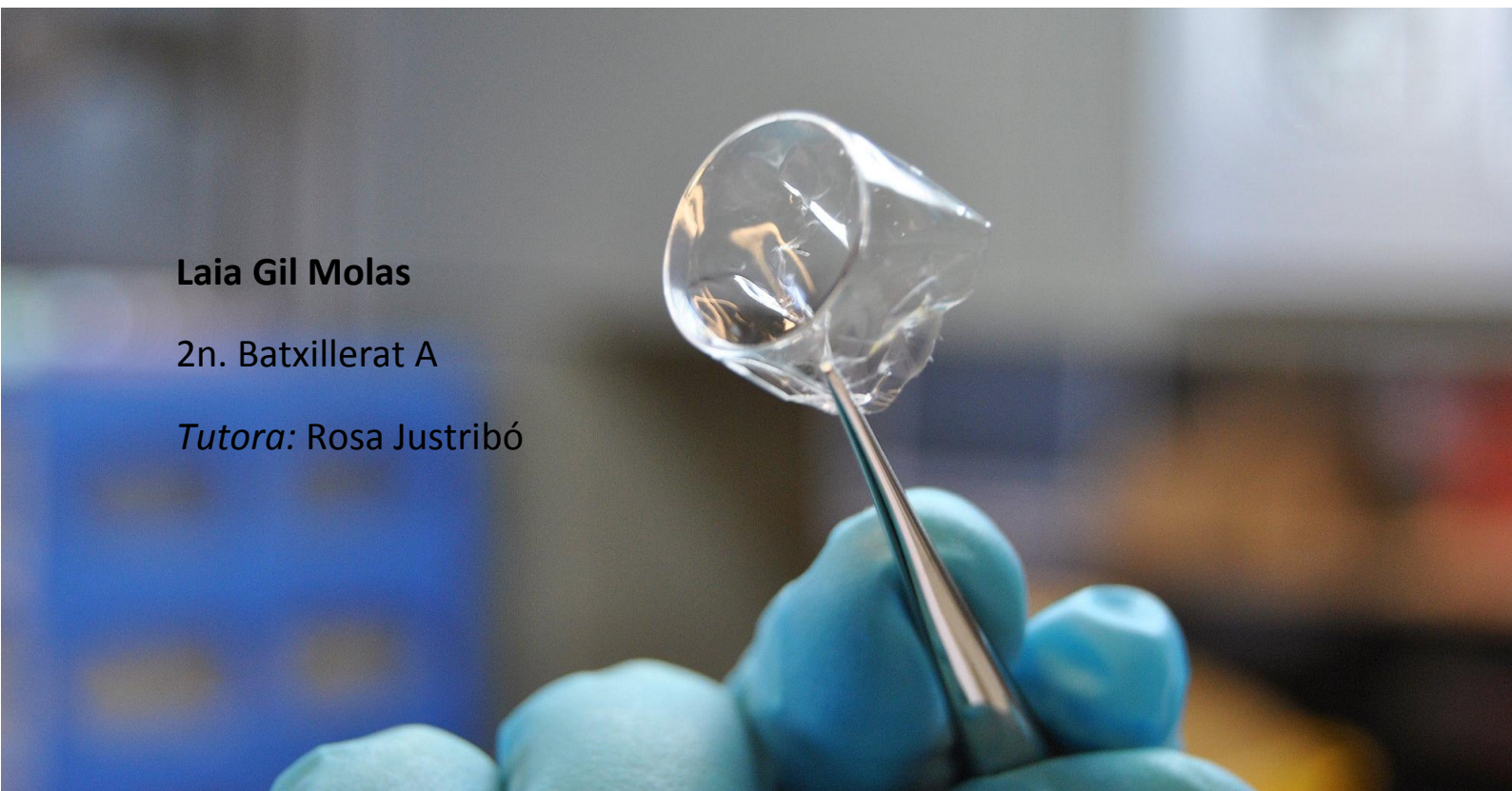


Caracterització de materials biodegradables per a la regeneració òssia

Laia Gil Molas

2n. Batxillerat A

Tutora: Rosa Justribó



Per la meva àvia,

i per totes les àvies del món,
perquè si els seus empelts fossin
de materials biodegradables
s'haguessin estalviat moltes
operacions i moments difícils.

