de la médula espinal, usualmente compuestas por materiales no electroconductores y sin funcionalización específica para inducir el crecimiento neural, por ejemplo agarosa, hidrogel alginato, polímeros y copolímeros del ácido poli(D,L-láctico) ó péptidos degradables. En general, estos
20 implantes mostraron buena biocompatibilidad pero efectos pequeños en cuanto a la reparación del tejido y la recuperación funcional. Algunas de las patentes y publicaciones existentes relacionadas con andamios para ingeniería tisular incluyen funcionalización de fibras con heparina / factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), explotando las múltiples dianas celulares que tiene este factor de crecimiento
25 y su participación en la reparación de diversos tejidos.

También se han desarrollado andamios tridimensionales que incorporan fibras para ingeniería tisular, con aplicaciones propuestas para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso. Las patentes WO 2007/146261 y WO 2007/090102 reivindican
30 andamios compuestos por nanofibras alineadas de polímeros biodegradables y funcionalizados con biomoléculas para la reparación de la piel, vasos sanguíneos, músculo y nervio periférico. La patente WO 2006/138718 describe andamios tridimensionales para aplicaciones en ingeniería tisular, compuestos por nanofibras fabricadas a partir de matriz extracelular. La patente WO 2011/123798

específicamente reivindica andamios para la reparación de nervios periféricos o de la médula espinal. En este caso, la estructura la componen fibras alineadas sobre un material de soporte que se curva de forma perpendicular a la dirección general de las fibras. Las fibras tienen un diámetro entre 1 y 1,2 micras y se fabrican a partir de ácido
5 poli-láctico o ácido poli-láctico-co-glicólico.

La utilidad de los andamios para la reparación neural será mayor si se utilizan materiales electroconductores para su fabricación. De esta forma, sería posible aplicar estímulos eléctricos a través del propio sustrato sobre el que crecen las células
10 neurales, haciendo posible el control dinámico de su comportamiento. La electroestimulación puede actuar directamente sobre las células mediante la generación de potenciales de acción en el axón o la modulación del potencial de membrana en los progenitores y células gliales, o influir indirectamente sobre ellas al modificar las moléculas presentes en la interfase electrodo/célula e incluso
15 electrosecretar factores tróficos u otras moléculas desde la superficie electroconductora. En la elección de los materiales electroconductores más apropiados para fabricar los andamios o dispositivos electrobiológicos para la reparación neural, resulta útil aplicar algunos de los conocimientos que se han obtenido en el campo de las neuroprótesis. Los electrodos de las neuroprótesis se
20 usan para registrar la actividad de las neuronas que se encuentran alrededor del implante o para estimularla con pulsos de corriente de corta duración (μsec). Estos dispositivos han resultado efectivos para el tratamiento de diversos trastornos neurológicos humanos, entre ellos la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, algunos pacientes desarrollan tolerancia a la estimulación porque la inflamación y la fibrosis
25 alrededor del electrodo incrementan la impedancia eléctrica y, en algunos casos, imponen la extracción del implante. La eficacia de las neuroprótesis se incrementará si se establece un contacto íntimo entre el electrodo y la célula neural, de tal forma que se obtenga una activación celular efectiva y duradera. Una estrategia razonable consiste en inducir el crecimiento neural sobre los electrodos con el fin de mejorar y
30 estabilizar la comunicación eléctrica en la interfaz, procedimiento que, como hemos mencionado, podría extenderse a la reparación neural utilizando los materiales electroconductores como andamio para que las células neurales crezcan a través de la zona de lesión. Para estas aplicaciones, los polímeros conductores (CPs) presentan ventajas respecto a los materiales metálicos y a los óxidos inorgánicos. Los CPs

disminuyen la impedancia de los electrodos metálicos 2-3 órdenes de magnitud debido a su nanoestructura y su conductividad mixta electrónica e iónica, tienen una densidad veinte veces menor que la de los metales y permiten la incorporación de moléculas de interés biológico. De ellos, los derivados del poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) y del polipirrol (PPy) son los más estudiados en aplicaciones biomédicas y como electrodos para neuroestimulación, siendo el PEDOT dopado con sulfonato de poliestireno (PSS) más estable y conductor que el PPy en electrolitos líquidos. Las interesantes propiedades de los CPs para la fabricación de neuroprótesis han suscitado interés comercial desde hace más de una década, aunque estos materiales aún no se incorporan en dispositivos aprobados para uso médico en humanos. Las patentes WO 97/16545 y WO 2006/127712 reivindican el uso de CPs para inducir el crecimiento neuronal y la reparación del sistema nervioso. Por otra parte, la empresa Biotectix posee patentes de electrodos recubiertos de PEDOT y dispositivos híbridos electrobiológicos (por ejemplo las patentes WO 2007/028003 y US 2009 0292325), fabricados para estimular o registrar la actividad eléctrica neural. Finalmente, han aparecido recientemente al menos dos solicitudes de patente (WO 2011/100059 y WO 2011/159923) de microfibras electroconductoras recubiertas de CPs destinadas a usarse como microelectrodos para registrar o estimular la actividad eléctrica neuronal, aunque no para estimular y dirigir el crecimiento, proliferación o migración de células neurales.

Por otra parte, la mayoría de estudios neurobiológicos *in vitro* emplean células disociadas o cultivos organotípicos sobre sustratos de vidrio o plástico, en los que se estudia el comportamiento celular en función de los factores adicionados al medio de cultivo o de las biomoléculas presentes en el sustrato. En sistemas más sofisticados, se incorporan biomoléculas al sustrato en forma de líneas y se evalúa su permisibilidad para el crecimiento neural. La introducción de técnicas de microfabricación para depositar las biomoléculas en geometrías específicas sobre sustratos de cultivo celular ha aumentado la precisión y generado la posibilidad de producir patrones complejos. Por ejemplo, los diseños fabricados por micro-impresión o fotolitografía han permitido evaluar ciertos aspectos del crecimiento axonal y dendrítico en respuesta a la L1 y la N-Cadherina que no son fáciles de discernir en sustratos convencionales, y también están ayudando a conocer la influencia de la combinación y segregación de biomoléculas sobre el crecimiento de las

prolongaciones neuronales. En la última década se ha desarrollado otro tipo de dispositivos que dirigen el crecimiento neurítico de forma restrictiva; es decir, la célula neural crece sobre un sustrato adherente que tiene canales o conductos por los que las prolongaciones tienen que pasar y cuyas dimensiones no le permiten desviarse de su destino (Merz y Fromherz, 2002 Adv Mater 14:141-144; Wieringa et al., 2010 J Neural Eng 7:16001). En cuanto a la investigación en migración celular, se ha extendido el uso de membranas porosas, por ejemplo de policarbonato (Behar, 2001 Assay for neuronal cell migration. In Fedoroff S and Richardson A (Eds): Protocols for Neural Cell Culture. Third Edition. Humana Press Inc.), que las células atraviesan en respuesta a factores quimiotácticos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un material biofuncionalizado que ejerce de puente o andamio para inducir el crecimiento neural y la reparación del sistema nervioso, en el cual, el elemento principal de soporte y guía neural consiste en un soporte preferiblemente en forma de microfibras recubierto con un polímero electroconductor dopado con poli[(ácido 4-estireno sulfónico)-co-(ácido maleico)] (PSS-co-MA), donde el polímero resultante se funcionaliza directamente con moléculas que inducen el crecimiento neural, o bien con multicapas de policationes, polianiones o anticuerpos, a los que se unen moléculas de adhesión celular (CAMs) como L1 o cadherinas, factores de crecimiento (por ejemplo bFGF) y proteínas de la matriz extracelular. Este tipo de andamio difiere de las invenciones previas en cuanto a su diseño, método de preparación, composición, propiedades y mecanismo de acción, y presenta una serie de ventajas que se resumen a continuación. Desde el punto de vista mecánico, geométrico y de diseño, el componente principal son fibras con diámetro preferente de 2 a 15 micras que ofrecen ventajas sobre los tubos o geles para fabricar implantes con el objetivo de reparar el SNC, tales como:

- 1) son más efectivas para promover el crecimiento axonal y la migración celular dirigida por distancias largas;
- 2) pueden presentar biomoléculas en patrones geométricos con la escala de tamaño celular;
- 3) ocupan un mínimo espacio y pueden insertarse en el tejido sin proporcionar bordes extensos que aumenten la fibrosis por desacople mecánico;

4) el crecimiento tisular sobre ellas es longitudinal y excéntrico, por lo que los axones y/o células neurales que migren pueden guiar a otros axones o células sin producir axonopatía constrictiva; y

5) no presentan espacios muertos, por lo cual se disminuye el riesgo de infección tras su implante.

Con respecto a las fibras de diámetro menor de 2 micras, la principal ventaja es que son fácilmente manipulables y pueden sostenerse por sí mismas e insertarse en el tejido, evitando el requerimiento de implantar un soporte adicional para las propias fibras como en otras invenciones (por ejemplo WO 2011/123798) y, lo más importante, generando la posibilidad de conectar punto a punto, con resolución de micras, regiones distantes del SNC.

En cuanto a la composición, propiedades y funcionalización del material biofuncionalizado de la invención, sus principales novedades y ventajas respecto a los precedentes son las siguientes:

1) El material de la presente invención puede sintetizarse sobre soportes electroconductores y utilizarse como electrodo, permitiendo aplicar estímulos eléctricos para modular el comportamiento de las células neurales.

2) Incluye polímeros electroconductores como el PEDOT dopado con polianiones estables que permiten la conjugación covalente de biomoléculas, de manera que combinan la buena estabilidad de este polímero con la posibilidad de electroestimular el tejido de forma prolongada sin desprender la capa molecular más cercana a la superficie. Además, el método de conjugación covalente permite unir múltiples moléculas simultáneamente al polímero sin alterar su actividad, proporcionando combinaciones moleculares que semejan el microentorno que encuentran las células dentro del tejido.

3) Puede incorporar diversos tipos de complejos biomoleculares con distinto mecanismo de acción. Un tipo de complejo empleado contiene moléculas de adhesión celular e induce el crecimiento directo y extenso de los axones o dendritas sobre la superficie del material; otro complejo comprende un polícatión como la polilisina (PLL) sobre el que se une heparina / bFGF y proteínas de la matriz extracelular. Este segundo complejo molecular promueve la proliferación y migración de progenitores gliales y precursores NG2⁺ sobre la superficie del material, y a su vez estas células

promueven y guían el crecimiento axonal. La promoción del crecimiento axonal sobre las microfibras a través de la inducción de la migración de progenitores gliales y precursores NG2⁺ es una característica única de la presente invención y abre nuevas oportunidades para el tratamiento de las patologías neurológicas.

- 5 4) Además de dar soporte, guía, presentar moléculas en la superficie para promover la adhesión y el crecimiento neural, y proporcionar estímulos eléctricos que modulan directamente el comportamiento celular, el material biofuncionalizado con PLL / Heparina / bFGF / proteínas de la matriz extracelular también permite el control dinámico de las respuestas celulares mediante la electrosecreción de la capa de
- 10 heparina y sus factores asociados. De esta forma, las células pueden internalizar los factores liberados a la vez que se exponen a una superficie con PLL que promueve la adhesión de la membrana celular y el crecimiento axonal. Esta propiedad se fundamenta en que la unión de la heparina a la PLL puede hacerse de forma covalente o electrostática. Cuando la unión es electrostática, es posible desprender la heparina
- 15 mediante pulsos galvanostáticos o potencioestáticos y conseguir con ello modular el crecimiento neural sobre la superficie conductora.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un material biofuncionalizado que comprende:

- 20 a) un soporte que se selecciona de entre materiales de carbono, vidrio, plástico, metales o sus óxidos, metaloides o sus óxidos, polímeros, geles, productos derivados de la matriz extracelular, o combinaciones de estos materiales.
- b) un polímero electroconductor dopado con PSS-co-MA y unido al soporte de (a), y
- 25 c) al menos una molécula con actividad biológica unida a la superficie polimérica de forma directa o a través de al menos una molécula puente.

La biofuncionalización se define como una modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de cualquier material, que permite incidir en el

30 comportamiento de las células que entren en contacto con el biomaterial (como puede ser un implante o una prótesis) a fin de mejorar la respuesta biológica del tejido u organismo ante él. Este nuevo concepto permite la mejora de las propiedades superficiales de los biomateriales para obtener efectos beneficiosos como pueden ser

la disminución de la respuesta inflamatoria y la fibrosis alrededor del implante, o bien obtener crecimiento celular selectivo sobre la superficie.

5 En una realización preferida, el soporte es una microfibra con diámetro entre 2 y 15 μm .

En otra realización preferida, el soporte presenta nano o micro estructura. Por ejemplo, las microfibras pueden tener hendiduras a modo de líneas (ver figura 1D) que aumentan la superficie específica y mejoran las propiedades mecánicas del material
10 haciendo más difícil que se desprenda la capa polimérica.

En otra realización preferida, el soporte se selecciona de entre Au, Si, Pt, Ir, Ti o sus óxidos, composites o aleaciones, entendiéndose como composite una mezcla heterogénea de estos metales con otros componentes no metálicos sintéticos o
15 naturales para formar un solo compuesto.

En otra realización preferida, el polímero electroconductor se selecciona de entre poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), polipirrol o polianilina.

20 En otra realización preferida, la molécula con actividad biológica se selecciona de entre moléculas de adhesión celular, moléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, factores guía para los axones o dendritas tales como netrinas, efrinas, semaforinas, protocadherinas o las proteínas Slit ó Wnt, morfógenos como Sonic Hedgehog, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, gangliósidos, proteínas, péptidos o
25 combinaciones de estas moléculas.

En otra realización preferida, la molécula puente se selecciona de entre polipéptidos, aminoácidos, péptidos, polisacáridos, anticuerpos, o combinaciones de los mismos. La molécula puente o la molécula con actividad biológica se puede unir al polímero
30 electroconductor mediante adsorción espontánea, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas o enlaces covalentes.

En otra realización preferida, la molécula con actividad biológica se une al polímero electroconductor a través de al menos dos tipos diferentes de moléculas puente.

En una realización preferida, la molécula puente es polilisina y la molécula con actividad biológica es un complejo de heparina o heparán sulfato y factor de crecimiento, y más preferiblemente un factor de crecimiento que se selecciona de entre bFGF, PDGF-AA o combinaciones de ambos. Adicionalmente este complejo de moléculas biológicas comprende una molécula de la matriz extracelular unida al factor de crecimiento. Preferiblemente, esta molécula de la matriz extracelular se selecciona de entre fibronectina o derivados, vitronectina o derivados o combinaciones de las mismas. Estas moléculas pueden añadirse al complejo en forma de suero fetal o adulto junto con otras proteínas y componentes característicos del suero o en forma de una preparación de la proteína concreta purificada.

En otra realización preferida, la molécula puente es un anticuerpo y más preferiblemente la molécula puente es IgG. En este caso, preferiblemente la molécula con actividad biológica es una molécula de adhesión celular que se selecciona de entre la familia de inmunoglobulinas, cadherinas, integrinas, y selectinas. Más preferiblemente la molécula con actividad biológica es N-cadherina, L1 ó combinaciones de ellas.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a materiales y métodos para la modificación de electrodos neuroprotésicos. El material preferiblemente consiste en una capa de PEDOT dopado con PSS-co-MA y funcionalizado con moléculas de adhesión celular tales como L1 y cadherinas y el método consiste en utilizar este material con el fin de promover el crecimiento axonal y dendrítico y la migración neural sobre la superficie del propio electrodo con el fin de incrementar la eficacia de la comunicación eléctrica entre el electrodo y la célula. La unión de las moléculas al polímero puede realizarse de forma electrostática o covalente, y las CAMs pueden unirse directamente o a través de un ligando. La principal ventaja de recubrir los electrodos neuroprotésicos con PEDOT:PSS-co-MA es que el polímero mejora sus prestaciones eléctricas a la vez que permite la funcionalización covalente de la superficie de manera que la capa molecular unida al polímero no se desprende durante la electroestimulación. Además, la funcionalización covalente del PEDOT:PSS-co-MA no deteriora su conductividad eléctrica y pueden unirse múltiples moléculas a la superficie para obtener los efectos celulares deseados. Por ejemplo, en las neuroprótesis puede resultar fundamental que sobre el electrodo crezcan axones,

dendritas o ambos tipos de prolongaciones. En la presente invención se demuestra que la funcionalización del PEDOT:PSS-co-MA con L1 estimula el crecimiento axonal pero inhibe las dendritas, mientras que su funcionalización con N-cadherina induce el crecimiento tanto de axones como de dendritas. Otra característica muy novedosa de la presente invención es que la funcionalización con N-cadherina estimula la migración neuronal sobre el polímero conductor. Finalmente, la funcionalización simultánea con L1 y N-cadherina produce efectos sinérgicos sobre el crecimiento celular que no pueden obtenerse con ninguna de las dos proteínas aisladas. Así, las superficies funcionalizadas con L1 / cadherinas pueden mejorar las prestaciones de las neuroprótesis y también utilizarse para promover la reparación del tejido neural.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de un material biofuncionalizado, según lo descrito anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- a) Síntesis de un polímero electroconductor dopado con PSS-co-MA sobre un soporte que se selecciona de entre materiales de carbono, vidrio, plástico, metales o sus óxidos, polímeros, geles, productos derivados de la matriz extracelular, o combinaciones de estos materiales,
- b) Funcionalización del polímero electroconductor mediante electroadsorción, unión covalente o adsorción espontánea. En esta última forma, la molécula se incorpora a la superficie al poner el material en contacto con soluciones que contienen las moléculas de interés pero sin aplicar electricidad ni activar químicamente la superficie para la formación de enlaces covalentes.
- c) Unión directa a la superficie del polímero funcionalizado en la etapa (b) de al menos un tipo de molécula con actividad biológica o unión indirecta de dicha molécula con actividad biológica a través de al menos una molécula puente.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del material biofuncionalizado anteriormente descrito para la fabricación de dispositivos para inducir el crecimiento neural, la reparación del sistema nervioso, o para electrodos de neuroestimulación. Preferiblemente el dispositivo es una cámara de cultivo celular o un implante.

Un quinto aspecto se refiere a un método para inducir el crecimiento neural y la reparación del sistema nervioso que comprende poner en contacto tejido del sistema nervioso central con el material biofuncionalizado descrito para promover la proliferación, diferenciación y/o migración de precursores gliales y que a su vez ellos
5 estimulen el crecimiento de los axones.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una cámara de cultivo celular que comprende una base (1) sobre la que se encuentra dispuesto un material en forma de microfibras electroconductoras (2), las cuales están unidas en al menos uno
10 de sus extremos a un contacto eléctrico (3), y que comprende además una celda (4) abierta superior e inferiormente y dispuesta sobre la base (1), en cuyo interior quedan parcialmente contenidas las microfibras.

En una realización preferida, el material dispuesto en forma de microfibras (2) es el
15 material biofuncionalizado de la invención que ha sido descrito anteriormente.

En una realización preferida, la celda (4) es prismática, la base (1) es transparente para permitir la visualización directa del crecimiento celular utilizando un microscopio invertido, y las microfibras (2) están dispuestas sobre la base (1) de forma paralela.
20

En otra realización preferida, la celda (4) comprende además unos soportes (5) dispuestos en dos lados opuestos de la base (1).

En otra realización preferida, la celda (4) además comprende al menos un tabique
25 separador (6) dispuesto transversalmente a la dirección longitudinal de las microfibras (2).

El tabique separador (6) puede disponerse de forma en que no apoya sobre la base definiendo una ranura para el paso de las microfibras (2), o bien el tabique separador
30 (6) comprende unos orificios para el paso de las microfibras (2) y de los elementos celulares que crecen sobre ellas.

En otra realización preferida, la celda (4) es cilíndrica y las microfibras (2) están dispuestas sobre la base (1) de forma radial.

La celda cilíndrica puede además comprender un anillo interior (7), estando dispuestos al menos dos tabiques separadores (8) en dirección radial entre la celda (4) y dicho anillo interior (7). Además, el anillo interior tiene una ranura o un agujero para el paso
5 de la microfibrá y de los elementos celulares que crecen sobre ella.

Estas celdas constituyen una herramienta novedosa para investigar los mecanismos del neurodesarrollo y la biología y fisiología de las células neurales, y también para evaluar tratamientos para las enfermedades del sistema nervioso. Entre las ventajas
10 de estas celdas de cultivo con respecto a las existentes en el mercado se encuentra la posibilidad de aplicar estímulos eléctricos de voltaje o de corriente eléctrica a través del sustrato de crecimiento celular, resultando muy útiles para estudiar la influencia de la actividad neural sobre los procesos de crecimiento y guía axonal, proliferación y diferenciación celular, etc. Además, el crecimiento neuronal y la migración celular
15 sobre las microfibras ocurren de forma sostenida y por distancias largas, de manera que puede registrarse la evolución de estos procesos en escalas de tamaño y tiempo más parecidos a aquellos que tienen lugar en el organismo humano. Otra de sus ventajas es que las microfibras pueden funcionalizarse fácilmente con cualquier tipo de biomoléculas y que estas pueden combinarse, de manera que se puede simular con
20 mayor precisión el complejo entorno multimolecular de los organismos vivos. Por ejemplo, en la misma celda pueden incorporarse microfibras funcionalizadas con diferentes moléculas de adhesión celular para estudiar los fenómenos de crecimiento y fasciculación axonal. Por su parte, las microfibras funcionalizadas con complejos del tipo PLL / Heparina / bFGF / proteínas de la matriz extracelular pueden ser
25 particularmente útiles para estudiar la regeneración axonal mediada por precursores de células gliales, así como la mielinización axonal y su modulación por la actividad eléctrica, tanto en el SNC como en el SNP. Otra ventaja de las celdas de cultivo objeto de la invención es que las microfibras pueden cortarse con facilidad y de forma selectiva, lo que permite estudiar las respuestas celulares a la axotomía, así como
30 separar componentes tisulares (por ejemplo las células migratorias) para subcultivarlas en otras celdas y utilizarlas en otras investigaciones o en implantes. Finalmente, el diseño de las celdas las hace muy apropiadas para visualización directa de las microfibras y las células que migran o crecen en su superficie mediante microscopía confocal, ampliando las posibilidades de utilización de las celdas a

numerosos campos de la biología.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a un implante que comprende el material biofuncionalizado descrito anteriormente. Este implante es apto para inducir el crecimiento neural y la reparación del sistema nervioso en zonas donde se han producido lesiones neurales por diversas causas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 ejemplifica las características morfológicas del PEDOT:PSS-co-MA 1:1. Las partes A, B, D, E y F son electromicrografías de barrido. A) Vista de la superficie del polímero. B) Vista transversal que muestra el espesor del polímero a la derecha de la capa de Ti/Au (visualizada como una línea blanca). C) Cuantificación del grosor del PEDOT:PSS-co-MA en función de la carga de electropolimerización. Se representa el promedio $\pm$ error estándar, siendo el último más pequeño que el tamaño de los símbolos. D) y E) aspectos de las microfibras de carbono antes y después de la electrodeposición del polímero, respectivamente. F) Detalle de la morfología del polímero sintetizado sobre las microfibras. Escalas: A, B y F, 500 nm; D y E, 2 μ m.

La Fig. 2 muestra en la parte A el espectro de infrarrojos del PEDOT:PSS-co-MA 1:1 (línea continua) y del PEDOT:PSS-co-MA 3:1 (línea punteada), preparados sobre vidrio recubierto de Ti/Au. Cada línea representa el promedio de nueve espectros sin procesamiento adicional. En la parte B se representa la fluorescencia (promedio de 6 mediciones $\pm$ error estándar) del PEDOT:PSS-co-MA 1:1 (barras negras) y del PEDOT:PSS-co-MA 3:1 (barras blancas) tras el procesamiento para unión covalente de Alexa-488 a diferentes concentraciones. En la parte C se representa la unión covalente mediante EDC / NHS (barras negras) y la adsorción espontánea (barras

grises) de la Alexa-488 a la superficie del PEDOT:PSS-co-MA 1:1, en función de la concentración del anticuerpo. En B y C se ha sustraído la fluorescencia de fondo (aproximadamente 10 u.a) del polímero sin anticuerpo para una mejor visualización de los datos.

5

La Fig. 3 presenta la caracterización mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) de las superficies de Ti/Au y de las microfibras de carbono recubiertas con polímeros conductores. A) Diagrama de Nyquist para los datos obtenidos en el rango 1 kHz a 0,1 Hz de las superficies de Ti/Au recubiertas con PEDOT:PSS-co-MA 1:1 sintetizado con 48 (círculos), 96 (cuadrados), 192 (triángulos), 288 (triángulos invertidos) ó 384 (rombos) mC/cm². Los datos simulados se representan con cruces. B) Diagrama de Bode de módulo de la impedancia de los mismos materiales presentados en A, pero incluyendo además los datos obtenidos de la superficie de Ti/Au sin polímero (triángulos inclinados). C) Diagrama de Bode de módulo de la impedancia del PEDOT:PSS-co-MA sintetizado a 96 mC/cm² sobre Ti/Au, sin funcionalizar (círculos) o con PLL unida covalentemente (cuadrados). D) Diagrama de Nyquist para los datos obtenidos en el rango 10 kHz a 0,1 Hz de las microfibras de carbono recubiertas con PEDOT:PSS (cuadrados) o con PEDOT:PSS-co-MA (círculos), ambos sintetizados con 96 mC/cm². Los datos simulados se representan con cruces. E) Diagrama de Bode de módulo de la impedancia de los mismos materiales presentados en D, pero incluyendo además los datos obtenidos de las microfibras de carbono sin polímero conductor (círculos).