ÍNDIX

0. Introducció	4
1. Enginyeria de teixits.....	6
1.1. Història	6
1.2. Biomaterials	7
2. El teixit ossi.....	9
3. Regeneració òssia	11
4. Entrevista a una doctora en enginyeria de teixits	13
5. Disseny experimental.....	15
5.1. Preparació del material.....	16
5.1.1. Preparació dels films.....	16
5.1.2. Elastin-Like Polymers i funcionalització.....	17
5.2. Assajos de caracterització	20
5.2.1. Degradació	20
5.2.2. Calcinació.....	21
5.2.3. Angle de contacte.....	21
5.2.4. Funcionalitzacions covalent / fisisorbida	23
5.3. Caracterització de la resposta biològica.....	25
5.3.1. Cèl·lules utilitzades.....	25
5.3.2. Protocols	26
5.4. Anàlisi dels resultats i conclusions.....	28
5.4.1. Degradació	28
5.4.2. Calcinació	29
5.4.3. Angle de contacte	30
5.4.4. Funcionalitzacions covalent / fisisorbida	31
5.4.5. Anàlisi de la resposta biològica	31
6. Conclusions	34
7. Fonts d'informació	38
7.1. Bibliografia	38
7.2. Recursos electrònics	39
8. Annexos	40
Annex A. Informe i protocols de pràctiques	40
Annex B. Article de les "IV Jornades Sobre l'Ensenyament de la Química"	40
Annex C. Memòria de l'estada a l'IBEC.....	40
Annex D. Pòster	40
Annex E. Notícia a la revista de l'IBEC sobre la nostra estada.....	40

0. INTRODUCCIÓ

Actualment l'enginyeria de teixits és una de les branques de la ciència que està creixent exponencialment arreu del món, per les seves múltiples aplicacions i perspectives de futur. Tan a nivell internacional com nacional s'està investigant i desenvolupant uns materials que actuen com a substituïts orgànics en el tractament de lesions, entre milions de tractaments i utilitats. El tema que s'estudia en aquest projecte està acotat en aquells materials que estan destinats a tractar lesions del teixit ossi i que, a més, són biodegradables.

El treball realitzat és bàsicament experimental, ja que es prepararan diferents materials d'aquestes característiques al laboratori i es realitzaran varis experiments per determinar les seves propietats i observar quin d'ells és més adient per la seva funció. No obstant, primerament hi ha una part teòrica que, per una banda, fa esment de la fisiologia i histologia del teixit ossi i, per l'altra, tracta la història, l'actualitat i el futur dels empelts i materials desenvolupats per l'enginyeria de teixits. Aquesta segona meitat teòrica vindrà acompanyada d'una entrevista a una doctora en enginyeria de teixits, per poder conèixer de primera mà la situació actual dels materials utilitzats. Una introducció teòrica és necessària per tenir uns coneixements previs sobre la matèria i poder realitzar la part experimental.

L'objectiu del treball és corroborar la següent hipòtesi: els materials biodegradables que actualment són investigats per l'enginyeria de teixits, seran una solució amb moltes perspectives de futur als problemes actuals en el tractament de lesions del teixit ossi, pel fet de contribuir a la seva regeneració i per ser reabsorbibles pel cos. Aquesta és la hipòtesi inicial, però al llarg del treball experimental se'n plantejaran de noves, ja que a mesura que es vagi avançant en la part teòrica s'aniran adquirint nous coneixements que es podran aplicar al laboratori.

La tria d'aquest tema de treball va ser motivada, bàsicament, per un interès personal en molts àmbits de la ciència, i com que l'enginyeria de teixits treballa aspectes multidisciplinaris d'aquesta, com ara la biologia en el camp del cos

humà o la química en el tractament de materials, entre d'altres, va ser un motiu de bastant pes ja que s'adequa als meus interessos. A més, el fet que sigui una branca de la ciència en creixement arreu del món, resulta interessant conèixer de què es tracta i amb què es treballa.

Finalment cal dir que em va sortir la oportunitat de realitzar unes pràctiques a l'IBEC (Institut de Bioenginyeria de Catalunya), dins del departament de Bio/Non-Bio Interactions for Regenerative Medicine, on vaig realitzar tota la part experimental.

1. ENGINYERIA DE TEIXITS

1.1. HISTÒRIA

Durant molts anys, les lesions del teixit ossi causades per lesions físiques, manca de sang als ossos, tumors i falta de teixit en general, han estat tractades amb empelts, és a dir, amb fragments de teixits o òrgans utilitzats per substituir-ne uns de malalts o deteriorats. El mètode tradicional es basa en col·locar fragments d'os, extrets d'altres parts del cos propi o aliè, al voltant de l'os trencat o amb defectes ossis, per tal que es regeneri.