La Fig. 4 presenta la caracterización mediante voltametría cíclica (CV) de las superficies de Ti/Au y de las microfibras de carbono recubiertas con polímeros conductores. A) Densidad de carga obtenida durante la voltametría (Q_{CV}) a velocidad de 0,05 V/s (línea gris) ó 0,5 V/s (línea negra) en función de la carga de electrosíntesis (Q_{Pol}). B) CV (0,05 V/s) del PEDOT:PSS-co-MA sobre Ti/Au. El polímero se ha sintetizado con 96 mC/cm² y se analiza sin funcionalización (línea continua) o después de unirle PLL covalentemente (línea discontinua). C) CV (0,5 V/s) del PEDOT:PSS-co-MA (96 mC/cm²) sobre Ti/Au. El polímero se analiza sin funcionalización (línea continua) o después de unirle PLL covalentemente (línea discontinua). Nótese la diferente escala de la densidad de corriente respecto a B. D) Degradación del transporte de carga del PEDOT:PSS-co-MA (96 mC/cm²) sintetizado sobre Ti/Au (línea

discontinua) o sobre microfibras de carbono (línea continua), en función del número de ciclos de CV a 0,5 V/s en tampón fosfato. E) Q_{CV} obtenida a distintas velocidades para las microfibras de carbono sin recubrimiento (línea punteada), recubiertas con PEDOT:PSS (línea continua), o con PEDOT:PSS-co-MA (línea a rayas). Los polímeros se electrosintetizaron con 96 mC/cm². Las barras de error son más pequeñas que los símbolos. F) CV (50 V/s) del PEDOT:PSS (línea continua) y del PEDOT:PSS-co-MA (línea discontinua) sintetizados a 96 mC/cm² sobre microfibras de carbono. Se muestra también el voltamperograma de la microfibra sin recubrimiento (línea punteada). Nótese la diferente escala de la densidad de corriente respecto a B y C.

10

La Fig. 5 presenta la caracterización mediante cronoamperometría de las microfibras de carbono recubiertas de polímero conductor por electrosíntesis a 96 mC/cm². A) Microfibras recubiertas de PEDOT:PSS. B) Microfibras recubiertas de PEDOT:PSS-co-MA. A y B muestran la densidad de corriente aportada por las microfibras al aplicar un tren de pulsos bifásicos con amplitud de 0,2 (línea de rayas cortas), 0,3 (línea de puntos), 0,4 (línea de rayas largas) y 0,5 (línea de rayas-puntos) voltios; cada fase con duración de 1 ms. Para comparación se muestra la respuesta de las microfibras de carbono sin polímero (línea continua) y aplicando el mayor voltaje (0,5 V). C) Densidad promedio de carga por pulso (Q_{pulso}) aportada por las microfibras recubiertas con PEDOT:PSS (líneas grises) o con PEDOT:PSS-co-MA (líneas negras) al aplicar pulsos de voltaje de diferente intensidad y duración (líneas continuas, 1ms; líneas discontinuas, 5 ms). El error estándar es más pequeño que los símbolos.

La Fig. 6 es un dibujo que ilustra dos complejos utilizados para la funcionalización multimolecular del PEDOT:PSS-co-MA. Por simplicidad, en el esquema de la izquierda se ha omitido la adición final de las moléculas de la matriz extracelular que se unen al complejo formado por la heparina o heparán sulfato y el factor de crecimiento.

La Fig. 7 presenta las cuantificaciones de las moléculas de adhesión celular (CAMs) o de los factores de crecimiento unidos a la superficie del PEDOT:PSS-co-MA 1:1 y detectados mediante inmunofluorescencia. A) Señal de las CAMs recombinantes unidas al polímero al que previamente se le enlazó IgG específica contra el fragmento Fc de la IgG humana. Cada una de las cuatro superficies se procesó para detectar simultáneamente N-Cadherina y L1. B) Señal de los factores de crecimiento unidos a

la superficie del PEDOT:PSS-co-MA 1:1 al que previamente se le enlazó PLL y posteriormente se le adicionó heparina. Cada una de las cuatro superficies se procesó para detectar simultáneamente bFGF y PDGF-AA.

5 **La Fig. 8** ilustra la supervivencia y crecimiento de las células neurales cultivadas a 25000 células/cm² sobre PEDOT:PSS-co-MA sin ninguna molécula pro-adhesiva, o funcionalizado con PLL. A) Microfotografía con contraste de fase de las células cultivadas por 24 h en el polímero sin funcionalizar. B) Microfotografía de las células cultivadas por 24 h en el polímero funcionalizado con PLL enlazada covalentemente. 10 C) Imagen de fluorescencia que muestra las neuronas sobre el polímero funcionalizado mediante electroadsorción de PLL, cultivadas por 5 días y procesadas con inmunocitoquímica para Tau y MAP2. D) Imagen de fluorescencia de las neuronas cultivadas por 5 días sobre el polímero funcionalizado mediante unión covalente de PLL y procesada de forma similar al caso C. Las escalas representan 100 µm.

15

La Fig. 9 ilustra la supervivencia y crecimiento de las células neurales cultivadas sobre PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con A-HlgG / CAMs. En las partes A y B se muestran imágenes de contraste de fase de las neuronas cultivadas a 25000 células/cm² por 24 h sobre el polímero con N-Cadherina utilizada a 5 y 20 µg/ml, 20 respectivamente. En C-F se muestran ejemplos representativos del crecimiento de las neuronas cultivadas a 1000 células/cm² por 48 h sobre PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con A-HlgG y: C) N-Cadherina 10 µg/ml, D) L1 10 µg/ml, E) N-Cadherina y L1, ambos a 10 µg/ml. Para su comparación, en F) se presenta un ejemplo del crecimiento sobre el polímero con PLL (45 µg/ml) unida covalentemente. 25 Las imágenes C a F se han procesado con inmunocitoquímica para Tau (axones, flechas largas) y MAP2 (somas y dendritas, flechas cortas). Las escalas representan 100 µm.

La Fig. 10 presenta las mediciones detalladas del crecimiento neuronal en cultivos de 30 baja densidad sobre PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL (45 µg/ml) ó A-HlgG y CAMs (10 µg/ml). Los colores representan la misma superficie en todas las gráficas: blanco, polímero + PLL; gris oscuro, polímero + A-HlgG / N-Cadherina (NCad); gris medio, polímero + A-HlgG / L1; gris claro, polímero + A-HlgG / NCad / L1. Para comparación adicional se incluyen los datos del crecimiento sobre vidrio borosilicato

recubierto con PLL (negro). Por simplicidad, solo se indican con asteriscos las diferencias estadísticas (ANOVA de un factor) entre las neuronas crecidas en vidrio con PLL ó polímero con CAMs en comparación con aquellas cultivadas sobre el polímero con PLL, y las otras comparaciones se describen en el texto. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

La Fig. 11 presenta las cuantificaciones de la migración celular en cultivos de baja densidad sobre PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL (45 $\mu\text{g/ml}$) ó A-HIgG y CAMs (10 $\mu\text{g/ml}$). A) Porcentaje de células que migran en cada superficie. B) Distancia recorrida (media $\pm$ SEM) por el subgrupo de células migratorias. En el polímero funcionalizado con PLL no hubo migración celular, definida como el desplazamiento del soma por más de 30 μm . Las diferencias estadísticas entre las superficies tratadas con distintas CAMs se describen en el texto.

La Fig. 12 es una serie de dibujos que ejemplifican los modelos de celdas de cultivo celular con microfibras electroconductoras objeto de la presente invención. A) Dibujo de un pozo de una celda de cultivo simple. B) Dibujo de dos pozos que se comunican a través de las microfibras y un pequeño espacio alrededor en una celda de cultivo compuesta. Se ilustran también dos modelos de comunicación en función de las necesidades del cultivo. C) Dibujo de una celda de cultivo compartimentalizada con microfibras radiales. Los números indican: 1 – la base; 2 – las microfibras electroconductoras; 3 – los contactos eléctricos; 4 – la pared de la celda; 5 – los soportes; 6 – el tabique separador en la celda B; 7 – el anillo interior en la celda C; 8 – los tabiques separadores en la celda C.

La Fig. 13 presenta las cuantificaciones del crecimiento axonal, la migración glial y el número de células sobre las microfibras que tienen PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con A-HIgG y CAMs (L1 ó N-Cadherina), fijadas y procesadas para inmunohistoquímica a los 5 o 10 días de poner el explante. Los datos representan la media $\pm$ SEM de la longitud de crecimiento axonal (A), la longitud recorrida por las células Vimentina⁺ (B) y el número de células Vimentina⁺ (C) sobre las microfibras en función de la molécula presente en la superficie y la duración del cultivo. Las diferencias estadísticas entre las condiciones experimentales se describen en el texto. Nótese la diferente escala en la distancia de crecimiento axonal y migración celular.

La Fig. 14 es una serie de imágenes obtenidas por microscopía confocal que ejemplifican el crecimiento axonal y dendrítico y la migración neuronal a partir de explantes de la corteza cerebral tras 10 días en contacto con microfibras funcionalizadas con A-HlgG / CAMs (L1 ó N-Cadherina). Se muestran los tipos y relaciones celulares que tienen lugar en la zona proximal de la microfibra (la zona más cercana al explante), incluyendo la imagen de luz transmitida así como la fluorescencia debida al crecimiento axonal (Tau) y las dendritas y somas neuronales (MAP2). Nótese la diferente morfología y localización que tienen los somas neuronales (flechas cortas) y las dendritas (flechas largas) respecto a las fibras dependiendo de la CAM utilizada. Las escalas representan 50 μ m.

La Fig. 15 ilustra el crecimiento neural sobre las microfibras que tienen PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL únicamente o con un complejo multimolecular de PLL y capas adicionales de Heparina / bFGF / moléculas del suero fetal bovino (FBS). Los cultivos se fijaron a los 5 días y posteriormente se les realizó inmunohistoquímica para vimentina (precursores gliales) y Tau (axones). A) Migración de los progenitores gliales (barras negras) y crecimiento axonal (barras blancas) en las microfibras en función del complejo molecular presente en la superficie (PLL, polilisina; Hep, heparina; bFGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico). B) número de precursores en las microfibras.

La Fig. 16 muestra las interacciones entre los precursores gliales y los axones sobre las microfibras que tienen PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL / Heparina / bFGF / FBS. A), B) y C) son imágenes de microscopía confocal que ejemplifican los tres tipos de relación existente entre los axones (gris claro, flechas blancas) y las células del frente migratorio (gris oscuro, flechas negras). D), E) y F) son electromicrografías de la célula de la punta (D), y de las células que van detrás del frente de avance (E, F). Estas últimas presentan dos tipos de morfología, como son la fusiforme (E) y la polidendrítica (F). Nótese que en la célula fusiforme también existen pequeñas prolongaciones laterales, y que las células en E y F se entremezclan con numerosos axones y prolongaciones de otras células.

La Fig. 17 presenta detalles de la interacción entre los precursores gliales y los axones sobre las microfibras, así como otras características fenotípicas de los precursores. A) Electromicrografía que muestra como los precursores emiten prolongaciones citoplasmáticas que envuelven a los axones (flechas blancas a la izquierda) y a los conos de crecimiento axonal. En la ampliación de la derecha, nótese como el cono de crecimiento axonal tiene forma de bulbo y escasos filopodios, y está en contacto con el polímero funcionalizado mientras que por encima lo envuelve la prolongación del precursor glial (flecha blanca). B) y C), inmunorreactividad de la membrana citoplasmática de los precursores para NG2 y PDGFR α , respectivamente.

10

La Fig. 18 presenta las cuantificaciones del crecimiento neural sobre las microfibras que tienen PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL / Heparina / bFGF / y moléculas de la matriz extracelular a partir del suero ó en su forma purificada. Los cultivos se han fijado a los 5 días. La figura también presenta la cuantificación de la unión de las moléculas a la superficie mediante inmunofluorescencia, siguiendo el procedimiento que se describe en el ejemplo 14. A) Migración de los precursores gliales (barras negras) y crecimiento axonal (barras blancas) en las microfibras en función del complejo molecular presente en la superficie (NRS, suero de rata normal; VN, vitronectina; FN, fibronectina; las otras abreviaciones se describen en la Fig. 18). B) número de precursores en las microfibras. C) Cuantificación de la unión de FN a la superficie del PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL / Heparina / bFGF, a partir de medio de cultivo con los suplementos que se indican en la figura.

20

La Fig. 19 muestra una serie de imágenes obtenidas por microscopía confocal que ejemplifican el crecimiento neural (5 días) sobre las microfibras que tienen PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL/Heparina/bFGF y adicionalmente con: A) FBS (10 %); B) NRS (10 %); C) FN 20 μ g/ml; D) VN 20 μ g/ml. Los precursores gliales están teñidos para vimentina (gris) y los axones para Tau (blanco). Las escalas representan 500 μ m.

30

La Fig. 20 presenta una serie de imágenes de microscopía confocal en las que se compara la relación entre los axones y las células de la punta, así como el fenotipo de las células de la punta, sobre microfibras que tienen PEDOT:PSS-co-MA con PLL/Heparina/bFGF y a las que se añade finalmente FBS ó FN. Nótese la similitud del

crecimiento y del fenotipo de las células migratorias en ambas condiciones. Las flechas largas señalan los axones (marcados para Tau ó para β -III tubulina), y las flechas cortas señalan los precursores gliales (marcados para Vimentina o para PDGFR α).

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Electrosíntesis de los polímeros conductores

Se utilizó un potenciostato / galvanostato (Autolab PGstat30; Ecochemie, The Netherlands) para electrosintetizar poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) dopado con poli[(ácido 4-estireno sulfónico)-co-(ácido maleico)] (PSS-co-MA, 20000 de PM), aplicando corriente constante anódica ($1 \mu\text{A}/\text{mm}^2$). El electrodo de trabajo (WE) consistió en un portaobjetos de vidrio borosilicato recubierto con 10 nm de Au (Phasis, Switzerland; capa de Au unida al vidrio por medio de una nanocapa de Ti), o en microfibras de carbono de 7 μm de diámetro (C005722, Goodfellow, UK); usando Pt como contraelectrodo (CE) y un electrodo de calomelanos saturado (SCE) como electrodo de referencia (RE). Para la electrosíntesis del polímero sobre las microfibras de carbono se colocaron 5 microfibras alineadas en las cámaras de cultivo celular que se describen en el ejemplo 11. El polímero (PEDOT:PSS-co-MA) se sintetizó con éxito sobre ambas superficies electroconductoras, registrándose un potencial cercano a 0,84 V (vs. SCE) y un potencial de circuito abierto para el polímero formado de 0,25 V (vs. SCE) tras 5 minutos de su relajación en tampón fosfato. Para producir polímeros con diferente grosor se suministraron distintas densidades de carga eléctrica entre 48 y 384 mC/cm^2 . También se compararon las características del PEDOT:PSS-co-MA producido al utilizar PSS-co-MA con relaciones molares de ácido 4-estireno sulfónico:ácido co-maleico de 1:1 y 3:1 (referencias 434558 y 434566 de Sigma-Aldrich, USA). El monómero y los dopantes se utilizaron a concentraciones de 15 mM (EDOT, Sigma-Aldrich), 0,172 mM (PSS-co-MA 1:1) y 0,189 mM (PSS-co-MA 3:1), respectivamente. Las concentraciones mencionadas de los dopantes equivaldrían a aproximadamente 20 mM si el cálculo se realiza considerando el número total de moléculas de ácido 4-estireno sulfónico y de ácido co-maleico presentes en cada molécula. Como disolvente se usó tampón fosfato 5 mM estéril (1 litro de agua MQ contiene 9 g NaCl, 0,8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,14 g de KH_2PO_4) a 37 °C.

Ejemplo 2: Características morfológicas y químicas del PEDOT:PSS-co-MA

El estudio de la morfología de los polímeros preparados y la cuantificación de su grosor se realizaron mediante microscopía electrónica de barrido (Nova NanoSEM200, FEI Company, USA), utilizando 2-3 kV, spot 2.0, detector TLD y condiciones de alto vacío. La conductividad eléctrica del PEDOT:PSS-co-MA hizo innecesaria la utilización de recubrimientos metálicos adicionales y permitió la visualización de poros muy pequeños (~ 5 nm) en la superficie. Su composición atómica se determinó utilizando un detector de energías dispersivas de rayos X (EDX) integrado con el SEM y trabajando a 7,5 kV. También se estudió la composición del polímero, su estado relativo de oxidación y su homogeneidad empleando espectrofotometría de infrarrojos (FT-IR), para lo cual se utilizó un sistema automatizado de microespectrofotometría (Spotlight 400; PerkinElmer, USA) equipado con un espectrofotómetro Spectrum-one (PerkinElmer). El sistema se operó en el modo de imagen por reflectancia entre 4000 y 750 cm^{-1} , con resolución de 16 cm^{-1} números de onda, tamaño de píxel de 50 μm , adquiriendo 16 registros por píxel y finalmente analizando 9 espectros por cada muestra.

Los estudios mediante SEM (Fig. 1) confirmaron la formación del polímero sobre los portaobjetos de Ti/Au y sobre las microfibras de carbono, en ambos casos obteniéndose una nanoestructura nodular altamente porosa. La relación entre la carga de electrosíntesis y el grosor del polímero se estudió en las películas preparadas sobre Ti/Au. El aumento gradual de la carga eléctrica suministrada de 48 a 384 mC/cm^2 causó un incremento lineal ($r = 0.99$) en el grosor de la capa de PEDOT:PSS-co-MA desde 0,23 hasta 1,37 μm , mostrando una relación de $3,46 \pm 0,1$ μm por 1 C/cm^2 . El análisis mediante EDX del PEDOT:PSS-co-MA recién preparado mostró que estaba compuesto por carbono ($62,58 \pm 0,67$ %), oxígeno ($26,58 \pm 0,76$ %) y azufre ($9,56 \pm 0,12$ %), junto con un porcentaje pequeño de cloro ($1,30 \pm 0,05$ %) incorporado a partir del tampón durante la electrosíntesis oxidativa, pero ausencia de sodio y potasio. Esta composición atómica relativa fue homogénea en la superficie del polímero. El espectro de infrarrojos del PEDOT:PSS-co-MA preparado sobre Ti/Au con 96 mC/cm^2 mostró las bandas de absorción que corresponden a los grupos químicos y al estado dopado del PEDOT. Para el PSS-co-MA 1:1 fueron prominentes las vibraciones a 1519, 1476, 1394 y 1346 cm^{-1} (tensión del C = C y C - C), 1204, 1144, 1087, 1057 y 982 cm^{-1} (bandas inducidas por el dopaje), y 934 y 840 cm^{-1} (tensión del C-S). Las bandas del espectro del PEDOT:PSS-co-MA 3:1 fueron bastante parecidas a las del 1:1 (Fig. 2A),

pero la absorbancia fue mayor y el espectro se desplazó sutilmente hacia las frecuencias más bajas, indicando un mayor estado de oxidación (Kvarnström et al., 1999).

5 **Ejemplo 3: Unión covalente de biomoléculas al PEDOT:PSS-co-MA**

Se utilizaron películas de PEDOT:PSS-co-MA preparadas con 96 mC/cm^2 sobre Ti/Au para evaluar la unión covalente de proteínas al polímero, a través de la formación de enlaces entre los grupos carboxilo del PSS-co-MA y los grupos amino de la proteína. La reacción se realiza a 24°C aplicando sobre la superficie del polímero una solución

10 de 1-etil-3 (3-dimetilamino-propil) clorhidrato de carbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich) y N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma-Aldrich), ambos a $45 \text{ }\mu\text{g/ml}$ en agua MQ, por 1 h. Posteriormente se retira la solución, se lava 3 veces en agua MQ e inmediatamente después se aplica la molécula a conjugar covalentemente (por ejemplo PLL, anticuerpos o moléculas de adhesión celular), disuelta en tampón de trietanolamina

15 (TEA) 50 mM , pH 8,0, también por 1 h. Transcurrido este tiempo se retira la solución y se lava la superficie 2 h en agua MQ estéril y luego otras 12 h en tampón fosfato 5 mM , en agitación suave. Finalmente se lavan con agua y para los estudios de microscopía confocal se montan con tampón fosfato / glicerol. Puesto que el PEDOT:PSS-co-MA 1:1 tiene el doble de grupos carboxilo por molécula en

20 comparación con el 3:1, resulta esperable que el primero sea más eficiente para la unión covalente de biomoléculas mediante reacciones con EDC / NHS. Con el fin de valorar esta cuestión, realizamos un ensayo de unión de anticuerpos fluorescentes (IgG conjugada con Alexa-488, Molecular Probes) a 5 , 25 y $45 \text{ }\mu\text{g/ml}$ sobre los polímeros conductores. También se realizaron comparaciones entre la unión covalente

25 del anticuerpo y su adsorción espontánea al polímero, para lo cual se procesó el PEDOT:PSS-co-MA de la misma manera que para la conjugación covalente pero omitiendo el EDC / NHS. Tras la reacción, las superficies fueron escaneadas con un microscopio confocal (TCS SP2 SE, Leica Microsystems CMS GmbH) utilizando un objetivo 63x de inmersión y zoom de 3,5. Para la Alexa-488 se excitó a 488 nm y se

30 recogió la emisión entre $500\text{-}590 \text{ nm}$, y en el caso de la Alexa-594 se excitó a 594 nm y se recogió la emisión entre $605\text{-}750 \text{ nm}$. Se analizaron seis campos por muestra, y tres muestras por cada situación experimental. Se utilizó el programa ImageJ (1.39u, NHI, USA) para medir el promedio de la intensidad de color verde en las imágenes obtenidas. La Fig. 2B muestra la fluorescencia del PEDOT:PSS-co-MA 1:1 (barras

negras) y del PEDOT:PSS-co-MA 3:1 (barras blancas) tras el procesamiento para unión covalente de Alexa-488. La fluorescencia de fondo (aproximadamente 10 u.a) del polímero sin anticuerpo ha sido sustraída para una mejor representación de los datos. El análisis de los resultados utilizando ANOVA de dos factores mostró que en
 5 ambos polímeros ocurre un claro incremento ($p < 0.0001$) de la unión covalente del anticuerpo en función de su concentración, y que el PEDOT:PSS-co-MA 1:1 une casi el doble de anticuerpo en comparación con el PEDOT:PSS-co-MA 3:1 cuando la Alexa-488 se utiliza a 25 y 45 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente). Con los métodos utilizados no se detectó diferencia ($p = 0.195$) para 5 $\mu\text{g/ml}$, probablemente
 10 debido a que la unión del anticuerpo es escasa y la fluorescencia del polímero se acerca a la señal de fondo. En la Fig. 2C se representa la unión covalente (mediante EDC / NHS, barras negras) y la adsorción espontánea (barras grises) de la Alexa-488 a la superficie del PEDOT:PSS-co-MA 1:1. La unión del anticuerpo al polímero mediada por EDC / NHS fue muy superior a la adsorción espontánea, y este efecto se
 15 constató en todas las concentraciones utilizadas (ANOVA de dos factores, $p < 0.000001$). También se observó un incremento en la unión de la proteína al polímero dependiente de la concentración, obteniéndose los mayores valores con la máxima concentración evaluada (85 $\mu\text{g/ml}$).

20 **Ejemplo 4: Funcionalización del PEDOT:PSS-co-MA con policationes tipo PLL.**

Para la funcionalización del PEDOT:PSS-co-MA con PLL se utilizaron procedimientos de electroadsorción o de unión covalente. La electroadsorción del polication se realizó mediante reducción galvanostática del polímero, metodología similar a la que desarrollamos para adsorber PLL al PEDOT dopado con sulfonato de poliestireno
 25 (Collazos-Castro et al., 2010, *Biomaterials* 31: 9244-9255). Se utilizó PLL con PM entre 30000 y 70000 (Sigma-Aldrich), disuelta a 45 $\mu\text{g/ml}$ en agua MQ purificada hasta obtener una resistividad de 18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}^2$. Para la electroadsorción se utilizó una celda electroquímica en la que el polímero preparado a 96 mC/cm^2 funcionaba como WE enfrentado a un contraelectrodo de Pt y referenciado al SCE, y se aplicó corriente
 30 constante ($-12,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) hasta una densidad de carga de 3 mC/cm^2 . Inmediatamente tras la reducción el polímero se lavó con abundante agua MQ y se dejó secar. En otras realizaciones se unió covalentemente la PLL al PEDOT:PSS-co-MA, utilizando el mismo protocolo descrito en el ejemplo 3. Debido a la gran cantidad de grupos amino

presentes en la PLL, para su unión covalente se usó solamente la concentración de 45 $\mu\text{g/ml}$ en tampón TEA 50 mM, pH 8,0.

Ejemplo 5: Propiedades electroquímicas del PEDOT:PSS-co-MA y comparación con el PEDOT:PSS con el fin de establecer su utilidad para recubrir y funcionalizar electrodos neuroprotésicos

Las propiedades de los electrodos recubiertos se estudiaron mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), voltametría cíclica (CV) y cronoamperometría usando la configuración de tres electrodos y el tampón fosfato descritos en el ejemplo

- 10 1. Para la EIS se aplicaron ondas sinusoidales de 5 mV a 26 valores de frecuencia espaciados logarítmicamente desde 10 kHz hasta 0,1 Hz. Los espectros obtenidos se modelaron utilizando la expresión de la impedancia cuyos parámetros se obtuvieron mediante un método no lineal de mínimos cuadrados complejos que se implementó en MatLab (MathWorks, USA). La CV se realizó llevando el potencial de reposo a 0 V por
- 15 10 s y posteriormente registrando entre $-1,05$ y $+0,55$ V (versus SCE) a 0,05, 0,5, 5 y 50 V/s. A partir de la CV se estudiaron los fenómenos redox y también se calculó la densidad de carga (Q_{CV}) anódica y catódica de los materiales preparados, integrando la corriente en cada fase del voltamperograma con respecto al tiempo y dividiendo por la velocidad de barrido. En aras de simplificar los resultados aquí se presenta el
- 20 promedio de las dos cargas. También utilizamos la CV para evaluar la estabilidad del PEDOT:PSS-co-MA sobre las superficies de Ti/Au y sobre las microfibras de carbono, midiendo la Q_{CV} a 0,5 V/s cada 100 ciclos hasta un total de 500 y comparando los valores relativos. Para la cronoamperometría se aplicaron trenes de pulsos bifásicos rectangulares, llevando previamente el potencial del electrodo a 0 V por 10 s y siempre
- 25 empezando por la fase negativa. Los pulsos tenían duración de 1 ó 5 ms y amplitudes de 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 V. Los resultados obtenidos fueron muy parecidos para el PEDOT:PSS-co-MA 1:1 y 3:1. Aquí se presentan sólo los datos del PEDOT:PSS-co-MA 1:1, ya que fue superior al 3:1 en cuanto a la unión covalente de proteínas (ver ejemplo 3) y por consiguiente se seleccionó para todos los estudios celulares. Para su
- 30 caracterización electroquímica, los polímeros se electrosintetizaron sobre 100 mm^2 de vidrio con nanocapa de Ti/Au o sobre microfibras de carbono, en este último caso produciendo electrodos de aproximadamente $0,023\text{ mm}^2$ (0,92 mm de microfibra recubierta con polímero, con un diámetro aproximado de 8 μm). Se estudiaron diferentes grosores de recubrimiento, pero en las microfibras se caracterizaron

únicamente los sintetizados con 96 mC/cm^2 , que fueron los utilizados para los cultivos organotípicos. A efectos comparativos utilizamos PEDOT:PSS electrodepositado en las microfibras con los mismos parámetros usados para el PEDOT:PSS-co-MA. La Fig. 3A muestra el diagrama de Nyquist con los espectros de impedancia del PEDOT:PSS-co-MA electrosintetizado con diferentes cargas. En dichos diagramas se ha representado $-X(\omega)$ vs. $R(\omega)$, donde $R(\omega)$ y $X(\omega)$ son las partes real (resistencia) e imaginaria (reactancia) de la impedancia $Z(j\omega)=R(\omega)+jX(\omega)$, respectivamente, ω es la frecuencia angular ($\omega=2\pi f$, f es la frecuencia) y j es la unidad imaginaria. El diagrama obtenido para el PEDOT:PSS-co-MA es similar al descrito previamente para el PEDOT:PSS (Collazos-Castro et al., 2010 *Biomaterials* 31: 9244-9255; Hernández-Labrado et al., 2011, *J. Electroanal. Chem.*; 659; 201-204). A frecuencias elevadas, el diagrama de Nyquist dibuja un comportamiento de difusión de Warburg: recta que forma un ángulo de $\sim 45^\circ$ con el eje real. A medida que la frecuencia disminuye, se produce un desplazamiento de la fase desde 45° a 90° (detalle de la Fig. 3A). A frecuencias bajas, el diagrama muestra un comportamiento de condensador: recta que forma un ángulo de $\sim 90^\circ$ con el eje real. La difusión iónica desde el polímero hacia el electrolito y/o viceversa, mantiene la electroneutralidad de aquél durante la aplicación de un potencial. Obsérvese que la anchura de la región de difusión de Warburg se incrementa con el grosor de la capa de PEDOT:PSS-co-MA. Puesto que la transferencia electrónica es mucho más rápida que la difusión iónica, es razonable asumir que la transferencia de carga en el polímero está controlada por la difusión iónica. Los datos experimentales se interpretan utilizando la siguiente expresión:

$$Z(j\omega) = R_s + R_{dif} \left(\frac{\omega_d}{j\omega} \right)^{1-\frac{\alpha}{2}} \coth \left[\left(\frac{j\omega}{\omega_d} \right)^{\frac{\alpha}{2}} \right]$$

donde R_s es la resistencia del electrolito y el segundo sumando representa la impedancia de subdifusión de formulación parabólica (Hernández-Labrado et al., 2011, *J. Electroanal. Chem.*; 659; 201-204). La expresión de la impedancia es coherente con la obstaculización al flujo iónico causada por la estructura nanoporosa y tortuosa del polímero, lo que se traduce en una difusión iónica anómala más lenta (subdifusión) que la descrita por las leyes de Fick. R_{dif} es una constante (resistencia), α es el parámetro de la subdifusión ($\alpha=1$, difusión normal) y ω_d es la frecuencia angular característica ligada a la transición entre los comportamientos de Warburg y condensador. El coeficiente de difusión iónica D_α se obtiene como:

$$D_{\alpha} = \omega_d^{\alpha} L^2$$

A bajas frecuencias, la capacidad difusional del condensador obtenido se escribe:

$$C_{dif} = (R_{dif} \omega_d)^{-1}$$

La Fig. 3A muestra también los datos simulados utilizando los parámetros de la Tabla

5 1. Existe una excelente concordancia entre los datos experimentales y los simulados. Según muestra la Tabla 1, los valores de α están próximos a 0,8 indicando un comportamiento subdifusivo ($0 < \alpha < 1$). C_{dif} , R_{dif} y ω_d varían linealmente con L , $(\omega_d L)^{-1}$ y L^{-1} , respectivamente.

10 Existe una excelente concordancia entre los datos experimentales y los simulados. Según muestra la Tabla 1, los valores de α están próximos a 0,8 indicando un comportamiento subdifusivo ($0 < \alpha < 1$). C_{dif} y R_{dif} varían linealmente con L y $(\omega_d L)^{-1}$ respectivamente, mientras que ω_d varía inversamente con el grosor de la capa.

Q_{Pol} mC/cm ²	L nm	R_s Ω cm ²	R_{dif} Ω cm ²	α	ω_d rad/s	D_{α} cm ² /s ^{α}	C_{dif} mF/cm ¹⁵²
48	230	29,50	14,51	0,756	32,39	$0,73 \times 10^{-8}$	2,13
96	394	31,51	16,53	0,763	14,66	$1,2 \times 10^{-8}$	4,12
96 + PLL covalente	394	32,37	14,27	0,789	19,20	$1,6 \times 10^{-8}$	3,65 ²⁰
192	764	33,88	19,13	0,819	6,75	$2,8 \times 10^{-8}$	7,74
288	1118	36,70	19,86	0,816	4,61	$4,3 \times 10^{-8}$	10,92 ²⁵
384	1367	38,75	34,41	0,833	1,92	$3,2 \times 10^{-8}$	15,14

Tabla 1. Parámetros utilizados en la simulación de los datos de EIS determinados en el rango de 1 kHz a 0,1 Hz para el PEDOT:PSS-co-MA electrosintetizado sobre superficies de Ti/Au de 100 mm².

30

En la Fig. 3B se observa cómo la capa de polímero depositada hace disminuir la impedancia eléctrica del Ti/Au más de dos órdenes de magnitud. La impedancia del electrodo metálico se describe mediante la resistencia del electrolito ($R_s = 48,21 \Omega$ cm²)

y un elemento de fase constante (CPE) que modela, en este caso, el condensador de la doble capa. La impedancia del CPE se escribe: $Z_{CPE}(j\omega)=1/[Y_p(j\omega)^\beta]$ donde Y_p y β son constantes. Para el electrodo metálico se obtiene: $Y_p=10,39 \mu F s^{\beta-1}/cm^2$ y $\beta=0,9654$. El verdadero valor de la capacidad (C_{dl}) de la doble capa se estima utilizando la fórmula deducida por Brug y col. (1984 *J. Electroanal Chem*; 176; 275-295): $C_{dl}=[(R_s Y_p)^{(1/\beta)}]/R_s$

5 $= 7,91 \mu F/cm^2$. Obsérvese que la capacidad aumenta aproximadamente 3 órdenes de magnitud: del orden de μF al de mF . En la Fig. 3C puede observarse que la conjugación covalente de PLL sobre el PEDOT:PSS-co-MA esencialmente no modifica el módulo de la impedancia. Los procesos de transferencia de carga descritos

10 mediante EIS para el PEDOT:PSS-co-MA sobre los electrodos de Ti/Au fueron similares cuando el polímero se sintetizó sobre las microfibras de carbono (Fig. 3D-E). En estas figuras se muestra también la comparación de la impedancia del PEDOT:PSS-co-MA y el PEDOT:PSS; como puede observarse, los dos polímeros tienen un comportamiento muy similar y sus procesos se describen apropiadamente

15 mediante el modelo de subdifusión (Fig. 3D). Al igual que sobre el Ti/Au, los polímeros sintetizados sobre las microfibras de carbono disminuyeron el módulo de la impedancia 2 órdenes de magnitud (Fig. 3E). Los parámetros determinados para las microfibras de carbono recubiertas de polímero conductor se detallan en la Tabla 2. El aspecto más relevante es la gran capacidad difusional de las microfibras, que para su

20 área aproximada ($0,023 mm^2$) se traduce en $2,7 mF/cm^2$ para las que tienen PEDOT:PSS y $3 mF/cm^2$ para las recubiertas con PEDOT:PSS-co-MA. En contraste, para la microfibra sin polímero se obtiene: $Y_p=6,34 nF s^{\beta-1}$ y $\beta=0,9059$. El verdadero valor de la capacidad (C_{dl}) de la doble capa se estima en $2,06 nF$, que para el área de las microfibras sin recubrir ($0,020 mm^2$) se traduce en una capacidad de solamente

25 $10,17 \mu F/cm^2$.

	Tipo de polímero y Q_{Pol} (mC/cm ²)	R_s	R_{dif}	α	ω_d	C_{dif}
		Ω	Ω		rad/s	μF
5	PEDOT:PSS 96 mC/cm ²	3518,5	1283,8	0,636	1255,63	0,62
	PEDOT:PSS- co-MA 96 mC/cm ²	4162,2	4005,5	0,809	362,19	0,69

10 **Tabla 2.** Parámetros utilizados en la simulación de los datos de EIS determinados en el rango de 10 kHz a 0,1 Hz para los polímeros conductores electrosintetizados sobre microfibras de carbono con superficie de 0,023 mm².

15 Los voltamperogramas del PEDOT:PSS-co-MA sobre los electrodos de Ti/Au de 100 mm² fueron muy similares a los que hemos publicado para el PEDOT:PSS (Collazos-Castro et al., 2010, Biomaterials 31: 9244-9255), tanto en los procesos electroquímicos observados como en la Q_{CV} obtenida. Cuando la CV se realiza a velocidades bajas (0,05 y 0,5 V/s), puede constatarse un aumento significativo de la Q_{CV} con el aumento de la carga utilizada para la polimerización (Q_{Pol}) (Fig. 4A). Esta relación presenta un

20 comportamiento exponencial cuya ecuación es $Q_{CV} = a(1 - e^{-b \cdot Q_{pol}})$, que se ajusta con $r = 0,998$ en ambos casos. Sin embargo, la máxima Q_{CV} posible (parámetro a) es mayor a 0,05 V/s que a 0,5 V/s (24,4 mC/cm² vs. 11,6 mC/cm², respectivamente), pero para alcanzar la Q_{CV} máxima se requiere una carga de electrosíntesis 2,4 veces mayor cuando la CV se hace a 0,05 V que cuando se hace a 0,5 V/s, según lo refleja el

25 exponente b ($2,127 \times 10^{-3}$ y $5,149 \times 10^{-3}$, respectivamente). Este fenómeno da soporte adicional a la interpretación de que la transferencia de carga en el polímero se limita por un proceso de subdifusión, de manera que a partir de unos valores óptimos de grosor del polímero y de velocidad de cambio de potencial, la carga transferida será menor cuanto mayor sea la velocidad a la que se impone el potencial o cuanto menor

30 sea el grosor del polímero en la superficie.

Por otra parte, en la CV a 0,05 V/s se distinguen dos picos de reducción en -0,65 y -0,4 V, y dos picos de oxidación en -0,6 y -0,2 V (Fig. 4B), que pueden corresponder a la aparición y desaparición de los estados polarón / bipolarón en el polímero, o bien a

procesos redox de zonas del polímero con distintos grados de solvatación, morfología y longitud de conjugación de sus cadenas. También se detecta un tercer proceso de baja intensidad a -0,9 V, pero éste se debe a la reducción de moléculas presentes en el electrolito líquido, porque también ocurre en los electrodos de Ti/Au o de carbono sin recubrimiento polimérico. En los macroelectrodos de Ti/Au, los procesos redox del polímero son más difíciles de identificar a 0,5 V/s (Fig. 4C) debido al incremento de la corriente capacitiva, y están ausentes a 5 y 50 V/s, velocidades en las cuales la Q_{CV} se aproxima a la producida por la superficie de Ti/Au sin recubrimiento, aunque este último fenómeno parece deberse a la distribución anisotrópica de la corriente eléctrica en los electrodos de 100 mm² puesto que no se observa al utilizar microelectrodos. En las Figs. 4B-C también puede observarse que la conjugación covalente de PLL al PEDOT:PSS-co-MA no modifica sustancialmente los fenómenos redox de la superficie ni la transferencia de carga, detectándose solo una ligera disminución de la Q_{CV} (4 a 11 % según la velocidad de barrido). Además, la unión covalente de PLL no altera la estabilidad del PEDOT:PSS-co-MA, siendo igual el porcentaje de pérdida de Q_{CV} en las superficies funcionalizadas y sin funcionalizar. En las pruebas de estabilidad del polímero sobre electrodos de Ti/Au observamos que la Q_{CV} media decrece aproximadamente el 9 % tras 100 ciclos de voltamperometría, pero posteriormente la pérdida se ralentiza y alcanza solo el 20 % a los 500 ciclos. El PEDOT:PSS-co-MA mostró una estabilidad levemente menor sobre las microfibras de carbono, con un porcentaje de pérdida de Q_{CV} del 14 % a los 100 ciclos, que también se lentificaba para alcanzar solo el 24 % a los 500 (Fig. 4D). Por consiguiente, la estabilidad del PEDOT:PSS-co-MA es buena a pesar de usar un dopante con solo 20000 de PM y de realizar la CV con una ventana de potencial amplia (-1,05 y +0,55 V).

25

A diferencia de los macroelectrodos de Ti/Au, en las microfibras de carbono recubiertas de polímero, bien sea PEDOT:PSS-co-MA ó PEDOT:PSS, la Q_{CV} es mayor a 5 y 50 V/s comparada con 0,5 V/s (ANOVA de dos factores $p < 0.001$; Holm-Sidak posttest $p < 0.001$ en ambos casos). Además, la Q_{CV} del PEDOT:PSS-co-MA es mayor que la del PEDOT:PSS a las velocidades de 0,5 y 5 V/s (Holm-Sidak posttest $p < 0.001$ en ambos casos), y a 50 V/s la Q_{CV} de ambos polímeros es la misma. En este último caso alcanza 3,4 mC/cm² y equivale a más de 60 veces la Q_{CV} que produce la fibra de carbono sin recubrimiento polimérico (Fig. 4E-F). A pesar de la similitud en los valores de Q_{CV} entre ambos polímeros a 50 V/s, también existen diferencias entre ellos. Por

30

ejemplo, la Q_{CV} para el PEDOT:PSS aumenta al pasar de 5 a 50 V/s, mientras que la del PEDOT:PSS-co-MA disminuye (Holm-Sidak posttest $p < 0.001$ en ambos casos). Además, el voltamperograma (Fig. 4F) muestra que los procesos redox no son exactamente idénticos en los dos polímeros, siendo la diferencia principal un desplazamiento de los picos de oxidación y de reducción hacia valores de potencial más positivos en el PEDOT:PSS-co-MA, lo cual probablemente se deba a su mayor afinidad por los cationes presentes en el electrolito.

Finalmente, analizamos la respuesta en corriente que ofrecen las microfibras al aplicar pulsos bifásicos con duración de milisegundos (ms), con el fin de conocer mejor su utilidad para fabricar dispositivos de neuroestimulación. La Fig. 5 ejemplifica las densidades de corriente aportadas por las microfibras de carbono recubiertas de PEDOT:PSS ó PEDOT:PSS-co-MA (electrosintetizado a 96 mC/cm^2) durante los pulsos de 1 ms, así como las densidades de carga (promedio de la anódica y la catódica) para pulsos de 1 y 5 ms. El aspecto más importante a resaltar es que las microfibras recubiertas con cualquiera de los dos polímeros producen una densidad de corriente mucho mayor que las microfibras sin recubrir, y además la corriente se mantiene elevada durante todo el pulso mientras que en las microfibras sin recubrimiento cae a 0 alrededor de los 200 μs (Fig. 5A-B). Como consecuencia, la densidad de carga es mucho mayor en presencia del polímero, incrementándose más de 50 veces para los pulsos de 1 ms y más de 175 veces para los pulsos de 5 ms, a 0,5 V. Para los dos polímeros, la densidad de carga aumenta linealmente entre 0,2 y 0,5 V independientemente de la duración del pulso (Fig. 5C). Sin embargo, a pesar del buen comportamiento eléctrico del PEDOT:PSS-co-MA, los picos de corriente y las densidades de carga por pulso que aporta en promedio equivalen al 75 % y al 63 % de las que se obtienen con el PEDOT:PSS, respectivamente (ANOVA $p < 0.0001$ en ambos casos). La cronoamperometría también evidenció una caída más rápida de la corriente tras el pico inicial en el PEDOT:PSS-co-MA, que resulta más prominente durante la fase catódica (Fig. 5B). Al igual que lo observado en la CV, este comportamiento puede ser consecuencia de una diferente afinidad y transporte iónico, y es susceptible de optimización variando las concentraciones y el peso molecular del dopante.

En conjunto, los estudios electroquímicos indican que el PEDOT:PSS-co-MA es un polímero conductor con buenas prestaciones para la fabricación de dispositivos electrobiológicos y neuroprotésicos. Aunque su respuesta en corriente es algo inferior a la del PEDOT:PSS en protocolos de electroestimulación con pulsos de corta
 5 duración, presenta mejor transporte de carga en protocolos de aplicación de voltaje a velocidades lentas y además permite una fácil funcionalización covalente a través de los grupos carboxilo sin perder su estabilidad.

**Ejemplo 6: Funcionalización multimolecular del PEDOT:PSS-co-MA con
 10 moléculas de adhesión celular o factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular**

Para la funcionalización múltiple del polímero conductor se enlazó de forma covalente la primera capa de moléculas en su superficie, con el fin de que no se desprendan cuando se utilice electroestimulación para controlar el comportamiento de las células
 15 neurales. La principal característica de esta primera capa molecular es que tiene mucha afinidad por otras familias de biomoléculas específicas, permitiendo así su unión y presentación como sustrato para la adhesión y crecimiento celular. Aquí se ejemplifican dos complejos moleculares para funcionalizar el PEDOT:PSS-co-MA 1:1 (Fig. 6):

20 1) anticuerpos para unir CAMs (N-Cadherina y L1) en sus formas recombinantes con el fragmento Fc de la IgG humana; o 2) complejos de polielectrolitos autoensamblados (PLL / heparina) a los que se adicionan factores de crecimiento (bFGF / PDGF-AA) y posteriormente proteínas del suero o de la matriz extracelular (ver ejemplo 14). Las CAMs humanas recombinantes quiméricas con el fragmento Fc-IgG se compraron a
 25 R&D Systems (1388-NC y 777-NC), la IgG específica contra el fragmento Fc de la IgG humana, que abreviamos A-HIgG, se obtuvo de Sigma-Aldrich (I2136), el bFGF recombinante humano se compró a Invitrogen (PHG0024), y el PDGF-AA recombinante humano a Peprotech (100-13A).

30 Las CAMs pueden incorporarse a la superficie del polímero de forma directa mediante unión covalente, o bien se enlaza primero el A-HIgG covalentemente y luego se unen las CAMs por inmuno-afinidad. En el segundo caso, se dializa el anticuerpo usando membranas de éster de celulosa con punto de corte de 8 a 10 kDa (Flota-A-Lyzer G2, Spectrum Laboratories, Inc. USA), y posteriormente se disuelve a 100 µg/ml en

tampón TEA 50 mM, pH 8,0, siendo el resto del procedimiento similar al descrito en el ejemplo 3. Aunque los efectos celulares de las CAMs se constataron independientemente de que su unión fuera directa o mediada por A-HlgG, la unión de las proteínas recombinantes mediante el anticuerpo permite orientarlas más
5 apropiadamente y de forma homogénea en la superficie, por lo cual aquí solamente describimos los resultados obtenidos utilizando este procedimiento. Tras la unión del A-HlgG, se aplican sobre la superficie del PEDOT:PSS-co-MA las CAMs recombinantes (5, 10 ó 20 µg/ml en tampón fosfato pH 7,4) a 24 °C. Después de 1 h las superficies se lavan tres veces con tampón y se guardan en el mismo a 4 °C. La
10 unión covalente de PLL al polímero se realiza tal como se ha descrito en los ejemplos 3 y 5. Una vez se ha enlazado la PLL, se aplica una solución de heparina (PM promedio 11750, Sigma-Aldrich) por 4 minutos, disuelta a 2,7 mg/ml en tampón fosfato pH 7,4, seguida de tres lavados en el mismo tampón. Posteriormente se pone en la superficie la solución que contiene bFGF y/o PDGF-AA (ambos a concentración de 1
15 µg/ml en tampón fosfato pH 7,4), durante 1 hora a 24 °C, tras la cual las superficies se lavan tres veces con PBS. A continuación se incuba el polímero por 48 a 72 h a 37 °C en una solución de PBS ó DMEM que contiene suero fetal bovino (SFB, 10 %), suero normal adulto (SNA, 10 %), fibronectina o vitronectina (20 - 40 µg/ml). Esta solución se retira y el polímero se lava con PBS ó medio de cultivo justo antes de plaquear las
20 células disociadas o el explante de tejido neural.

La funcionalización multimolecular del polímero se confirmó mediante reacción de las superficies con anticuerpos contra las biomoléculas y revelado con anticuerpos secundarios fluorescentes. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-N-Cadherina
25 (Sigma C3865, dilución 1:200) hecho en ratón, anti-L1 (Chemicon MAB5272, 1:50) hecho en rata, anti-PDGF-AA humano (Peprotech 500-P46, 1:500) hecho en conejo, anti-bFGF (Millipore 05-118, 1:1000) hecho en ratón, IgG de cabra con Alexa Fluor® 488 anti-IgG de rata (Molecular Probes A11006, 1:500), IgG de cabra con Alexa Fluor® 594 anti-IgG de ratón (Molecular Probes A11005, 1:500), IgG de cabra con Alexa
30 Fluor® 488 anti-IgG de ratón (Molecular Probes A11001, 1:500), e IgG de cabra con Alexa Fluor® 594 anti-IgG de conejo (Molecular Probes A11012, 1:500). Para la inmunotinción se incubaron las superficies por 1 h en una solución de tampón fosfato con 5 % de suero normal de cabra y 0,2 % de tritón, seguidas de incubación por 2 h en la solución de tampón con dos anticuerpos primarios (anti-L1/anti-N-Cadherina ó anti-

bFGF/anti-PDGF-AA) y 0,2 % de tritón, y finalmente 1 h en la solución tampón con los dos anticuerpos secundarios correspondientes. Posteriormente las muestras se montaron en tampón fosfato con glicerol y se analizaron por microscopia confocal tal como se ha descrito en el ejemplo 3. Este procedimiento demostró inequívocamente el éxito en la funcionalización múltiple del PEDOT:PSS-co-MA 1:1 con CAMs o factores de crecimiento (Fig. 7), siendo siempre la fluorescencia en presencia de la molécula diana entre 5 y 10 veces superior al valor de fondo (ANOVA, $p < 0.001$). Además, los resultados mostraron que a las concentraciones de CAMs (10 $\mu\text{g/ml}$) o factores de crecimiento (1 $\mu\text{g/ml}$) utilizados, el polímero al que se ha enlazado previamente A-HlgG ó PLL/Heparina es capaz de unir por lo menos dos ligandos cuando se aplican simultáneamente sobre la superficie. Resulta notorio que las cantidades de L1/N-Cadherina que se unen son aparentemente iguales a las conseguidas cuando se aplica solo un ligando, mientras que la combinación de bFGF / PDGF-AA incrementa su unión en comparación con cada factor aislado (ANOVA $p < 0.001$). La demostración de la unión de proteínas de la matriz extracelular sobre las superficies funcionalizadas con PLL/Heparina/bFGF se describe en el ejemplo 14.

Ejemplo 7: Cultivo, marcaje fluorescente y estudio microscópico de las células neurales disociadas.

Los cultivos de células disociadas se realizaron sobre portaobjetos de vidrio con Ti/Au recubiertos de PEDOT:PSS-co-MA 1:1, los cuales se utilizaron como base de cámaras de poliestireno (11 x 11 x 20 mm de ancho, alto y fondo, respectivamente), sellando los bordes con silicona de uso médico (MED-4210; NuSil, USA). A efectos comparativos se cultivaron células sobre superficies no electroconductoras de vidrio borosilicato hidrolítico grado 1 (Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen, Germany) recubierto con PLL. Previamente al plaqueo de las células, el polímero funcionalizado se incubó por 48 h en DMEM (Sigma-Aldrich) con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies Corporation, USA), a 37 °C y en atmósfera húmeda con 5 % CO_2 , con el fin de acondicionarlas en el ambiente iónico y molecular de los tejidos biológicos. El medio con suero se retiró y la superficie se lavó repetidamente con Neurobasal™ (Life Technologies Corp.) justo antes de introducir las células. En resumen, las células se disociaron a partir de la corteza cerebral de embriones (E18) de rata Wistar utilizando tripsina, DNAsa (Sigma-Aldrich) y pipetas Pasteur pulidas con

fuego, y se plaquearon sobre las superficies de polímero a dos densidades: 25000 células/cm² para estudios generales de adherencia, supervivencia y crecimiento celular; ó 1000 células/cm² para estudios específicos de crecimiento y diferenciación de las neuritas, dendritas y axones. Siempre se utilizó como medio de cultivo

5 Neurobasal™ con suplemento de L-glutamina, B27, penicilina-estreptomicina (Life Technologies Corp.) y gentamicina (Normon, Madrid). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por completo a las 2 h de plaqueadas las células, y la mitad después de 4 días en los casos correspondientes. Los cultivos se fijaron a los dos o cinco días agregando

10 paraformaldehído al medio de cultivo hasta una concentración del 2 % y dejándolo actuar por 12 min. Las cuantificaciones celulares que se presentan se confirmaron en por lo menos tres cultivos diferentes, utilizando un mínimo de cuatro muestras de polímero en cada uno. En los datos de neuronas individuales se promedió un mínimo de 100 células en cada situación experimental.

15

Para la inmunocitoquímica, las células fijadas se incubaron por 1 h en tampón fosfato pH 7,4 con 5 % de suero normal de cabra y 0,2 % de tritón, y posteriormente se lavaron y se incubaron toda la noche a 4 °C en tampón con 0,2 % de tritón y combinaciones de dos de los siguientes anticuerpos: anti-Tau (Sigma-Aldrich T-6402,

20 1:750) hecho en conejo, anti-MAP2 (Sigma-Aldrich M1406, 1:500) hecho en ratón, anti-Vimentina (Neomarkers, MS-129, clone V9, 1:1000) hecho en ratón, anti-Nestina (BD Biosciences 556309, 1:1,500) hecho en ratón, anti-GFAP (Dako Z-0334, 1:500) hecho en conejo, anti-NF (Affinity NA-1297, 1:750) hecho en conejo, o anti-NG2 (Chemicon AB5320, 1:500) hecho en conejo. Al día siguiente se lavaron y se

25 incubaron 1 h a 24 °C en solución tampón con los anticuerpos secundarios: IgG de cabra con Alexa Fluor® 488 anti-IgG de conejo (Molecular Probes A11008, 1:750), e IgG de cabra con Alexa Fluor® 594 anti-IgG de ratón (Molecular Probes A11005, 1:750). Finalmente se tiñeron los núcleos aplicando Hoescht 33342 (Molecular Probes, 2 µg/ml en tampón) por 50 min. Para las cuantificaciones citológicas se tomaron

30 imágenes con alta resolución (2776 x 2074 píxeles) utilizando un sistema de microscopia digital (Olympus DP50) y se combinaron las señales de los distintos fluorocromos. Se fotografiaron sistemáticamente 16 campos radiales en cada muestra del polímero y los recuentos celulares se interpolaron al área total de superficie macroscópica. Para estudiar la localización celular de los fluorocromos se analizaron

las superficies mediante microscopía confocal siguiendo los protocolos descritos en el ejemplo 3 y utilizando un diodo láser de 405 nm para excitación del Hoescht conjuntamente con los láseres para excitación a 488 y 594 nm. Las mediciones de las prolongaciones neuronales se realizaron con el software ImageJ (1.39u, NHI, USA) sobre las imágenes de fluorescencia de los cultivos crecidos a baja densidad y fijados a los 2 días *in vitro* (DIV), según se detalla en el ejemplo 9.

Ejemplo 8. Células neurales disociadas: adhesión, crecimiento y supervivencia sobre el PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL

Se realizaron cultivos a 25000 células/cm² para analizar de forma general el comportamiento celular sobre los materiales electroconductores y el posible éxito de los métodos de funcionalización empleados. El PEDOT:PSS-co-MA sin funcionalizar es muy inhibitorio para el crecimiento de neuronal; algunas células se adhieren pero a las 24 h la mayoría se han retraído y muerto o se han aglomerado (Fig. 8A), y un día más tarde ya no hay células vivas en la superficie. La funcionalización con PLL tiene un efecto positivo muy evidente en la adhesión, crecimiento y supervivencia celular sobre el PEDOT:PSS-co-MA. En este caso, a las 24 h muchas células han comenzado a extender neuritas (Fig. 8B) que continúan su crecimiento y a los 5 DIV se han diferenciado en dendritas y axones, identificables por la tinción inmunocitoquímica para las proteínas MAP2 y Tau, respectivamente (Fig. 8C). La PLL es muy efectiva para promover el crecimiento celular sobre el polímero, independientemente de que se una a la superficie de forma covalente (Fig. 8C) o por electroadsorción (Fig. 8D). Así mismo, la supervivencia neuronal a los 5 DIV fue similar en las dos superficies (27479 ± 2004 células/cm², vs. 25195 ± 5683 células/cm², respectivamente). Los experimentos control arrojan datos muy claros sobre la eficacia de la electroadsorción galvanostática de PLL, ya que sobre las superficies de polímero que se ponen en contacto con la solución de PLL por el mismo tiempo pero sin aplicar corriente eléctrica no se encuentran células vivas (0) a los 5 DIV. Estos resultados ponen de manifiesto la versatilidad del PEDOT:PSS-co-MA para ser biofuncionalizado por reacciones químicas o métodos bioelectroquímicos con el fin de controlar el crecimiento neural.

Ejemplo 9: Efectos sinérgicos de la funcionalización del PEDOT:PSS-co-MA con N-Cadherina y L1 sobre el crecimiento axonal y dendrítico.

También utilizamos cultivos plaqueados a 25000 células/cm² para conocer los efectos generales de la funcionalización del polímero con CAMs. Comenzamos evaluando la unión covalente de A-HIgG con adición de N-Cadherina a 5, 10 y 20 µg/ml, obteniendo excelente adherencia y crecimiento neural en los tres casos. En las Figs. 9A y 9B se muestran imágenes de contraste de fase de las neuronas a las 24 h de cultivo sobre el polímero con N-Cadherina utilizada a 5 y 20 µg/ml, respectivamente. Al compararse visualmente con las células cultivadas sobre el polímero con PLL (Fig. 8B), resulta evidente que desde muy temprano hay un mayor crecimiento de las prolongaciones neuronales al utilizarse N-Cadherina (Fig. 9A-B), pero la densidad celular impide la medición y comparación de las neuritas individuales. Por consiguiente, se decidió emplear cultivos de baja densidad (1000 células/cm²) para medir y comparar el efecto de las diferentes moléculas sobre el crecimiento neuronal.

En los cultivos de baja densidad fijados a 2 DIV por lo menos el 98 % de las células presentaba marcaje intenso para MAP2 en el soma y las neuritas o dendritas, siendo por tanto definidas como neuronas. En esta etapa prácticamente la totalidad de las neuronas había desarrollado prolongaciones, pero alrededor del 30 % de ellas aún no tenía un axón claramente identificable y el marcaje para Tau ocurría en el soma y en todas las extensiones celulares dificultando su diferenciación. Por consiguiente, las prolongaciones neuronales se distinguieron por criterios morfológicos y la etapa de desarrollo de la célula se clasificó de 1 a 5 siguiendo la escala propuesta por Dotti et al. (1988, *J. Neurosci.*; 8: 1454-1468); en la cual 1 equivale a la formación de lamelipodios, 2 al desarrollo de neuritas, 3 a la formación y extensión del axón, 4 al crecimiento de las dendritas, y 5 a la ramificación de las prolongaciones y maduración de la neurona. En las etapas 1 y 2 se definió como neurita toda prolongación celular >10 µm. En las etapas más avanzadas, se denominó axón a la neurita >50 µm y que medía por lo menos el doble que las otras neuritas, y las últimas se consideraban dendritas si eran >10 µm. Para el momento de su fijación, más del 97 % de las células se encontraba en etapas 2 y 3 independientemente del sustrato de cultivo. El pequeño porcentaje restante correspondía a células en etapa 1, y no se clasificó ninguna en etapa 4. Para comparar los efectos de la funcionalización del polímero sobre el crecimiento neuronal se cuantificaron los siguientes parámetros:

Células en etapa 2:

1. Número de neuritas.

2. Longitud promedio de las neuritas.

Células en etapa 3:

1. Número de dendritas.
2. Longitud de las dendritas.
- 5 3. Longitud del axón primario.
4. Número de colaterales axonales secundarias y terciarias.
5. Longitud del árbol axonal total.

En la Fig. 9C-F se muestran ejemplos representativos del crecimiento de las neuronas cultivadas a baja densidad por 48 h sobre PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con A-HlgG + N-Cadherina (C), L1 (D), o ambas CAMs (E), siempre a 10 µg/ml. Para comparación, en la Fig. 9F se presenta un ejemplo del crecimiento sobre el polímero funcionalizado con PLL enlazada covalentemente. Las células se han procesado con inmunocitoquímica para Tau y MAP2, y los núcleos se han marcado con Hoescht. En estas imágenes resulta evidente que el polímero funcionalizado con CAMs incrementa el crecimiento neuronal con respecto al polímero funcionalizado con PLL. También puede observarse que el efecto de las dos CAMs es diferente, de manera que la N-Cadherina promueve el crecimiento tanto de dendritas como de axones, mientras que la L1 aumenta de forma notoria el crecimiento axonal pero inhibe el desarrollo dendrítico. Las mediciones del crecimiento se muestran pormenorizadamente en la Fig. 10. Comparando cada una de los siete parámetros de crecimiento por separado (ANOVA de un factor), siempre se encontraron diferencias entre la funcionalización del polímero con PLL ó con CAMs ($p<0.0001$). La funcionalización con N-Cadherina aumenta de forma significativa el crecimiento neural en todos los parámetros evaluados (Fig. 10A-G), es decir, su efecto tiene lugar independientemente del estadio celular y aumenta tanto la longitud de las prolongaciones como su número. Sin embargo, el efecto de mayor magnitud relativa ocurre en el número de neuritas y dendritas, que se duplica respecto a la polilisina (posttest de Holm Sidak, HS, $p<0.001$) y se triplica respecto a la L1 (posttest de HS, $p<0.0001$). Así mismo, las dendritas casi doblan su longitud sobre N-Cadherina (posttest de HS, $p<0.001$), mientras que parámetros como la longitud el axón primario o del árbol axonal total se incrementan en 29 % (posttest de HS, $p<0.05$) y 40 % (posttest de HS, $p<0.001$), respectivamente. Por su parte, la L1 disminuye aproximadamente a la mitad el número de neuritas y dendritas respecto a la PLL (posttest de HS, $p<0.001$), pero triplica el número de

colaterales axonales y duplica la longitud del árbol axonal total (postest de HS, $p < 0.001$), aunque la longitud del axón primario solo se incrementa en 50 % (postest de HS, $p < 0.001$). En las superficies con funcionalización doble, la presencia de L1 no disminuye el aumento de neuritas y dendritas ni el incremento en la longitud de las dendritas que produce la N-Cadherina (Fig. 10 A, C, D); mientras que produce un aumento adicional del 27 % en la longitud del axón primario con respecto a la acción de la N-Cadherina sola (postest de HS, $p < 0.01$). Por el contrario, resulta interesante que la N-Cadherina sí neutraliza parcialmente la acción de la L1 sobre la longitud de las neuritas (postest de HS, $p < 0.0001$) y el número de colaterales axonales (postest de HS, $p < 0.0001$), aunque el árbol axonal total no se afecta significativamente. En resumen, la combinación de las dos moléculas sobre el polímero consigue un efecto sinérgico sobre el crecimiento de las neuronas, que desarrollan dendritas y axones más numerosos y más largos. Para confirmar que los efectos de la acción conjunta de las CAMs son específicos y no se deben simplemente al aumento de moléculas sobre la superficie, comparamos el crecimiento neuronal sobre el polímero funcionalizado con L1 ó N-Cadherina aplicadas a 10 $\mu\text{g/ml}$ (igual que en el experimento anterior), frente al que ocurre en el polímero funcionalizado simultáneamente con las dos CAMs pero aplicadas a 5 $\mu\text{g/ml}$. A pesar de disminuir la concentración de CAMs a la mitad obtuvimos la misma sinergia sobre el crecimiento neural, indicando una acción combinada de los mecanismos de señalización específicos de cada molécula. También es importante resaltar que el crecimiento neural sobre los sustratos de PEDOT:PSS-co-MA funcionalizados con PLL es similar al que ocurre sobre vidrio recubierto con PLL en aspectos como el número y longitud de neuritas y dendritas, pero es un 50 % superior en cuanto al crecimiento del axón primario (Fig. 10E, HS-postest $p < 0.01$) y del árbol axonal total (Fig. 10G, $p < 0.001$).

Ejemplo 10: Estudio de la migración de las células neurales sobre PEDOT:PSS-co-MA utilizando videomicroscopía

Registramos la evolución de los cultivos celulares de baja densidad mediante un sistema de videomicroscopía time-lapse (Olympus, Japan) con el fin de evaluar la influencia de la funcionalización del PEDOT:PSS-co-MA sobre la migración celular. Utilizamos sustratos de vidrio con Ti/Au recubiertos de polímero que fueron suficientemente transparentes para permitir la visualización de las células con luz transmitida. El seguimiento comenzó a las 2 h de plaquear las células y se tomaron las

fotografías cada 20 min. por un total de 48 h. Se empleó un objetivo 10x para contraste de fase, y se adquirieron 7 planos separados 1,5 μm arriba y abajo del plano focal. La posición de las células se rastreó con el software ImageJ. Las cuantificaciones se realizaron sobre un total de 70 a 100 células de cada situación experimental, definiendo migración como el desplazamiento del cuerpo celular más de 30 μm . Para la comparación estadística del porcentaje de células migratorias se utilizó la prueba Chi cuadrado (χ^2), mientras que la distancia recorrida y la velocidad de migración se compararon mediante ANOVA.

- 10 Como puede observarse en la Fig. 11, hay una diferencia ostensible en la migración celular sobre el PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con las distintas moléculas. Las neuronas no migran en absoluto sobre el polímero que tiene PLL, pero el 77 % de ellas lo hace si se coloca N-Cadherina y el 36 % si se pone L1 (χ^2 , $p < 0.001$; Fig. 11A), siendo también significativa la diferencia entre N-Cadherina y L1 (χ^2 , $p < 0.001$).
- 15 Además de que migran menos células sobre L1 que sobre N-Cadherina, la distancia recorrida por las células sobre L1 alcanza tan solo el 30 % del valor obtenido en la N-Cadherina (ANOVA, $p < 0.0001$). En comparación con la L1 sola, la funcionalización de la superficie con las dos CAMs eleva tanto el porcentaje de migración (χ^2 , $p < 0.001$) como la distancia recorrida (ANOVA, $p < 0.001$), aunque no llega al 100 % de los
- 20 valores producidos por la N-Cadherina sola (diferencia con $p < 0.05$ en ambos casos). Es importante resaltar que la migración celular sobre el PEDOT:PSS-co-MA con N-Cadherina es un fenómeno potente, mostrando velocidad máxima de $110 \pm 11 \mu\text{m} / \text{h}$, mientras que en el polímero con L1 alcanza $45 \pm 7 \mu\text{m} / \text{h}$ ($p < 0.0001$).

25 **Ejemplo 11: Cámaras de cultivo celular con microfibras electroconductoras**

- Los cultivos organotípicos se realizaron en cámaras de cultivo diseñadas para poder evaluar el comportamiento de las células vivas sobre las microfibras electroconductoras. En la presente invención incluimos distintos modelos de cámaras de cultivo que comparten las siguientes características: 1) pueden estar compuestas
- 30 por una o varias celdas que contienen microfibras; 2) las microfibras pueden tener igual o diferente funcionalización; 3) las microfibras usualmente se colocan alineadas al eje mayor de la celda, separadas entre sí por distancias que pueden oscilar desde micras a milímetros en función de las necesidades del cultivo; 4) las microfibras están en el fondo ó levantadas por una distancia que puede oscilar desde unas pocas micras

hasta 1 mm o más; 5) los extremos de las microfibras terminan en contactos eléctricos que están ubicados fuera del pozo de cultivo celular y a los cuales puede conectarse una fuente de corriente eléctrica o voltaje; 6) el material del fondo es delgado, transparente y de características ópticas apropiadas para distintos tipos de microscopía; 7) las celdas se adhieren al fondo de la cámara mediante cualquier material que selle apropiadamente, que sea un buen aislante eléctrico y que no tenga componentes que se oxiden o reduzcan con facilidad; 8) las paredes de las celdas pueden ser de cualquier material inerte apropiado para cultivos celulares, por ejemplo poliestireno o polipropileno; y 9) las celdas de cada cámara pueden estar aisladas en su totalidad, o comunicarse a través de microfibras y un espacio alrededor de ellas que permita el paso de elementos celulares de un lado al otro.

En la Fig. 12 se ejemplifican cuatro tipos de cámaras de cultivo celular con las características comunes mencionadas anteriormente y variaciones en la geometría, disposición y comunicación entre las celdas para satisfacer distintas necesidades. El diseño 12A es el más simple, constando de fibras completamente paralelas en celdas que no se comunican. En el diseño 12B las fibras también están paralelas, pero un tabique divide la celda en dos cavidades simétricas comunicadas por las microfibras y un espacio alrededor. La función del tabique es crear dos compartimentos que contienen medios de cultivo diferentes, o bien el mismo medio pero con distintas moléculas adicionadas; y las microfibras dan soporte para el crecimiento celular de manera que los axones o las células migratorias pasan de un compartimento al otro a través del espacio que los comunica. El espacio también puede servir para crear gradientes de difusión de moléculas de un lado al otro. En el diseño 12B consideramos el modelo I, en el cual el espacio que comunica las hemiceldas es una franja larga, con altura equivalente a una microfibra; y el modelo II en el que existe un espacio circular de diámetro variable alrededor de la microfibra, que permite aprovechar mejor su superficie a la vez que restringir todo lo posible la comunicación entre las hemiceldas. Finalmente, el diseño 12C tiene simetría radial, y consiste en un compartimento central que se comunica con varios periféricos por medio de las microfibras y un pequeño espacio alrededor. El tejido bajo estudio se coloca en el compartimento central y los elementos celulares que se originan en él pueden escoger para crecer las diferentes microfibras. Una vez pasan al compartimento periférico, pueden tratarse de forma selectiva con distintas moléculas. Alternativamente, pueden colocarse distintos

tejidos o células en las celdas periféricas y comparar su respuesta frente a un factor común aplicado en el compartimiento central. Para los cultivos organotípicos del sistema nervioso que se describen en los ejemplos siguientes utilizamos cámaras de cultivo con el diseño que se presenta en la Fig. 12A. En este caso, las microfibras se colocan paralelas entre sí a una distancia aproximada de 700 μm del fondo de la celda. El fondo es de vidrio borosilicato de 100 μm de grosor y permite la visualización directa de las fibras y las células mediante diferentes técnicas de microscopía, y las celdas son de poliestireno (11 x 11 x 20 mm de ancho, alto y fondo, respectivamente), adheridas al vidrio mediante silicona de uso médico (MED-4210; NuSil, USA). Las microfibras reposan sobre un soporte de 700 μm de alto que tiene contactos de grafito, los cuales están completamente aislados del interior de la celda. El PEDOT:PSS-co-MA se electrosintetiza sobre las microfibras una vez fabricadas las cámaras de cultivo celular, aplicando 96 mC/cm^2 y siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 1. La caracterización morfológica y electroquímica de las microfibras con polímero se presenta en los ejemplos 2 y 4. La funcionalización y acondicionamiento de las microfibras para el cultivo organotípico se realiza según los protocolos desarrollados en los ejemplos 3, 5 y 6.

Ejemplo 12. Cultivos organotípicos de sistema nervioso central y periférico: preparación, inmunohistoquímica y técnicas de microscopía para su estudio

Para los cultivos organotípicos utilizamos explantes de la corteza cerebral de rata o ganglios de la raíz dorsal, ambos obtenidos a partir de embriones (E18) de rata Wistar, y cultivados en cámaras con microfibras (Fig. 12A) o cubreobjetos de vidrio borosilicato. Los tejidos siempre se extraen de animales en anestesia profunda tras recibir una dosis eutanásica de pentobarbital, siguiendo los protocolos aprobados por el comité de ética de bienestar animal. Después de retirar las meninges, la corteza cerebral se separa del resto del cerebro y se secciona en fragmentos (explantes) de 1,5 mm de largo por 0,5 mm de ancho, en solución de Hanks con calcio y magnesio (Sigma-Aldrich). A continuación los explantes se colocan sobre las microfibras con 100 μl de medio de cultivo (NeurobasalTM con suplementos, ejemplo 7) y se incuban a 37 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 . Transcurridas 4 h, cuando se han adherido suficientemente a las microfibras, se les adiciona medio de cultivo hasta completar 1 ml por pozo y se incuban de nuevo por 5 ó 10 días, en el segundo caso reemplazándose la mitad del medio de cultivo cada dos días a partir del quinto. Los

ganglios de la raíz dorsal se extraen y se colocan sobre las microfibras sin seccionarlos, y por lo demás el procedimiento es igual al utilizado para cultivar la corteza cerebral. Los explantes se fijan a los 5 ó 10 días adicionando paraformaldehído al medio de cultivo hasta una concentración del 2 % y dejándolos en esta solución por 12 min., y se procesan para inmunohistoquímica y marcaje nuclear con Hoescht utilizando los mismos protocolos y anticuerpos primarios (MAP2, Tau, NF, GFAP, NG2, Vimentina y Nestina) y secundarios que se detallan en el ejemplo 7, y usando además los siguientes: anti-PDGFR α (Thermo Scientific RB1691, 1:100) hecho en conejo, anti-N-Cadherina (Sigma-Aldrich C3865, 1:400) hecho en ratón, anti-NG2 (R&D Systems FAB2585F, 1:25) hecho en ratón, anti-NF200 (Sigma-Aldrich N0142, 1:500) hecho en ratón, anti-receptor p75 del NGF (Millipore AB1554, 1:500) hecho en conejo, anti-PDGFR α (Abcam AB32570, 1:100) hecho en conejo, y anti- β -tubulina isoforma III (Sigma-Aldrich T8660, 1:400) hecho en ratón. En todos los procedimientos se incluyen controles del procedimiento sin los anticuerpos primarios.

15

Tras el procesamiento inmunohistoquímico, los explantes fueron escaneados en su posición original sobre las microfibras mediante un microscopio confocal con escáner resonante (SP5, Leica Microsystems CMS GMBH, Germany), equipado con láseres de Argón y HeNe, y también con un diodo láser de 405 nm para excitación del Hoescht. Por lo general se usó el objetivo de 20x y secciones a diferentes planos focales cada 1,5 μ m, aplicando zoom de 3,5 previamente a la adquisición de la imagen cuando resultaba necesario para una mejor visualización. El software Leica LAS AF Lite permitió adquirir automáticamente la serie de imágenes que abarcaban todo el explante y unir las en un mosaico para proceder a cuantificar el comportamiento celular. Se analizaron tres parámetros: 1) extensión del crecimiento axonal sobre las microfibras, con base en la presencia de prolongaciones neuronales positivas para Tau y Neurofilamento; 2) distancia de migración de precursores gliales sobre las microfibras, considerada como el punto más alejado del explante en el que se observaban núcleos celulares marcados con Hoescht y rodeados por citoplasma positivo para Vimentina o Nestina, o por membrana citoplasmática fluorescente para NG2 o PDGFR α (explantes de corteza cerebral) o para el receptor p75 del NGF (ganglios de la raíz dorsal); y 3) Número de precursores gliales presentes en la microfibra, identificados igual que en el punto anterior. Una vez obtenidas las imágenes para las cuantificaciones celulares, los explantes y las microfibras se

30

retiraron de las cámaras de cultivo y se montaron en una mezcla de tampón fosfato y glicerol para proceder a su observación en el microscopio confocal con el objetivo de 63x, aplicando zoom de 2,8 y adquiriendo secciones cada 0,4 μm para diferenciar apropiadamente las estructuras y estudiar con precisión la localización de los marcajes celulares. Todos los datos que se presentan se confirmaron en por lo menos 3 cultivos diferentes, cuantificando las respuestas celulares en por lo menos 15 microfibras de cada situación experimental por cultivo. Además del microscopio confocal, se utilizó el microscopio electrónico de barrido para estudiar el comportamiento y las interacciones celulares sobre las microfibras. Para esto, se fijaron los cultivos con glutaraldehído al 3 % en tampón fosfato (30 min.), se lavaron tres veces con tampón y se fijaron de nuevo en tetróxido de osmio al 1 % (una hora) y ácido tánico al 1 % (30 min.), y luego se lavaron con agua destilada. Posteriormente se deshidrataron usando concentraciones crecientes de etanol (10 min. cada una), etanol con hexametildisilazano (1:1, 10 min.), y hexametildisilazano 100 % (2 min.). Finalmente se secaron al aire, se recubrieron con Au mediante sputtering a 25 mA por 2 min., y se visualizaron a 2 - 3 kV utilizando el detector TLD a una distancia de trabajo de 2 mm.

Ejemplo 13. Crecimiento axonal y migración celular sobre microfibras que tienen PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con A-HlgG / CAMs (L1 ó N-Cadherina)

La funcionalización de las microfibras con L1 ó N-Cadherina indujo un profuso crecimiento axonal sobre ellas (Fig. 13), siendo 4 veces superior al que se obtuvo utilizando PLL (ANOVA de un factor, $p < 0.001$). El promedio de crecimiento axonal sobre las microfibras funcionalizadas con PLL fue $710 \pm 82 \mu\text{m}$ a los 5 DIV, mientras que alcanzó 2777 ± 163 y $3037 \pm 317 \mu\text{m}$ sobre las microfibras funcionalizadas con L1 ó N-Cadherina, respectivamente. Estos datos confirman los resultados obtenidos en los cultivos de células disociadas sobre las superficies poliméricas (Ejemplo 9). En los cultivos organotípicos no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento axonal en relación con la funcionalización con L1 ó N-Cadherina, ni a los 5 DIV ni a los 10 DIV; pero en ambos casos se constató un incremento del 50 % en la longitud axonal entre los 5 y 10 DIV (ANOVA de dos factores $p < 0.001$, HS-postest $p < 0.05$; Fig. 13A). A los 5 DIV también se observaron progenitores gliales (células Vimentina⁺) en las microfibras, aunque la distancia que recorrieron (Fig. 13B) fue tan solo alrededor del 25 % de la distancia de crecimiento axonal y el número de células fue bajo (Fig. 13C) y. Sin embargo, en este aspecto se observaron diferencias según la CAM puesta

en la superficie de la microfibras (ANOVA de dos factores $p < 0.001$), de manera que el número de células y la distancia a la que se encontraban disminuyó considerablemente entre los 5 y los 10 DIV cuando se usó L1 (HS-posttest $p < 0.01$), mientras que en las microfibras con N-Cadherina la disminución del número de células no fue tan marcada entre los 5 y 10 DIV y además la distancia de migración celular se incrementó un 50 % (HS-posttest $p < 0.05$). Los estudios mediante microscopía confocal permitieron obtener información adicional respecto al crecimiento neural sobre las microfibras. En la zona proximal (más cercana al explante) se observaba un gran número de axones formando gruesos fascículos, en los que se entremezclan progenitores gliales. En la parte distal (más alejada del explante), solo se encontraban axones individuales que terminan en conos de crecimiento pequeños y con pocas ramificaciones, indicativos de crecimiento axonal rápido. La apariencia de los conos de crecimiento axonal fue bastante similar en las microfibras funcionalizadas con L1 ó N-Cadherina. Por otra parte, a los 10 DIV también se observan algunas neuronas (células MAP2⁺) que habían migrado en la parte proximal de la microfibras, así como dendritas (prolongaciones MAP2⁺) en crecimiento (Fig. 14). En concordancia con los hallazgos descritos anteriormente, en las microfibras con L1 las neuronas y las dendritas se encontraban entremezcladas con los axones, indicando que no habían migrado sobre la propia microfibras, mientras que en las microfibras con N-Cadherina se encontraban en contacto con la microfibras (Fig. 14). En este último caso, las neuronas eran fusiformes y las dendritas formaban fascículos.

Ejemplo 14. Estimulación del crecimiento axonal por precursores gliales que migran sobre las superficies y microfibras funcionalizadas con PLL / heparina / bFGF / proteínas de la matriz extracelular

Tras haber constatado que las microfibras funcionalizadas con L1 y/o N-Cadherina promueven un extenso crecimiento axonal de forma directa sobre el PEDOT:PSS-co-MA pero muy escasa migración de precursores gliales, nos preguntamos si sería posible inducir el crecimiento axonal de forma indirecta a través de la migración de precursores gliales sobre sustratos que en sí mismos no son permisivos para la extensión de los axones. En investigaciones anteriores (*Collazos-Castro et al., 2010, Biomaterials 31: 9244-9255*), observamos que el PEDOT:PSS funcionalizado con PLL/Heparina/bFGF inhibe el crecimiento de las neuronas disociadas de la corteza cerebral pero induce una extensa proliferación y migración de precursores gliales que

expresan vimentina, nestina, y/o NG2. Por consiguiente, inicialmente investigamos si este fenómeno ocurre sobre las superficies planas recubiertas con PEDOT:PSS-co-MA y PLL/Heparina/bFGF, constatando que estas composiciones también inhiben el crecimiento axonal de las neuronas disociadas y estimulan la proliferación y migración de progenitores gliales. Adicionalmente, observamos que las neuronas, aunque inicialmente retraen sus neuritas, posteriormente reinician el crecimiento sobre los progenitores gliales que proliferan y migran. A continuación evaluamos estas respuestas celulares sobre las microfibras de carbono recubiertas de PEDOT:PSS-co-MA, en donde el crecimiento neural dirigido facilita la cuantificación de los procesos de interés. Estos estudios se llevaron a cabo con explantes de la corteza cerebral usando la metodología descrita en el ejemplo 12. En resumen, los resultados demuestran que las microfibras funcionalizadas son un sistema potente para inducir la proliferación y migración dirigida de los progenitores gliales, y a través de ellos estimular el crecimiento axonal. Sin embargo, el potencial pleno del sistema solo se consigue cuando la funcionalización de la superficie con PLL/Heparina/bFGF se complementa con al menos una molécula de la matriz extracelular. Esta última puede unirse a las superficies a partir de soluciones de la molécula purificada o a partir del suero de sujetos en etapa fetal o adulta.

En primer lugar, la Fig. 15 ilustra el fenómeno anteriormente mencionado y su relevancia en términos cuantitativos. Cuando las microfibras tienen solo PLL en la superficie (sin ningún otro tipo de acondicionamiento), existe algo de crecimiento axonal (~700 μm en 5 días), pero este ocurre directamente sobre la microfibra y no se debe a la migración de precursores, que solo se desplazan alrededor de 150 μm y además en números muy bajos (Fig. 15 A-B). Cuando se pone PLL/Heparina/bFGF sobre la microfibra se incrementa significativamente la migración de precursores gliales tanto en distancia (~500 μm) como en número de células (Fig. 15 A-B), pero la distancia de crecimiento axonal se limita a la distancia recorrida por las células migratorias indicando que tal complejo molecular no estimula directamente el crecimiento axonal. De hecho, en este caso los axones se observan siempre en contacto con las células migratorias, asunto que se tratará más adelante. Un resultado sorprendente fue que el número y la distancia de migración de los precursores gliales, así como el crecimiento axonal, se multiplicaron más de tres veces cuando las microfibras funcionalizadas con PLL/Heparina/bFGF se incubaron por 48 h en medio

de cultivo con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Fig. 15 A-B). El medio se retiró y las microfibras se lavaron varias veces antes de introducir los explantes, de manera que los efectos se debieron a que ciertas moléculas presentes en el FBS se unen a la superficie de las microfibras. Cuando en la funcionalización de la superficie se omitió el bFGF pero se puso FBS hubo un incremento en la proliferación y migración de
 5 precursores gliales en comparación con la PLL sola, aunque el crecimiento axonal no fue superior al obtenido sobre PLL. Es decir, las moléculas del suero unidas a la superficie por sí mismas aumentan la proliferación y migración de los precursores gliales, y se obtiene un efecto sinérgico muy potente cuando la superficie tiene bFGF y
 10 moléculas del suero.

En la Fig. 16 se proporcionan detalles de las interacciones entre las células y los axones sobre las microfibras. En la punta de crecimiento siempre hay al menos una célula fusiforme que lidera el proceso de migración y a la cual los axones acompañan en íntimo contacto (Fig. 16A), frecuentemente trepándose sobre ella (Fig. 16B) o
 15 siguiéndola (Fig. 16C). El estudio mediante microscopía electrónica de barrido muestra que la célula de la punta tiene morfología predominantemente bipolar (Fig. 16D), aunque en muchas ocasiones también emiten pequeñas prolongaciones citoplasmáticas laterales. Por su parte, las células que se encuentran atrás del frente de crecimiento se entremezclan con los axones y las prolongaciones de otras células y
 20 también presentan morfología bipolar (Fig. 16E) o bien desarrollan múltiples prolongaciones (Fig. 16F). Al visualizar las células con mayor resolución puede observarse que sus prolongaciones citoplasmáticas abrazan o envuelven parcialmente a los axones y a los conos de crecimiento axonal (Fig. 17A). De esta manera, los
 25 axones y sus terminaciones tienen zonas de contacto con la superficie polimérica y también con la membrana de las células migratorias. Estas observaciones sobre la morfología y la capacidad de envolver axones apuntan a que las células que migran e inducen el crecimiento axonal sobre las microfibras son progenitores gliales similares a las células NG2 del sistema nervioso central (*Nishiyama et al., Nature Rev Neurosci*
 30 *2009; 10:9-21*), también conocidos como polidendrocitos, precursores de oligodendrocitos o células O2A. En soporte de esta idea observamos que, tal como se ha descrito para las células NG2 del SNC, las células que migran sobre las microfibras a partir de los explantes de corteza cerebral expresan NG2 y PDGFR α en la membrana citoplasmática (Fig. 17 B-C). Además, las células migratorias sobre las

microfibras también expresan Nestina y Vimentina, que son marcadores de
precursores de oligodendrocitos proliferantes (*Almazán et al., Microsc Res Tech 2001;*
52:753-765). Para confirmar que el crecimiento axonal sobre las microfibras es
inducido por los precursores gliales, aplicamos AraC (3 μ M) a los explantes con el fin
5 de inhibir la división celular. Los resultados obtenidos con el AraC fueron muy claros,
ya que en los explantes que crecían sobre PEDOT:PSS-co-MA funcionalizado con PLL
/ Heparina / bFGF / FBS esencialmente no habían células sobre las microfibras y
concomitantemente se eliminó el crecimiento axonal. Como situación control utilizamos
microfibras funcionalizadas con PLL solamente ó con A-HlgG / N-Cadherina ó L1, en
10 donde los axones crecen directamente sobre la superficie electroconductora. En este
caso, el tratamiento con AraC 3 μ M no disminuyó significativamente el crecimiento
axonal. También realizamos el experimento contrario, es decir, eliminamos los axones
para evaluar si las células continuaban migrando en su ausencia o por el contrario
desaparecían. Para tal efecto cortamos la microfibra en la porción proximal del
15 explante, lo que axotomizó todas las neuronas que extendían su axón sobre la
microfibra y eliminó por completo las prolongaciones axonales presentes en la parte
distal de la misma, dejando allí las células que ya habían migrado. A pesar de que ya
no tenían contacto con los axones, las células continuaron migrando por todo el
periodo de tiempo evaluado (10 días). En síntesis, estos experimentos demostraron de
20 forma inequívoca que el crecimiento axonal sobre las microfibras funcionalizadas con
PLL / Heparina / bFGF / FBS es dependiente de la proliferación y migración de
precursores gliales y no al contrario.

A continuación investigamos algunas de las moléculas presentes en el suero que
25 pueden unirse al polímero conductor funcionalizado con PLL / Heparina / bFGF e
inducir la proliferación y migración de las células NG2. Mediante estos experimentos
esperábamos encontrar formas de completar la funcionalización de la superficie sin
tener que utilizar suero, ya que este es un producto de origen animal y además tiene
composición variable, lo que lo hace no deseable para la elaboración de dispositivos
30 implantables de uso humano. En primer lugar, evaluamos si la capacidad para
promover el crecimiento neural en las microfibras es exclusiva del suero bovino fetal, o
también se consigue utilizando suero de animales adultos. Los procedimientos fueron
iguales a los descritos anteriormente excepto que se reemplazó el FBS por suero de
rata normal (NRS, Sigma-Aldrich) en la última etapa de funcionalización de las

microfibras. Sorprendentemente, el tratamiento de las microfibras con NRS duplicó la migración celular, el crecimiento axonal y el número de precursores obtenidos con el FBS (Fig. 18 A, B). Es bien sabido que el suero contiene cantidades grandes de dos moléculas de la matriz extracelular, como son la fibronectina (FN) y la vitronectina (VN). Sin embargo, sus concentraciones son muy diferentes en el FBS en comparación con el NRS. La actividad promotora de la adherencia celular a superficies tratadas con FBS se debe esencialmente a la VN, que en el FBS tiene concentraciones de 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ (Hayman et al., *Exp Cell Res* 1985; 160: 245-258), mientras que la concentración de FN es alrededor de 10 veces menor (entre 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$; Hayman et al., *J Cell Biol.* 1979; 83: 255-259). Por su parte, el NRS tiene aproximadamente 400 $\mu\text{g/ml}$ de FN (Sochorová et al., *Physiol Bohemoslov* 1983; 32: 481-485) y cantidades similares de VN. Por consiguiente, en los protocolos de funcionalización con FBS al 10 % estamos incubando las superficies con VN a concentración $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ y FN a solo 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$; mientras que con el NRS al 10 % tanto la VN como la FN están a concentraciones $\geq 20 \mu\text{g/ml}$, y la unión de las dos moléculas a la microfibra funcionalizada con PLL / Heparina / bFGF explicaría que se duplique la proliferación y migración celular y el crecimiento axonal al funcionalizar las superficies con NRS. Con este raciocinio, evaluamos el efecto de funcionalizar las microfibras (PEDOT:PSS-co-MA con PLL/Heparina/bFGF) usando como etapa final VN ó FN purificadas (20 $\mu\text{g/ml}$) en vez de suero. Ambas proteínas produjeron un excelente crecimiento neural en términos de migración de precursores gliales y crecimiento axonal sobre las microfibras, siendo superior al obtenido con FBS (Fig. 18 A-B). El crecimiento neural fue todavía mayor al usar las proteínas a 40 $\mu\text{g/ml}$ y al combinarlas. Para verificar que las proteínas de la matriz extracelular efectivamente se unen al polímero conductor funcionalizado con PLL/Heparina/bFGF y que la FN puede ser responsable del mayor crecimiento neural al utilizar NRS, incubamos las superficies en medio de cultivo (DMEM) con fibronectina (2, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$), FBS (10 %) ó NRS (10 %) y las procesamos para inmunotinción con un anticuerpo monoclonal anti-fibronectina (BD Biosciences 610078, 1:250). Este anticuerpo se detectó con otro anticuerpo marcado con Alexa Fluor® 488. Se adquirieron imágenes RGB de la superficie en el microscopio confocal (63x) con área de 61241 μm^2 (247,47 x 247,47 μm). Los colores se disociaron y el componente verde se transformó a escala de grises con el fin de estimar el área cubierta con fibronectina. Para esto, se realizó un perfil de intensidad de la señal obtenida de los controles negativos con el fin de

estimar el umbral de fluorescencia (60 u.a) a partir del cual consideramos positiva la presencia de la molécula, y se determinó el área con intensidad superior al umbral. Mediante este método estimamos que aproximadamente el 0,4 % de la superficie polimérica se cubre con fibronectina cuando la superficie se pone en contacto con
 5 DMEM + 20 µg/ml de la proteína, y el resultado es bastante similar al obtenido con NRS. Como lo esperábamos, la incubación en medio con SFB ó con FN a 2 µg/ml no dio señal detectable de FN unida a la superficie polimérica (Fig. 18C).

En la Fig. 19 se muestran mosaicos contruidos a partir de las imágenes de
 10 microscopía confocal que ilustran el crecimiento neural de forma comparativa en las superficies con distintos tipos de funcionalización. Finalmente, resulta relevante mencionar que aunque la funcionalización con NRS, VN ó FN aumentó la migración y proliferación de los precursores gliales sobre la microfibra en comparación con el FBS, los precursores en cualquier caso fueron positivos para NG2 y PDGFRα y sus
 15 interacciones con los axones no se modificaron sustancialmente, existiendo siempre numerosos axones que alcanzaban la célula de la punta (Fig. 20). Además, al igual que en las microfibras funcionalizadas con FBS, la eliminación de los precursores con AraC abolió el crecimiento axonal en las superficies con NRS, FN ó VN.

REIVINDICACIONES

1. Material biofuncionalizado que comprende:
 - a) un soporte que se selecciona de entre materiales de carbono, vidrio, plástico, metales o sus óxidos, metaloides o sus óxidos, polímeros, geles, productos derivados de la matriz extracelular, o cualquiera de sus combinaciones.
 - b) un polímero electroconductor dopado con PSS-co-MA y unido al soporte de (a),
 - c) al menos una molécula con actividad biológica unida a la superficie polimérica de forma directa o a través de al menos una molécula puente.
2. Material según la reivindicación anterior donde el soporte se selecciona de entre Au, Si, Pt, Ir, Ti o sus óxidos, composites o aleaciones.
3. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el soporte es una microfibra con diámetro entre 2 y 15 μm .
4. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el soporte presenta nano o micro estructura.
5. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el polímero electroconductor se selecciona de entre poli(3,4-etilenedioxitiofeno), polipirrol o polianilina.
6. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la molécula con actividad biológica se selecciona de entre moléculas de adhesión celular, moléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, gangliósidos, proteínas, péptidos, factores guía para los axones o dendritas o cualquiera de sus combinaciones.
7. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la molécula puente se selecciona de entre polipéptidos, aminoácidos, péptidos, polisacáridos, anticuerpos, o cualquiera de sus combinaciones.
8. Material según las reivindicaciones anteriores donde la molécula puente o la molécula con actividad biológica se unen al polímero electroconductor mediante adsorción espontánea, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas o enlaces covalentes.
9. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la molécula con actividad biológica se une al polímero electroconductor a través de al menos dos tipos diferentes de moléculas puente.

10. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la molécula puente es polilisina.
11. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la molécula con actividad biológica es un complejo de heparina o heparán sulfato y un factor de crecimiento.
12. Material según la reivindicación 11 donde el factor de crecimiento se selecciona de entre bFGF, PFGF-AA o combinaciones de ambos.
13. Material según la reivindicación 12 que adicionalmente comprende una molécula de la matriz extracelular unida al complejo molecular heparina o heparán sulfato / factor de crecimiento.
14. Material según la reivindicación anterior donde la molécula de la matriz extracelular se selecciona de entre fibronectina o derivados, vitronectina o derivados o combinaciones de las mismas.
15. Material según la reivindicación 13 donde la molécula de la matriz extracelular se adsorbe sobre la superficie a partir del suero fetal o adulto.
16. Material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la molécula puente es un anticuerpo.
17. Material según la reivindicación 16 donde la molécula puente es IgG.
18. Material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 ó 16-17 donde la molécula con actividad biológica es una molécula de adhesión celular que se selecciona de la familia de las inmunoglobulinas, cadherinas, integrinas, o selectinas.
19. Material según la reivindicación 18 donde la molécula de adhesión celular es N-cadherina, L1 ó combinaciones de ellas.
20. Procedimiento de obtención de un material biofuncionalizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 que comprende las siguientes etapas:
 - a) Síntesis de un polímero electroconductor dopado con PSS-co-MA sobre un soporte que se selecciona de entre materiales de carbono, vidrio, plástico, metales o sus óxidos, metaloides o sus óxidos, polímeros, geles, productos derivados de la matriz extracelular, o combinaciones de estos materiales.
 - b) Funcionalización del polímero electroconductor mediante adsorción espontánea, electroadsorción o unión covalente.
 - c) Unión directa a la superficie del polímero funcionalizado en la etapa (b) de al menos un tipo de molécula con actividad biológica o unión indirecta de

dicha molécula con actividad biológica a través de al menos una molécula puente.

21. Uso del material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la fabricación de dispositivos para inducir el crecimiento neural y la reparación del sistema nervioso.
22. Uso según la reivindicación 21 donde el dispositivo es una cámara de cultivo celular.
23. Uso según la reivindicación 21 donde el dispositivo es un implante.
24. Uso del material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la fabricación de electrodos que se incorporan en neuroprótesis para electroestimulación del sistema nervioso.
25. Método para inducir el crecimiento neural y la reparación del sistema nervioso que comprende poner en contacto tejido del sistema nervioso con el material biofuncionalizado según la reivindicación 1 para promover la proliferación, diferenciación y/o migración de precursores gliales y que a su vez ellos estimulen el crecimiento de los axones.
26. Cámara de cultivo celular que comprende una base (1) sobre la que se encuentra dispuesto un material en forma de microfibras electroconductoras (2), las cuales están unidas en al menos uno de sus extremos a un contacto eléctrico (3), y que comprende además una celda (4) abierta superior e inferiormente y dispuesta sobre la base (1), en cuyo interior quedan parcialmente contenidas las microfibras.
27. Cámara según la reivindicación anterior donde el material en forma de microfibras (2) es el material biofuncionalizado según la reivindicación 1.
28. Cámara según la reivindicación 26 caracterizada porque la celda (4) es prismática y porque las microfibras (2) están dispuestas sobre la base (1) de forma paralela.
29. Cámara según la reivindicación 28 caracterizada porque la celda (4) además comprende al menos un tabique separador (6) dispuesto transversalmente a la dirección longitudinal de las microfibras (2).
30. Cámara según la reivindicación 29 caracterizada porque el tabique separador (6) no apoya sobre la base definiendo una ranura para el paso de las microfibras (2) y de los elementos celulares que crezcan sobre ellas.
31. Cámara según la reivindicación 29 caracterizada porque el tabique separador (6) comprende unos orificios para el paso de las microfibras (2) y de los elementos celulares que crezcan sobre ellas.

32. Cámara según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31 caracterizada porque comprende además unos soportes (5) dispuestos en dos lados opuestos de la base (1).
- 5 33. Cámara según la reivindicación 26 caracterizada porque la celda (4) es cilíndrica y porque las microfibras (2) están dispuestas sobre la base (1) de forma radial.
34. Cámara según la reivindicación 33 caracterizada porque la celda además comprende un anillo interior (7), estando dispuestos al menos dos tabiques separadores (8) en dirección radial entre la celda (4) y dicho anillo interior (7).
- 10 35. Cámara según la reivindicación 34 caracterizada porque el anillo interior tiene una ranura o un agujero para el paso de la microfibra y de los elementos celulares que crecen sobre ella.
36. Implante que comprende el material biofuncionalizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

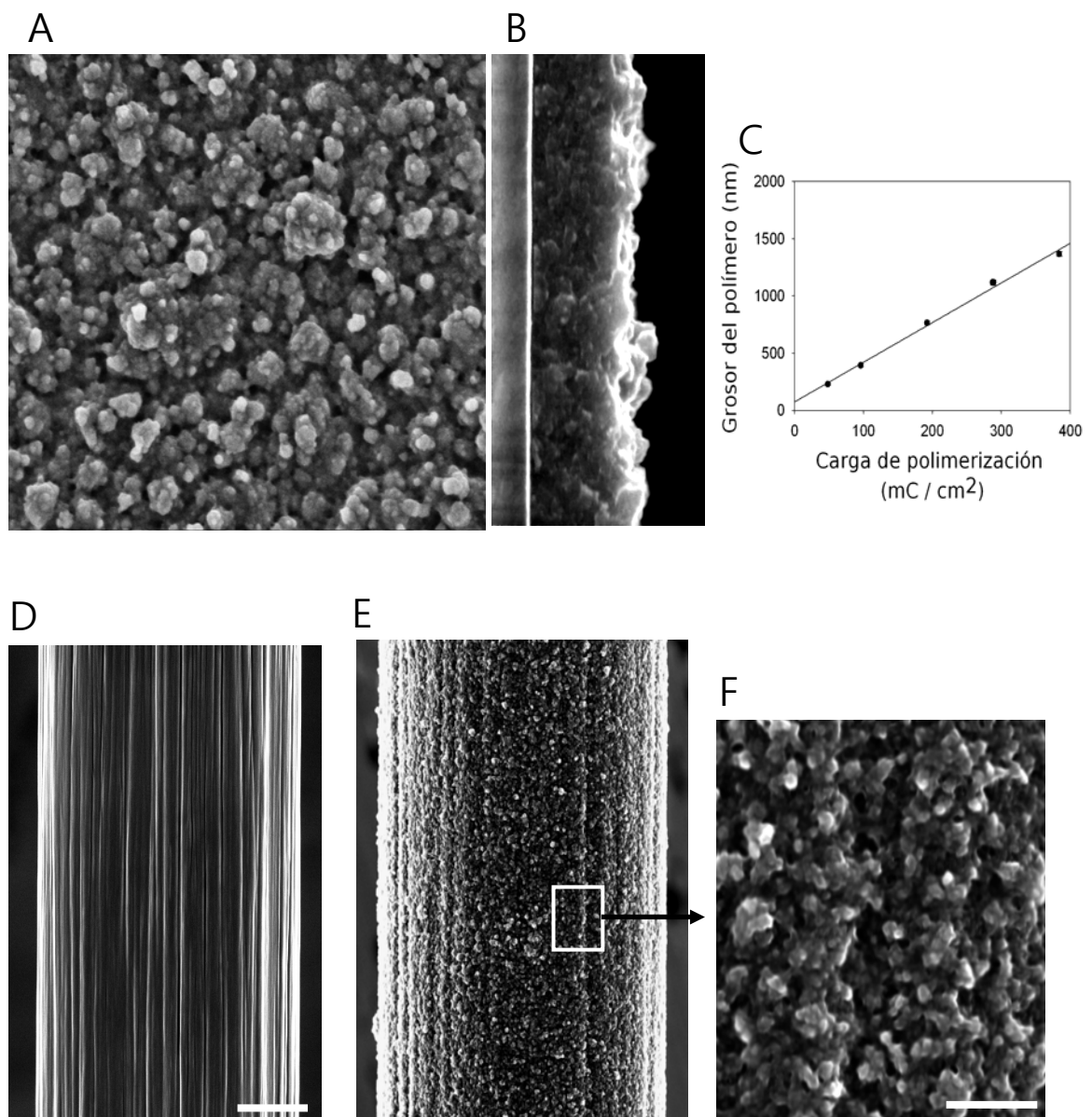


FIG. 1

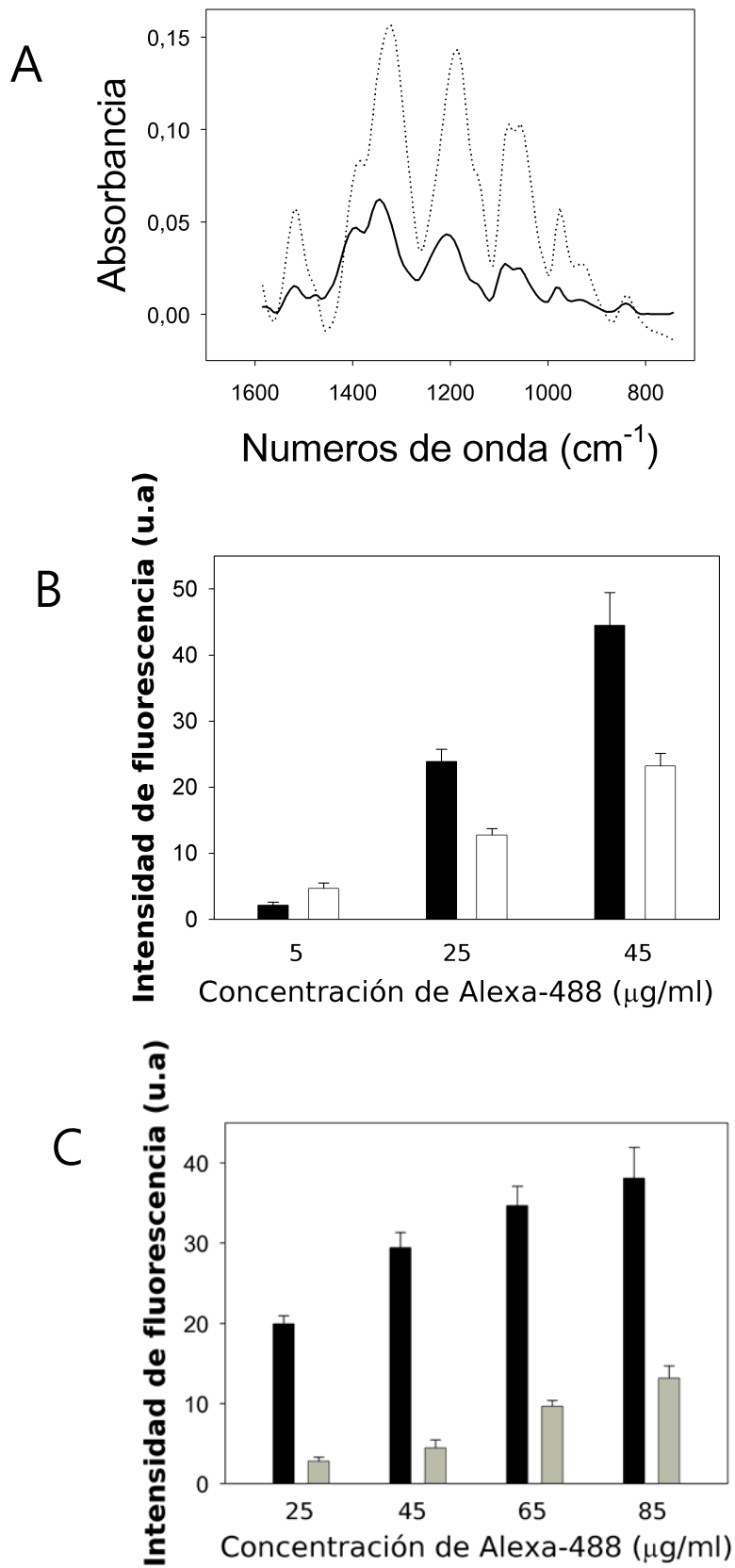


FIG. 2

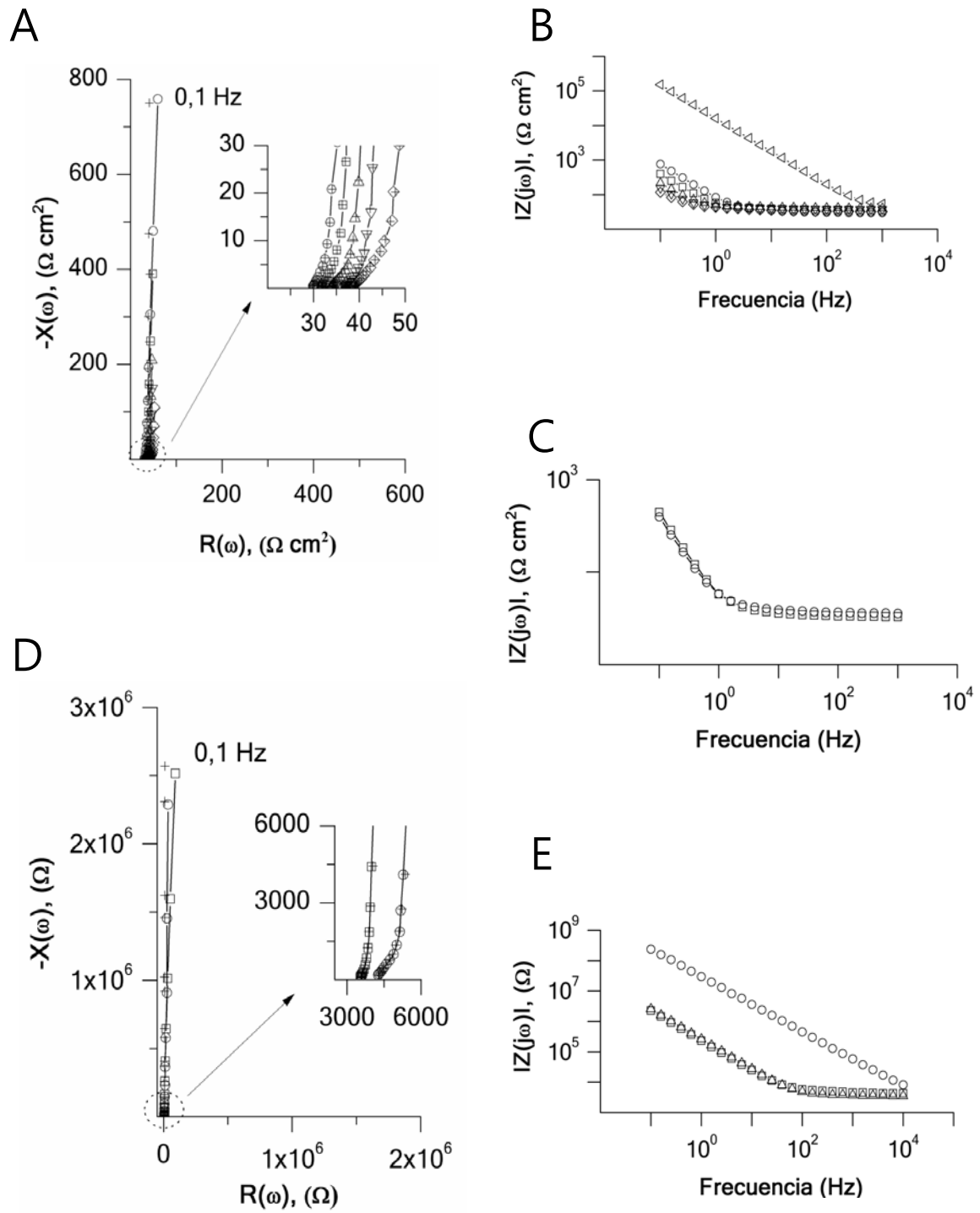


FIG. 3

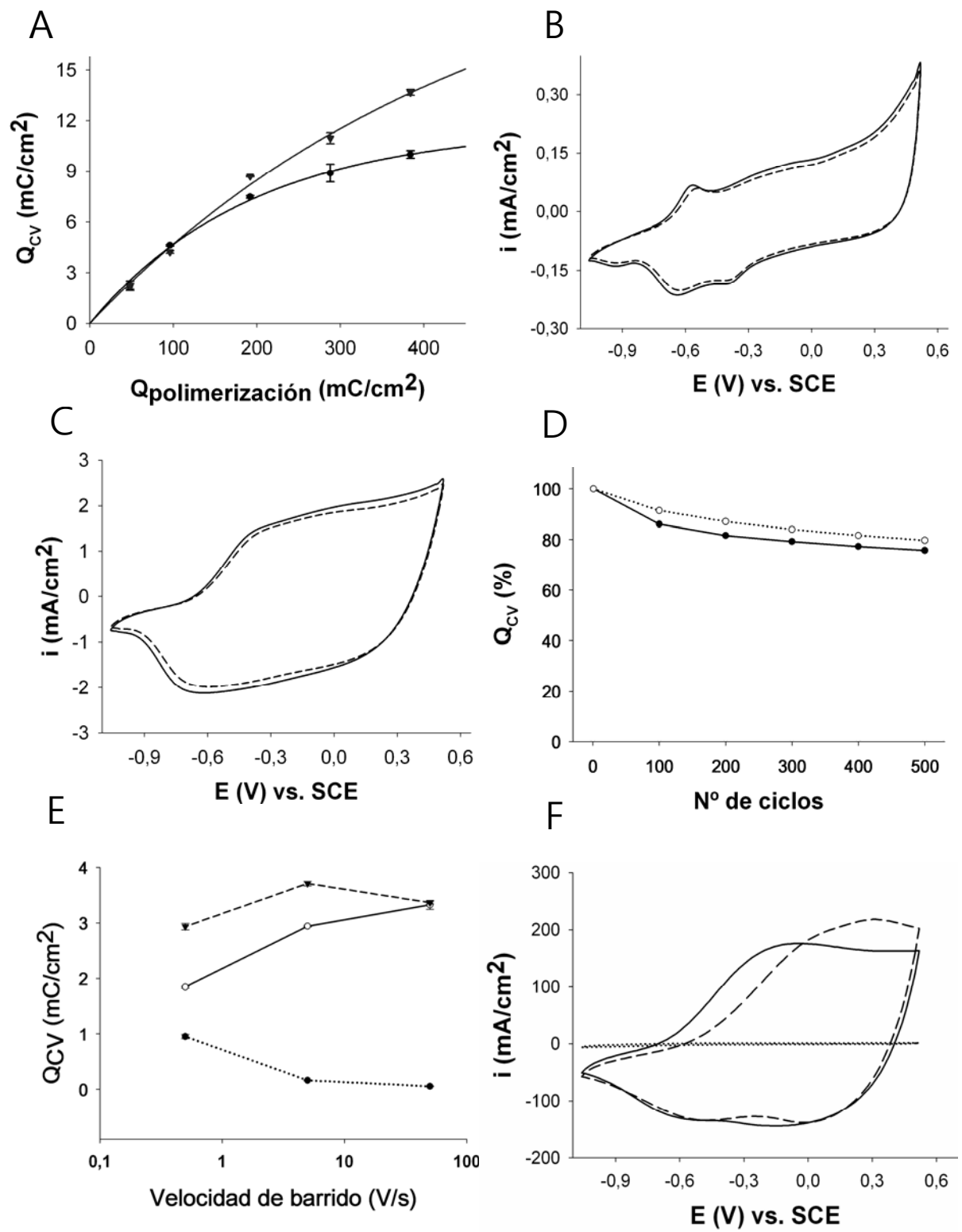


FIG. 4

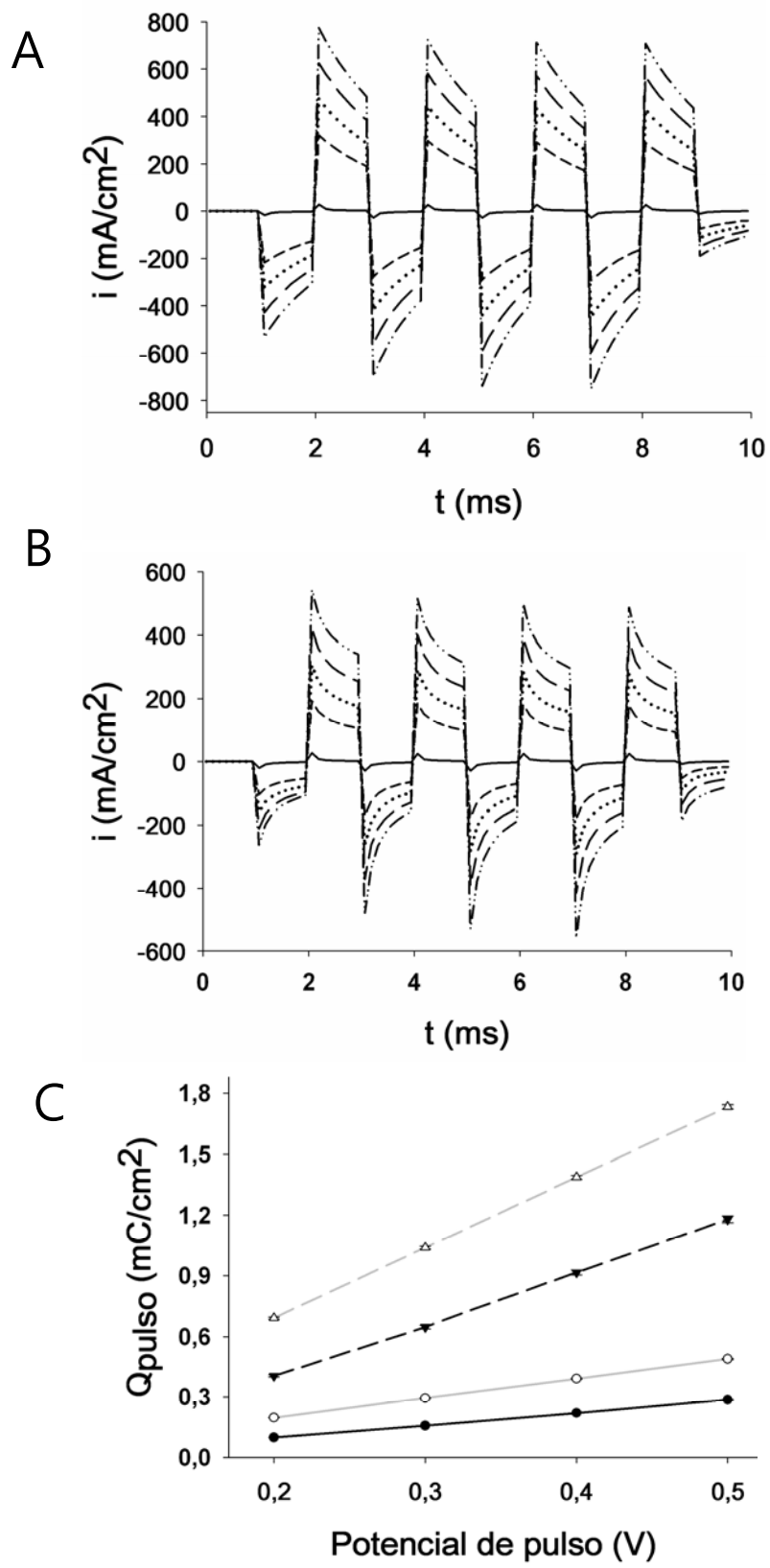


FIG. 5

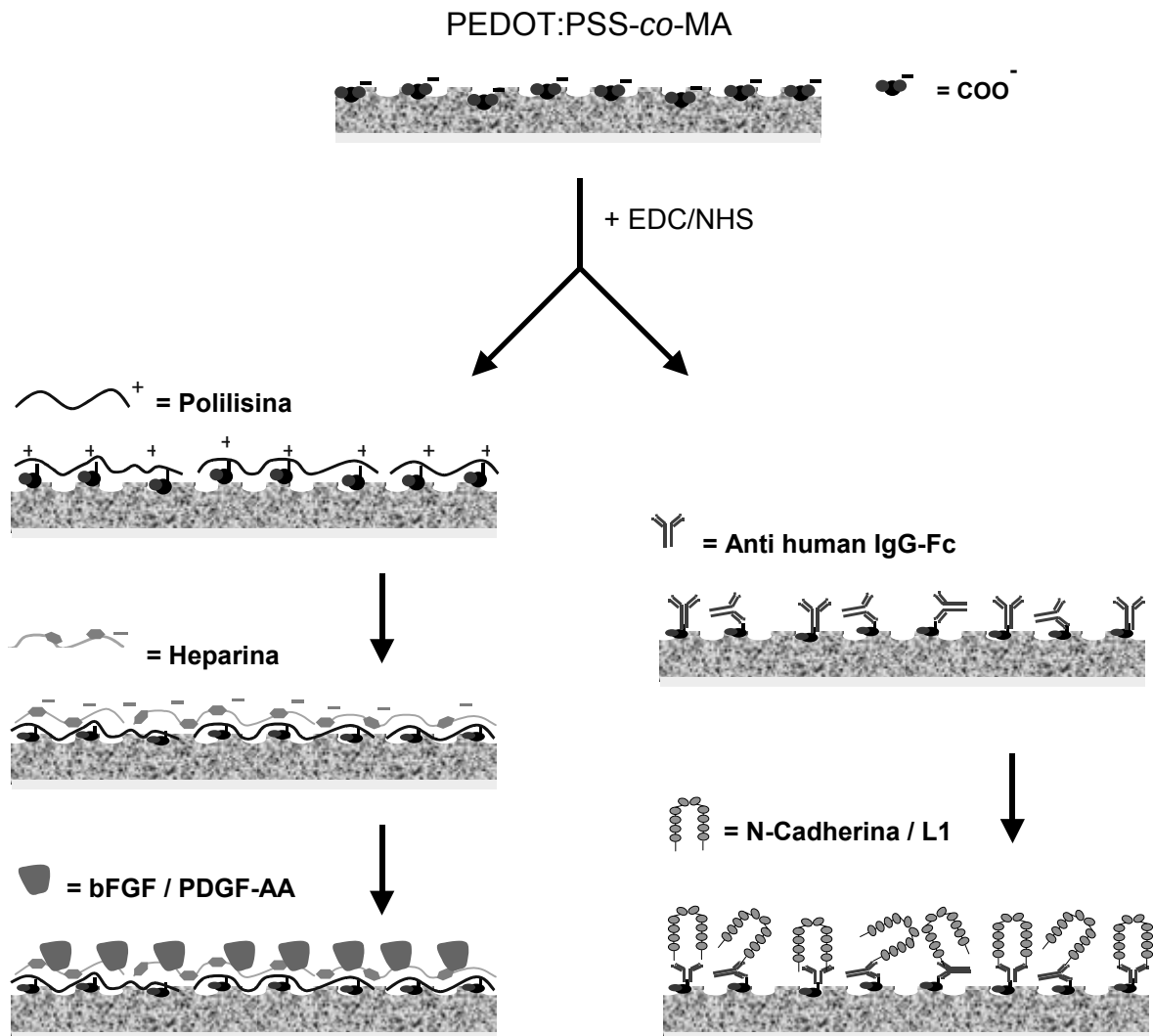


FIG. 6

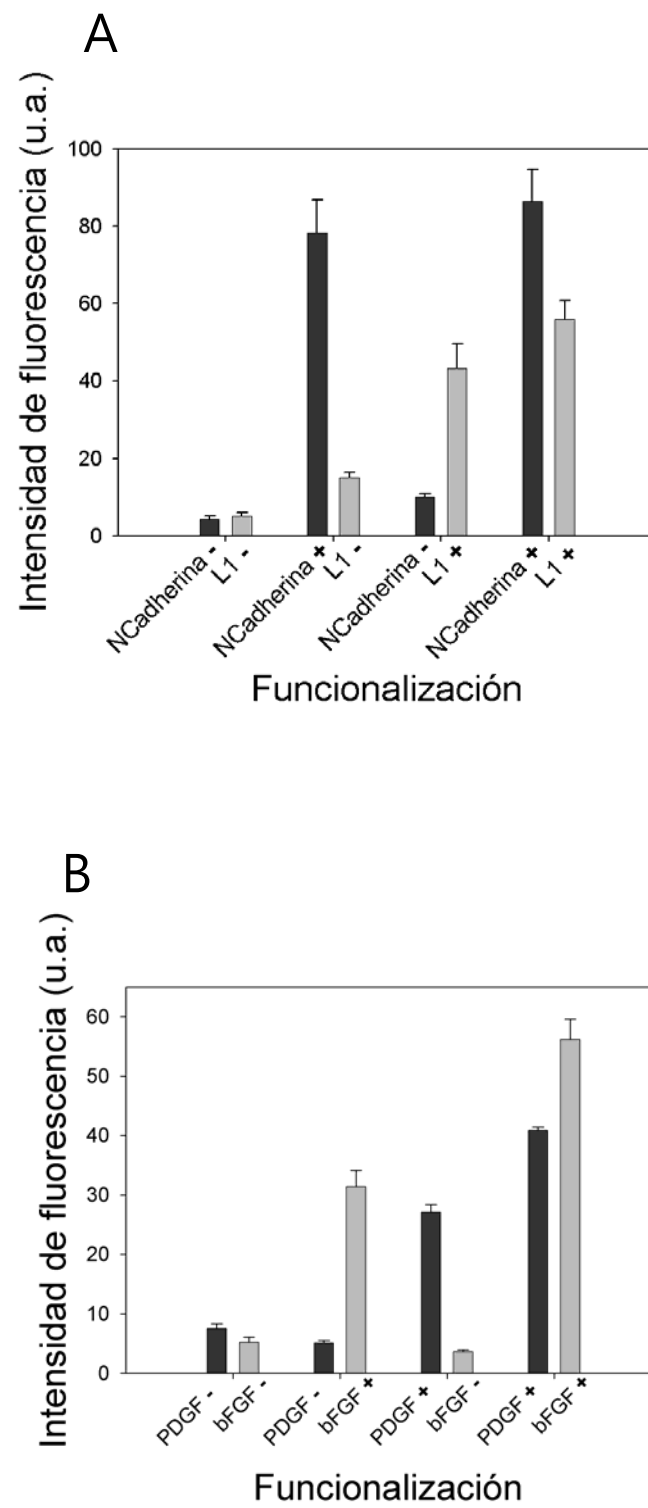


FIG. 7

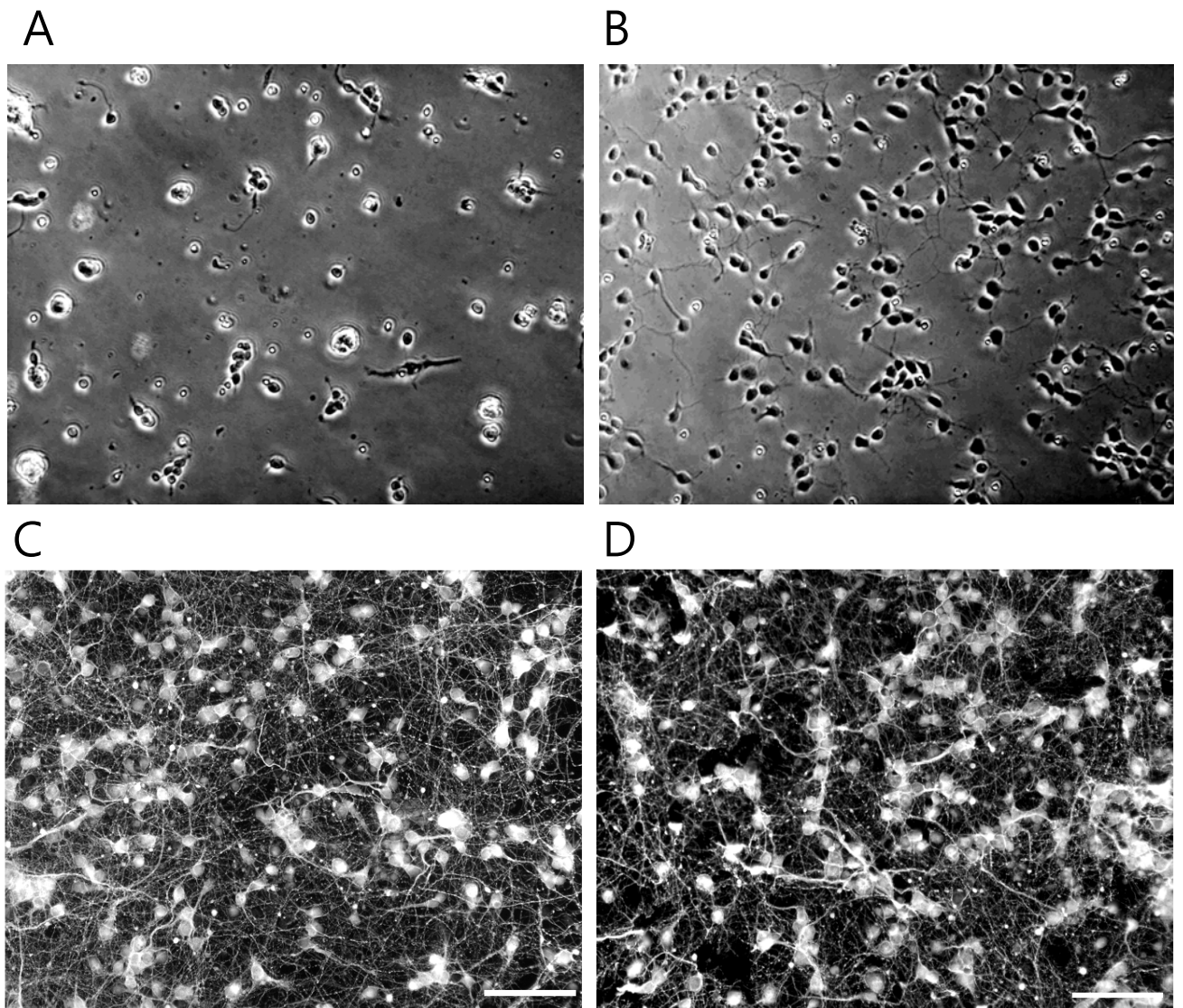


FIG. 8

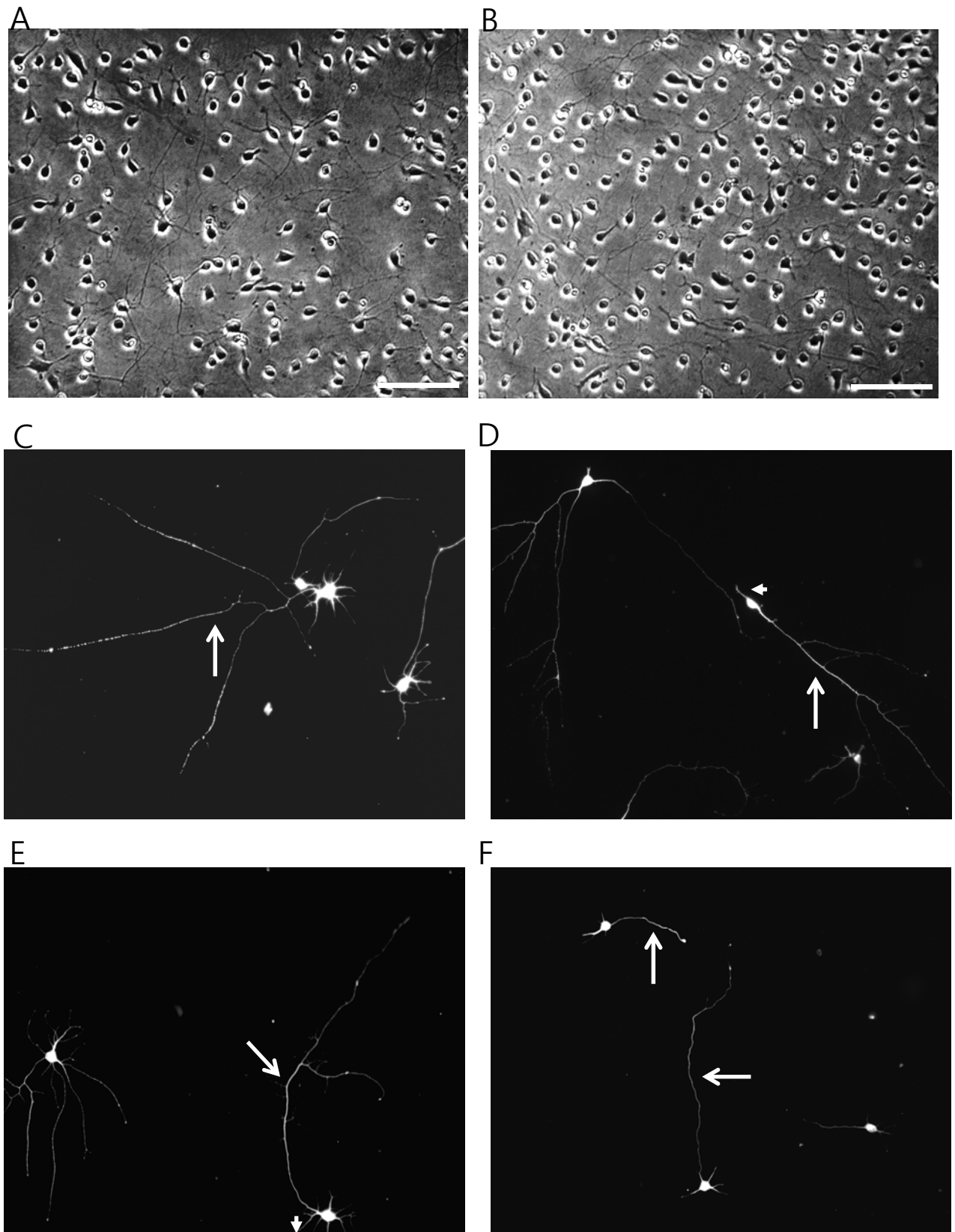


FIG. 9

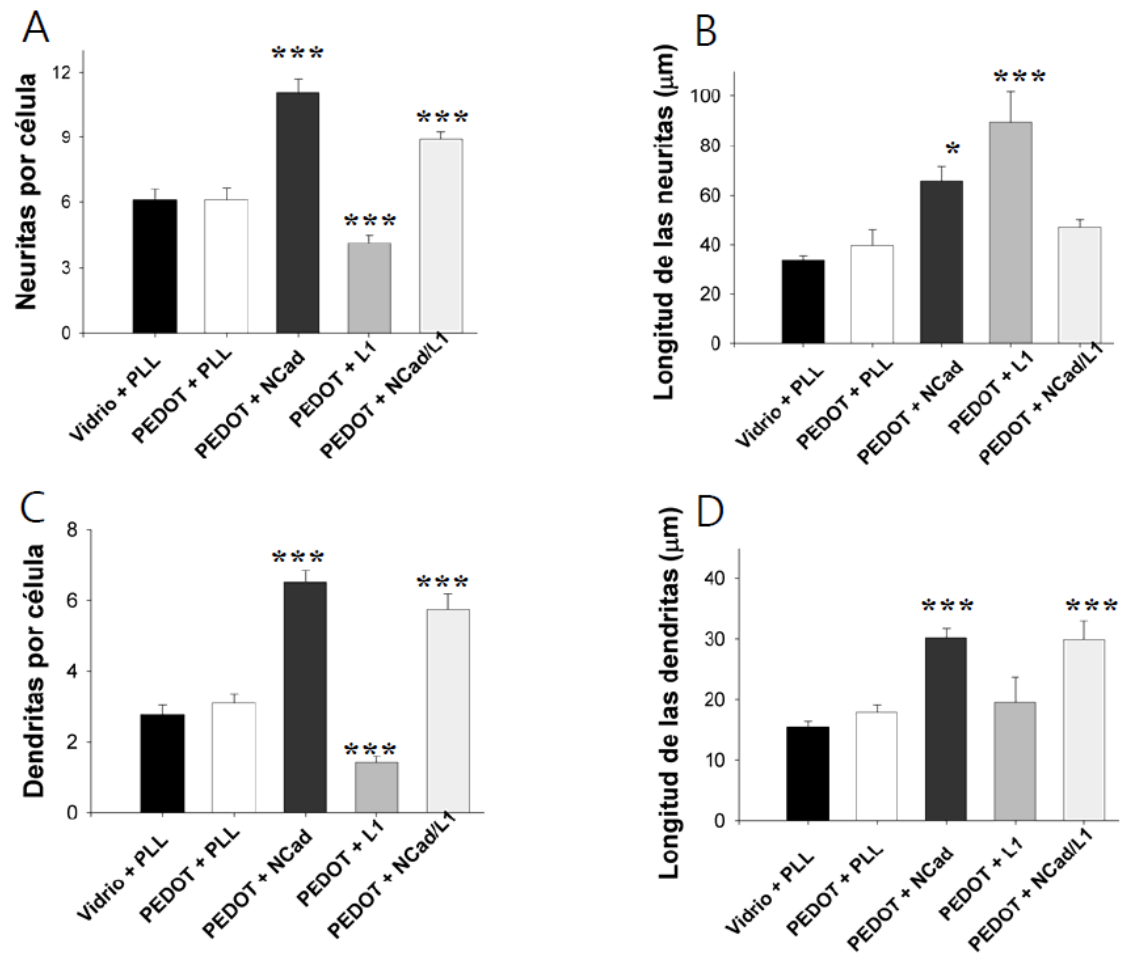


FIG. 10

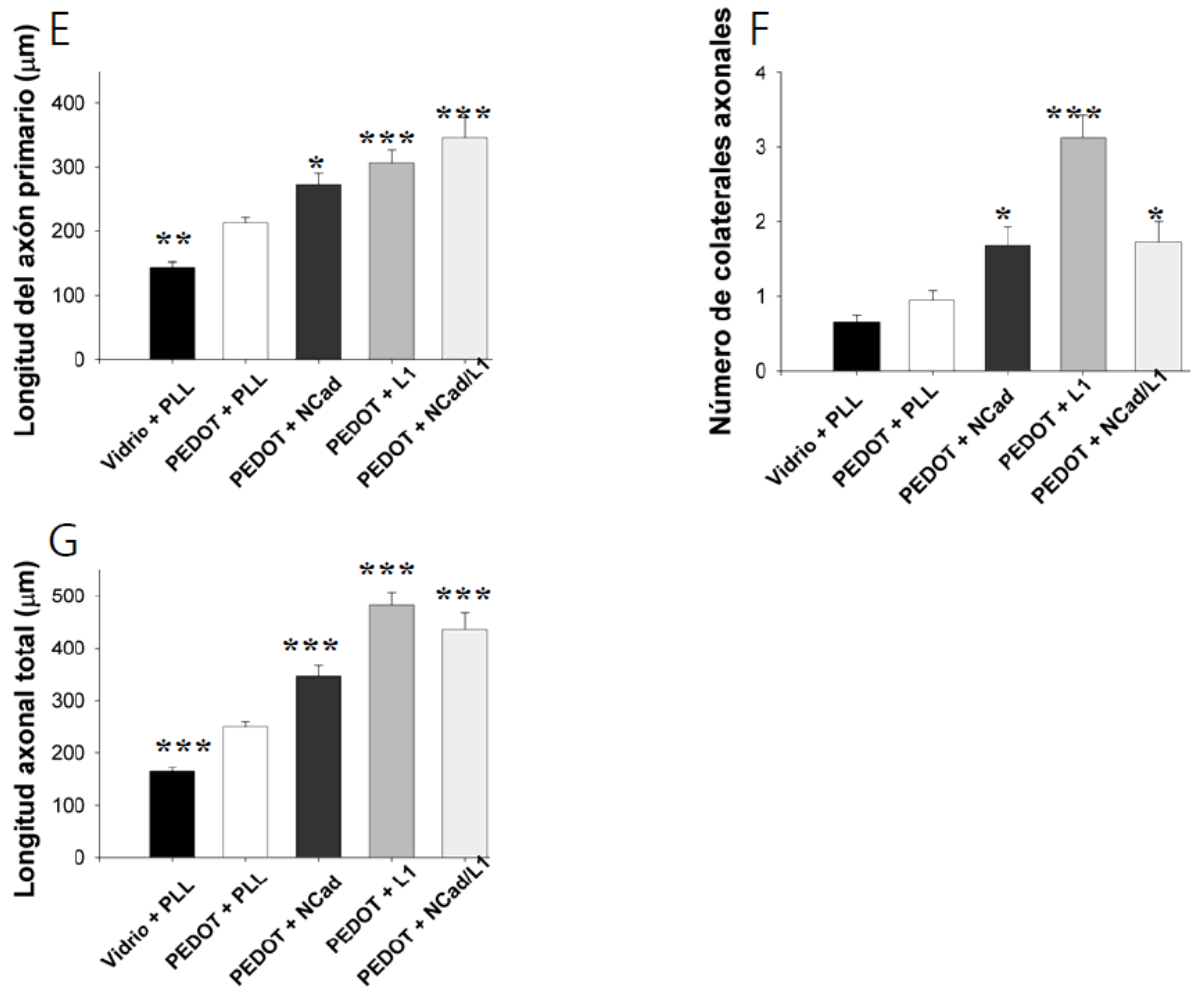


FIG. 10 (cont.)

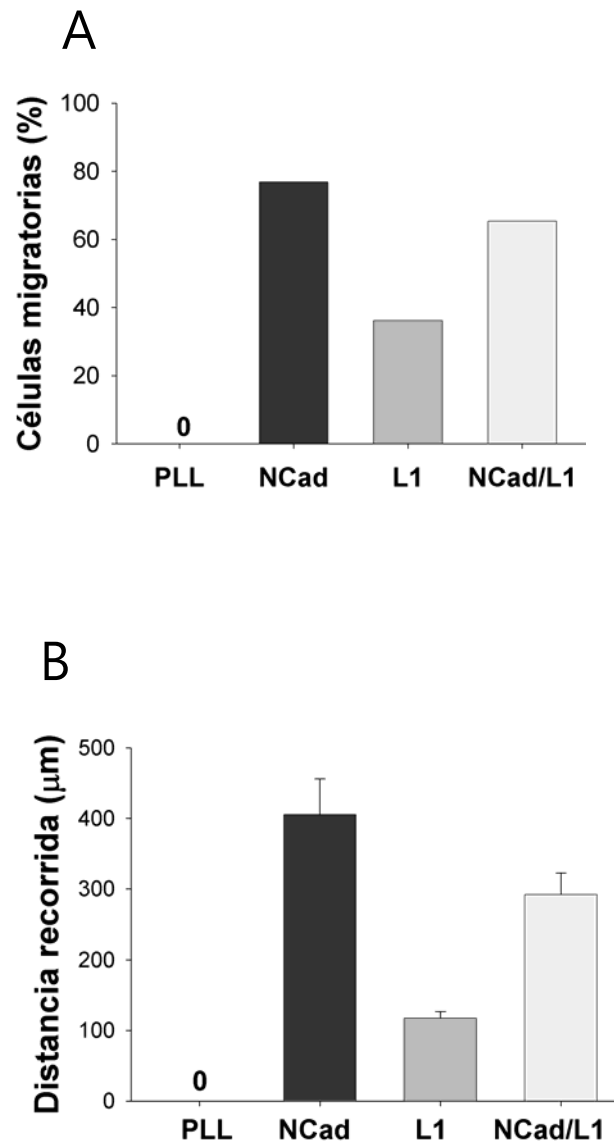


FIG. 11

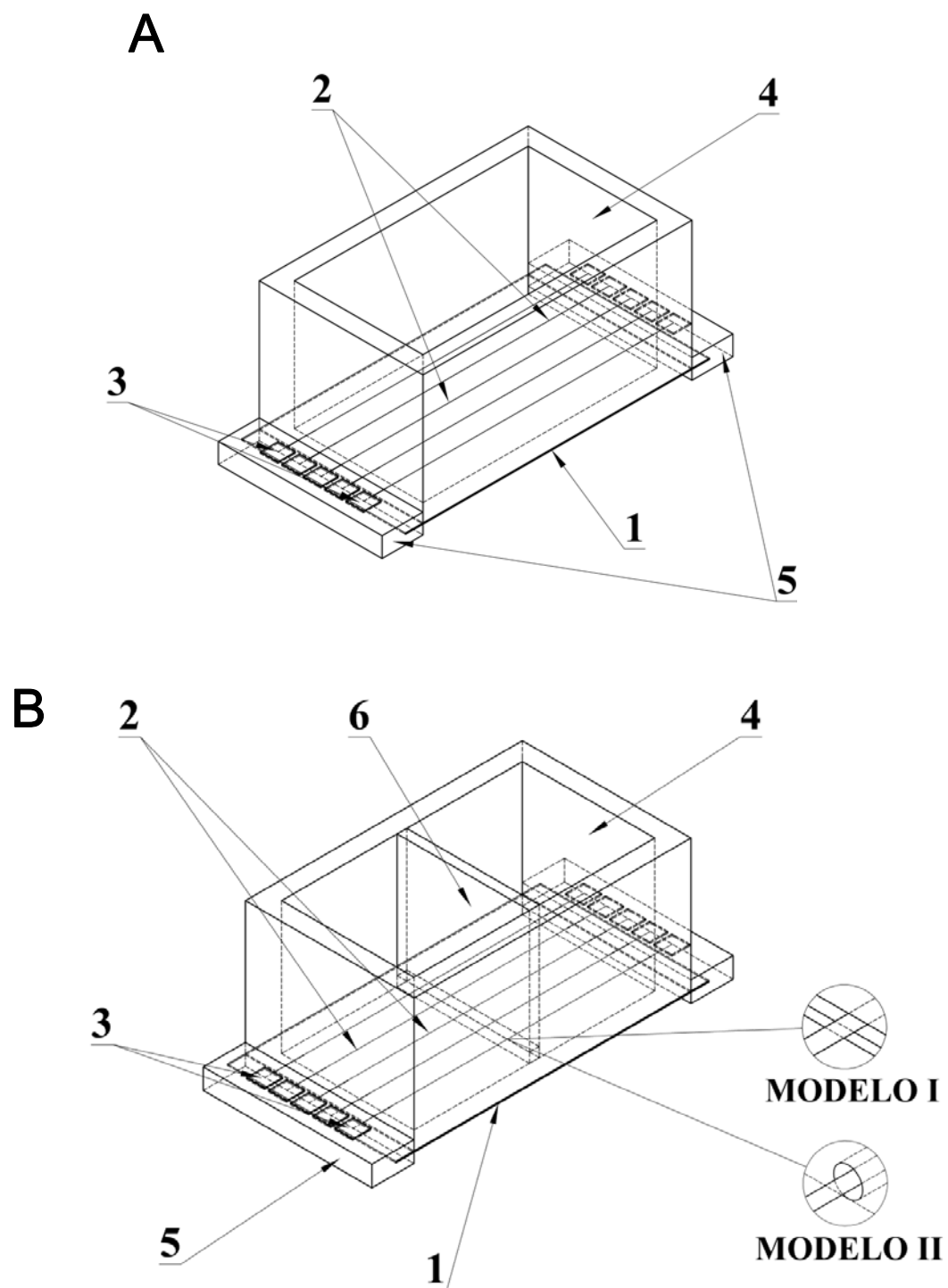


FIG. 12

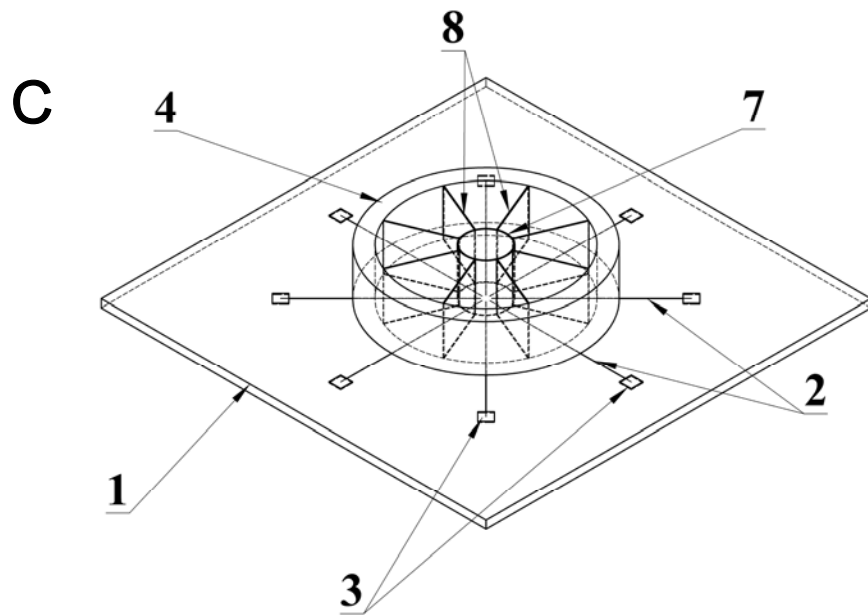


FIG. 12 (cont.)

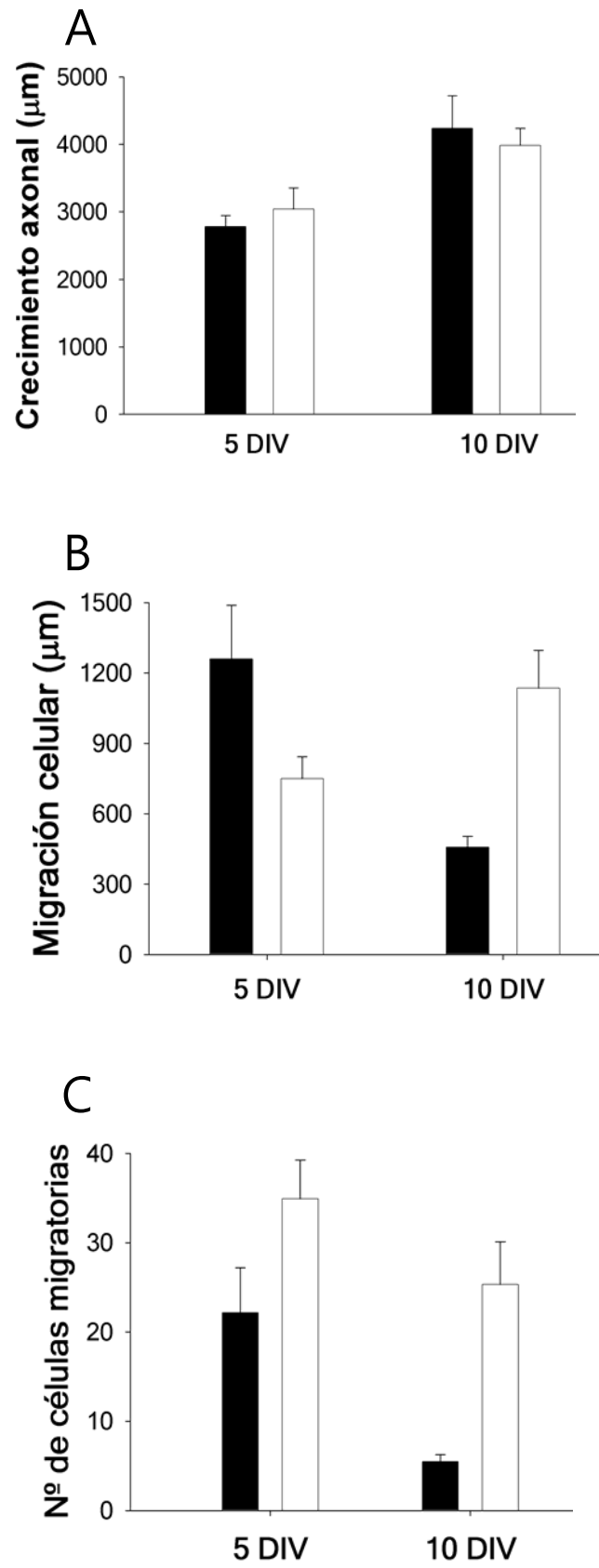


FIG. 13

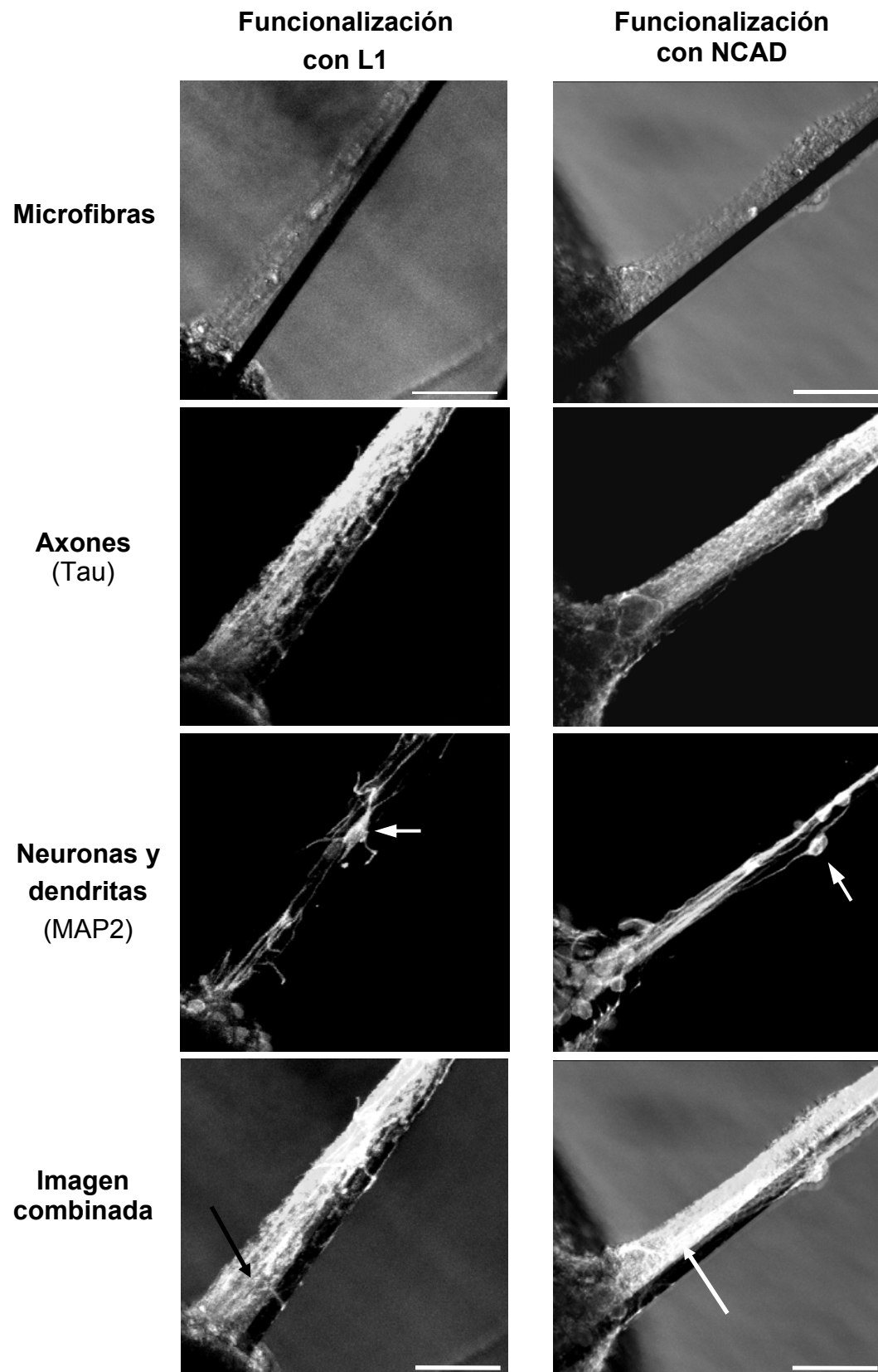


FIG. 14

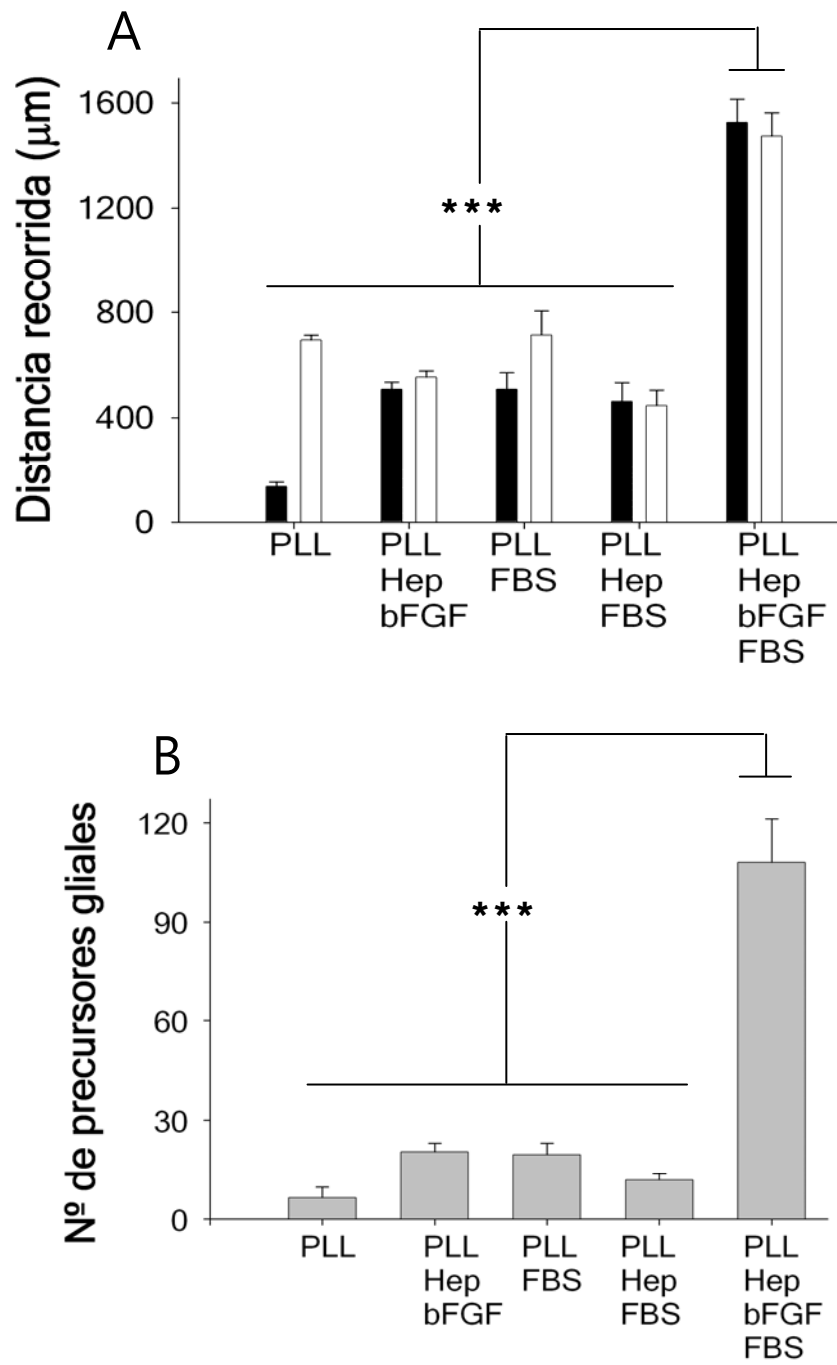


FIG. 15

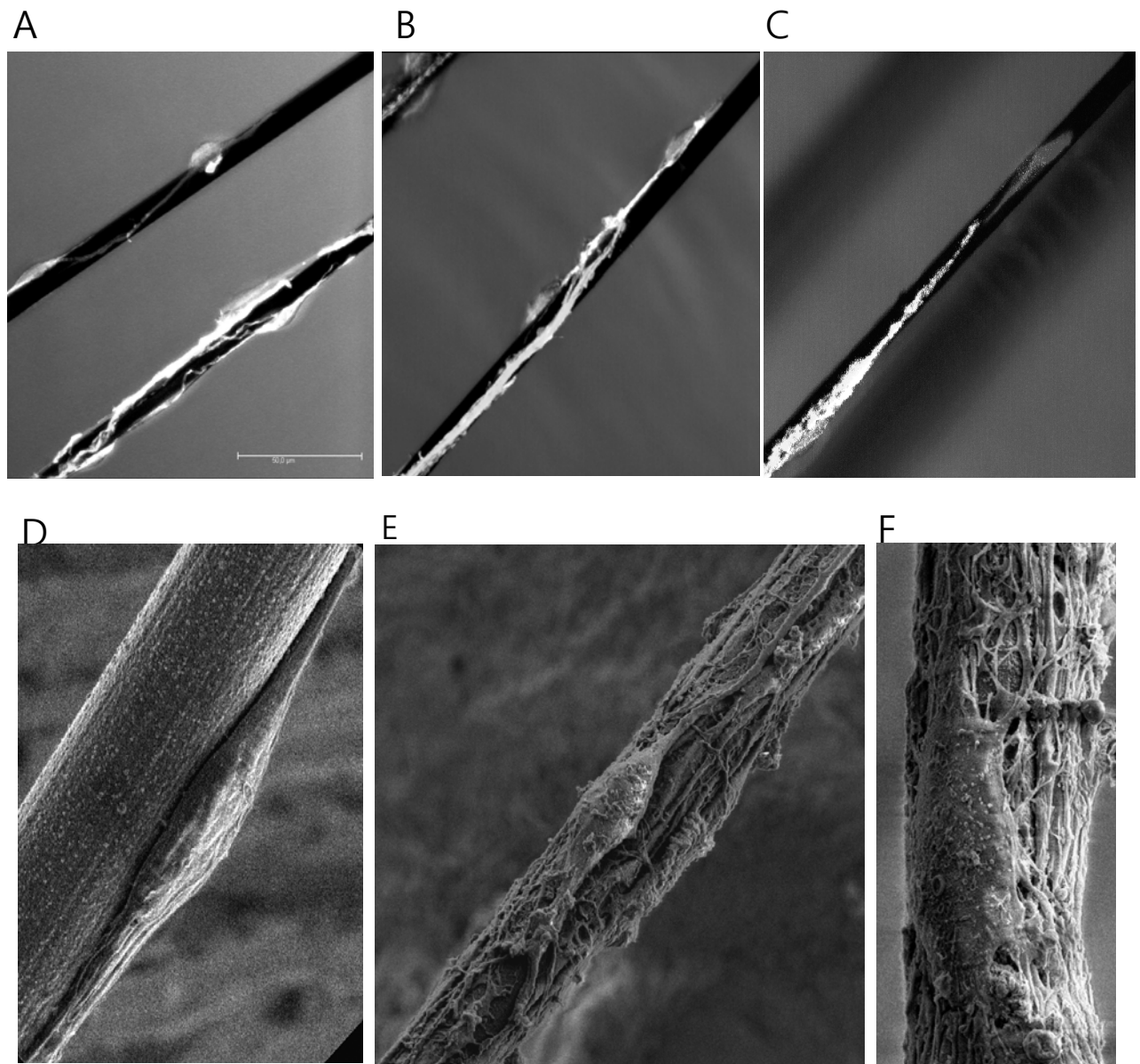
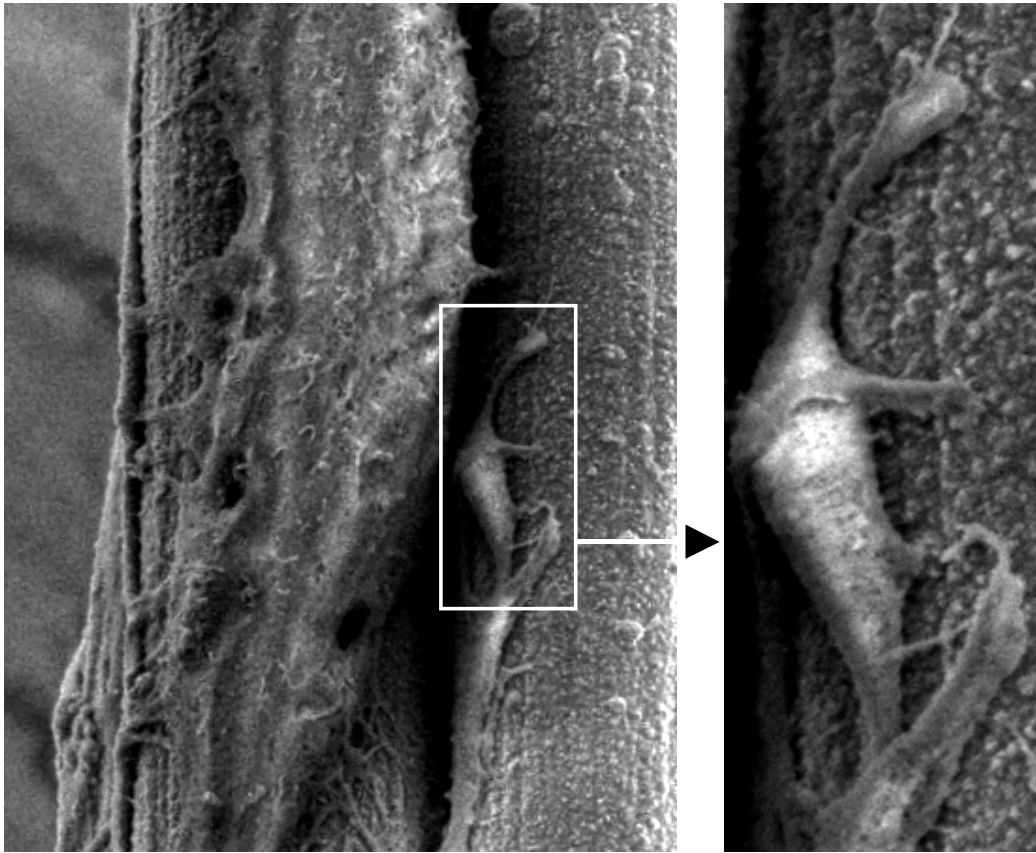
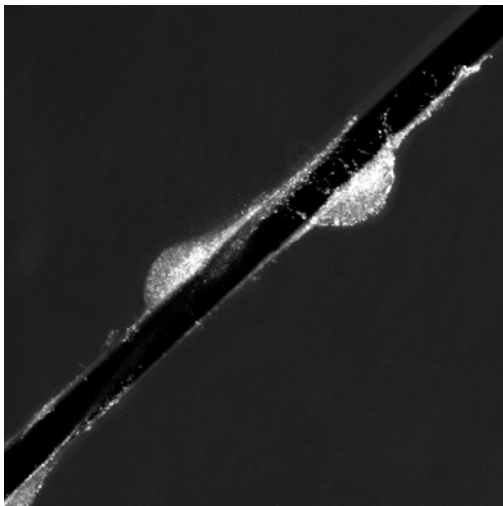


FIG. 16

A



B



C

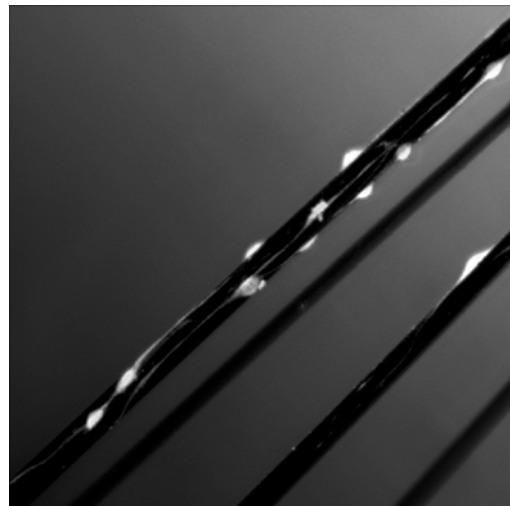


FIG. 17

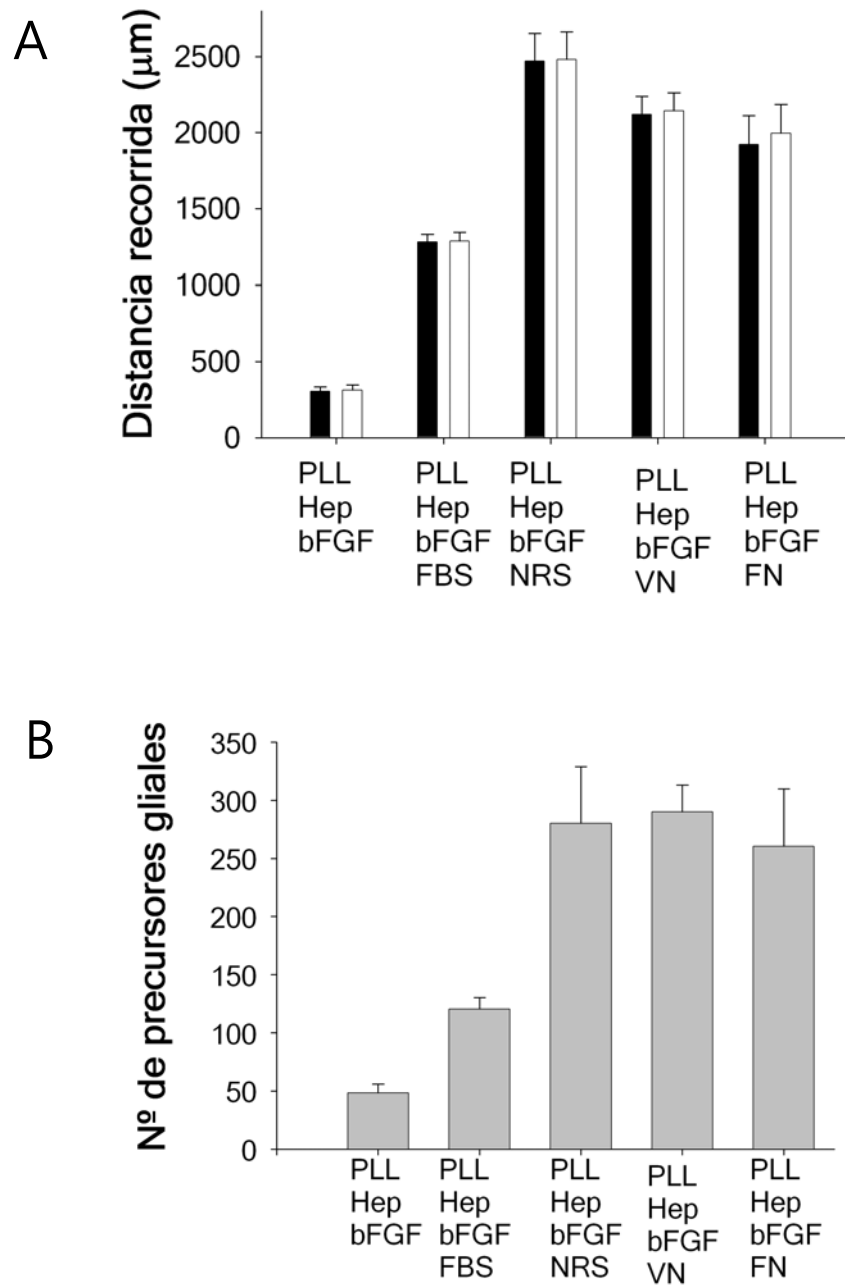


FIG. 18

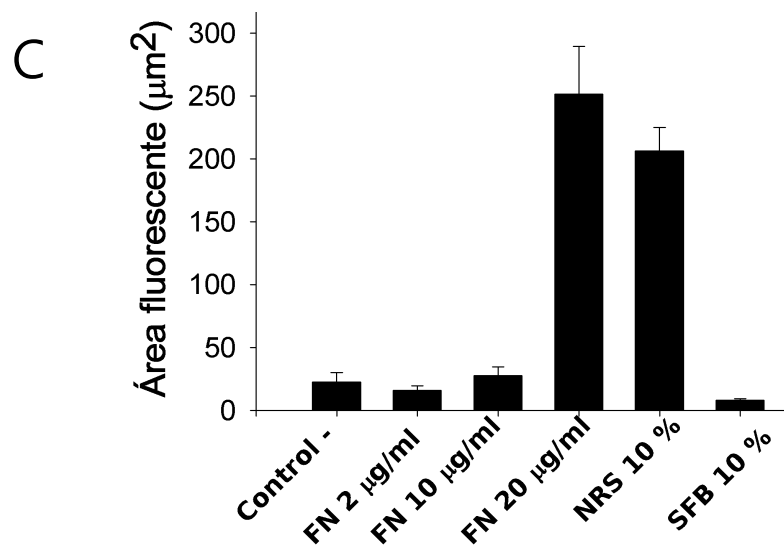
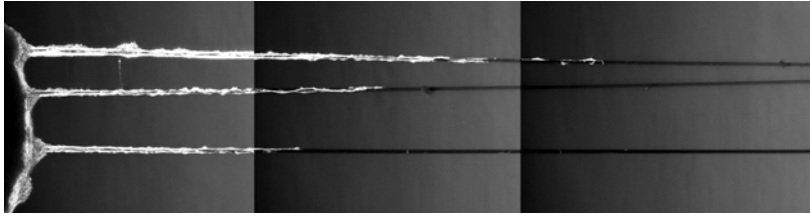
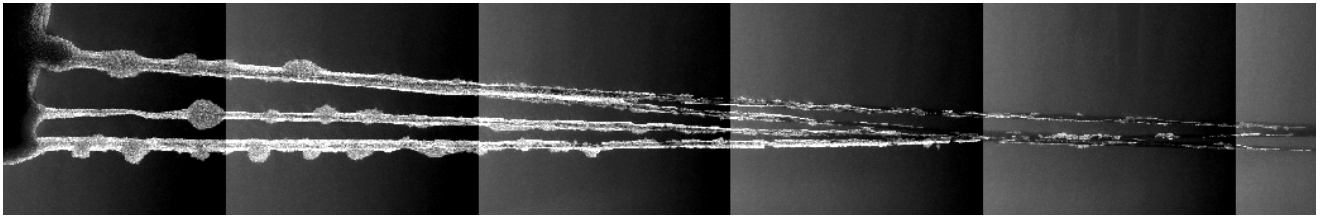


FIG. 18 (cont.)

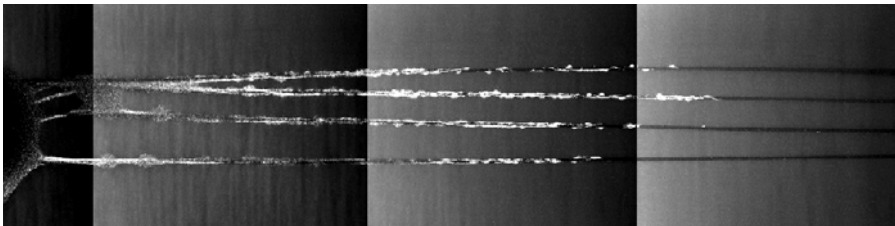
A



B



C



D

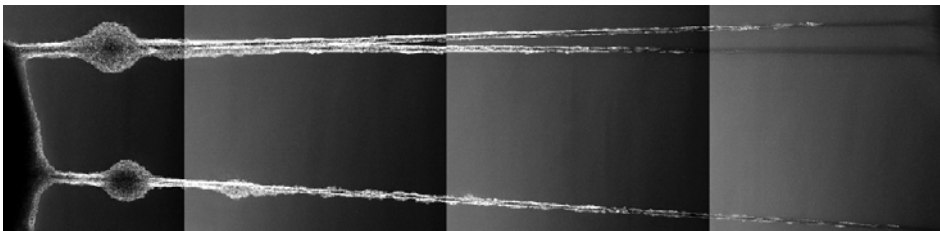


FIG. 19

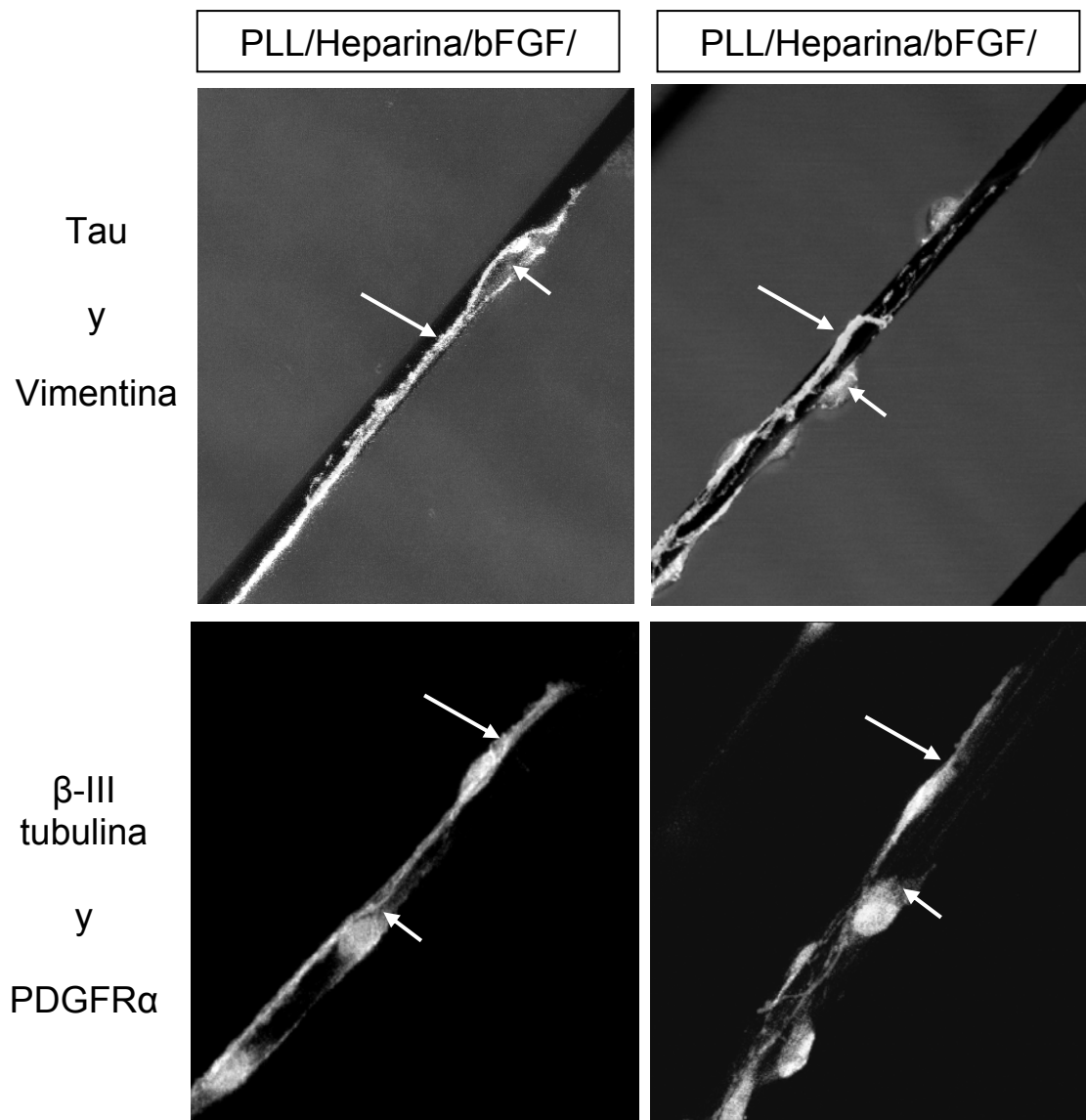


FIG. 20



- ②① N.º solicitud: 201231969
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.12.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	J. E. COLLAZOS-CASTRO et al., "Bioelectrochemical control of neural cell development on conducting polymers", Biomaterials, 2010, vol. 31, páginas 9244-9255.	1,2,5-12,20-25,36
X	N. GOMEZ et al., "Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: Bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension", J. Biomed. Mater. Res. A, 2007, vol. 81, nº 1, páginas 135-149.	1,2,5-12,20-25,36
A	US 20120100217 A1 (R. A. GREEN et al.) 26.04.2012, párrafos [0006]-[0013],[0041]-[0049],[0058]-[0060],[0101]-[0104]; ejemplos 1,2; reivindicaciones 1-15,33-37.	1-36
A	WO 2006127712 A2 (BROWN UNIVERSITY) 30.11.2006, página 6, línea 19 – página 8, línea 12; página 9, línea 11 – página 10, línea 30; página 22, líneas 23-25; ejemplos 1,2; reivindicaciones 1-20.	1-36
A	R. A. GREEN et al., "Impact of co-incorporating laminin peptide dopants and neurotrophic growth factors on conducting polymer properties", Acta Biomaterialia, 2010, vol. 6, páginas 63-71.	1-36

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.04.2014

Examinador
E. Dávila Muro

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08L41/00 (2006.01)
A61L31/04 (2006.01)
A61F2/02 (2006.01)
A61L31/16 (2006.01)
H01B1/12 (2006.01)
A61K31/795 (2006.01)
A61K47/30 (2006.01)
A61K47/32 (2006.01)
A61K38/18 (2006.01)
A61P25/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08L, A61L, A61F, H01B, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NLP, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.04.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-36	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3,4,13-19,26-35	SI
	Reivindicaciones 1,2,5-12,20-25,36	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	J. E. COLLAZOS-CASTRO et al., Biomaterials, 2010, vol. 31, páginas 9244-9255.	2010
D02	N. GOMEZ et al., J. Biomed. Mater. Res. A, 2007, vol. 81, nº 1, páginas 135-149.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un material biofuncionalizado que comprende un soporte, un polímero electroconductor dopado con PSS-co-MA unido al soporte y al menos una molécula con actividad biológica unida a la superficie polimérica de forma directa o a través de una molécula puente (reivindicación 1), así como el procedimiento de obtención de dicho material (reivindicación 20). La invención también se refiere al uso de este material biofuncionalizado para la fabricación de dispositivos para inducir el crecimiento neural y la reparación del sistema nervioso (reivindicación 21), al uso del material para la fabricación de electrodos para la estimulación del sistema nervioso (reivindicación 24) así como al método para inducir el crecimiento neural y la reparación del sistema nervioso con dicho material biofuncionalizado (reivindicación 25). Finalmente, la invención se refiere a una cámara de cultivo celular (reivindicación 26) y a un implante que comprenden dicho material (reivindicación 36).

El documento D01 se considera el estado de la técnica más próximo a la invención y en él se divulga un polímero electroconductor PEDOT:PSS, poli(3,4-etilendioxitiofeno) dopado con poliestirensulfonato, depositado sobre un sustrato de vidrio recubierto de oro; sobre este polímero electroconductor se unen moléculas con actividad biológica, como el factor de crecimiento bFGF, previa funcionalización de la superficie del polímero con polilisina y/o heparina por electroadsorción o auto ensamblaje. Este material biofuncionalizado se utiliza para la elaboración de electrodos que incorporados en neuroprótesis pueden producir la estimulación del sistema nervioso e inducir el crecimiento neural (ver Apartados 2.1, 2.4, 2.5, 2.6, 3.6, 3.7, 4). La diferencia entre lo divulgado en D01 y el objeto de la invención radica en que en este caso el polímero electroconductor no está dopado con PSS-co-MA.

El documento D02 divulga un biomaterial constituido por polipirrol dopado con poliestirensulfonato PPy:PSS como polímero electroconductor depositado sobre un sustrato de vidrio recubierto con cromo y oro, sobre el que se inmoviliza un factor de crecimiento neural NFG utilizando polialilamina PAA como molécula puente (ver páginas 2-3,7,12). Se utiliza para estimular el crecimiento y regeneración neural. En este caso, también la diferencia entre lo divulgado en D02 y el objeto de la invención radica en que el polímero electroconductor no está dopado con PSS-co-MA.

Aunque no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica anterior un material biofuncionalizado en el que el polímero electroconductor esté dopado específicamente con PSS-co-MA como se recoge en la reivindicación 1, se considera que ésta es una mera variación estructural en el diseño de polímeros electroconductores que se utilizan para la preparación de materiales funcionalizados con moléculas con actividad biológica que puedan incorporarse en neuroprótesis para la inducción del crecimiento neural, sobre todo teniendo en cuenta que los polímeros electroconductores PEDOT y PPy dopados con PSS y divulgados en los documentos D01 y D02 permiten la funcionalización de los mismos con factores de crecimiento neural. Por lo tanto, se considera que el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones independientes 1,20,21,24,25,36 no tiene actividad inventiva, a menos que el hecho de utilizar específicamente este dopante PSS-co-MA supusiera un efecto inesperado o sorprendente en las características o propiedades de los materiales biofuncionalizados.

Consecuentemente, la invención recogida en las reivindicaciones 1,2,5-12,20-25,36 se considera que carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP/1986).

No se ha encontrado en el estado de la técnica documentos en los que se divulguen polímeros electroconductores funcionalizados con biomoléculas los cuales estén depositados sobre un soporte en forma de microfibras (reivindicaciones 3-4) o que adicionalmente comprendan una molécula de la matriz extracelular unida a un complejo molecular heparina/factor de crecimiento (reivindicaciones 13-15), o que la molécula con actividad biológica esté unida al polímero electroconductor a través de un anticuerpo como molécula puente (reivindicaciones 16-17), o bien que la molécula con actividad biológica sea una molécula de adhesión celular (reivindicaciones 18-19). Tampoco se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica una cámara de cultivo celular que comprenda este material biofuncionalizado y que tenga las características específicas recogidas en las reivindicaciones 26-35.

En consecuencia, la invención recogida en las reivindicaciones 3,4,13-19,26-35 se considera nueva, que implica actividad inventiva y con aplicación industrial (arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).