Actualment està creixent una nova àrea d'estudi, denominada com a enginyeria de teixits, que estudia l'ús de materials externs al cos per restaurar les funcions dels teixits danyats. Tot i així, l'ús de materials amb aquests objectius es remunta a milers d'anys abans. Les primeres dades que hi ha són de l'Antic Egipte i de civilitzacions clàssiques grega i romana, que utilitzaven metalls i altres productes naturals. Més endavant, ja a l'Europa del segle XVI, l'or i la plata van ser utilitzats en reparacions dentals i al cap de pocs anys el ferro per immobilitzar fractures òssies. Al llarg del segle XIX es van crear aliatges de metalls que proporcionaven millors propietats mecàniques i una resistència a la corrosió. Fins a principis del segle XX els polímers no s'utilitzaven gaire per restaurar els teixits danyats, però va ser llavors quan hi va haver una important acceleració en el seu desenvolupament, ja que es va descobrir un material per fabricar fils de sutura degradables i absorbibles per l'organisme. La segona guerra mundial va proporcionar un gran impuls en la investigació dels materials tolerables per l'organisme per la fabricació de pròtesis i implants. Ja en èpoques més recents, entre 1950 i 1975 s'estudiaven uns materials que tinguessin unes característiques adients per a implants i pròtesis.

No obstant, la combinació d'aquest mètode tradicional dels empelts amb l'ús de materials per lesions òssies, no era un tractament del tot competent, ja que es va descobrir que comportava diversos problemes: en primer lloc, hi havia un risc de transmissió de malalties, ja que el material implantat era aliè al cos; en segon, hi havia una alta morbiditat del lloc d'extracció, és a dir, que comportava una gran proporció de cèl·lules amb malalties o amb alt risc de mort a causa de

l'intervenció quirúrgica; i finalment hi havia una incapacitat dels materials per remodelar-se, cosa que comportava que al cap d'un temps s'havien de tornar a extreure, i tampoc eren competents reaccionar davant de condicions fisiològiques, o sigui que no responien a canvis del cos. Aquests són els problemes més importants, però hi ha nombrosos inconvenients més que van fer necessària una recerca de solucions.

L'any 1969 va marcar un canvi molt important en el seu desenvolupament: disciplines científiques extrínseques a la medicina es van incorporar a la investigació i desenvolupament de biomaterials. Aquest fet va ser clau, ja que no sols la intervenció de l'enginyeria va permetre la introducció de tècniques per caracteritzar l'estructura i la superfície del biomaterial, sinó que la biologia i la bioquímica també van aportar coneixements per l'estudi de la resposta cel·lular, entre d'altres àrees, requerint d'aquesta manera una cooperació multidisciplinària entre elles.

D'aquesta manera va néixer una enginyeria de teixits que pretén buscar opcions que restaurin, mantinguin o millorin la funció dels empelts mitjançant la creació de substituïts biològics.

1.2. BIOMATERIALS

Un biomaterial és un producte utilitzat per a reproduir la funció de teixit viu en un sistema biològic, generalment el cos humà, de forma segura, mecànicament funcional i acceptada fisiològicament, essent implantat temporalment o permanent al cos, per tal de reparar un defecte existent en aquest. Per a que qualsevol biomaterial pugui ser implantat ha de ser biocompatible, un concepte que engloba un seguit de característiques: tolerància del material, bioestabilitat tant a curt com a llarg termini i manteniment de les seves propietats i de l'estructura físico-química mentre estigui dins l'organisme.

Les respostes dels teixits al "cos desconegut" implantat a l'organisme depenen de les característiques d'aquests, si bé sempre hi ha una reacció inflamatòria

immediata que pot ser intensa si apareix un rebuig cap al material implantat. En canvi, si s'utilitzen materials biodegradables reabsorbibles, s'observa que es crea una capa continua de cèl·lules recobrint-los i no apareix cap tipus d'inflamació als teixits contigus, és a dir, que es crea nou os i no hi ha rebuig del material. L'objectiu és crear un material que al començament suporti tota la càrrega que li comporta ser un substitut de teixit ossi, però a mesura que va induint a la regeneració òssia i es creï aquesta capa de cèl·lules, es degradi de forma gradual i transfereixi les càrregues que suportava al començament cap al nou os. Pel fet que no es necessiti repetir una intervenció quirúrgica, la investigació en materials biodegradables està en constant creixement i ja n'hi ha molta diversitat amb múltiples aplicacions.

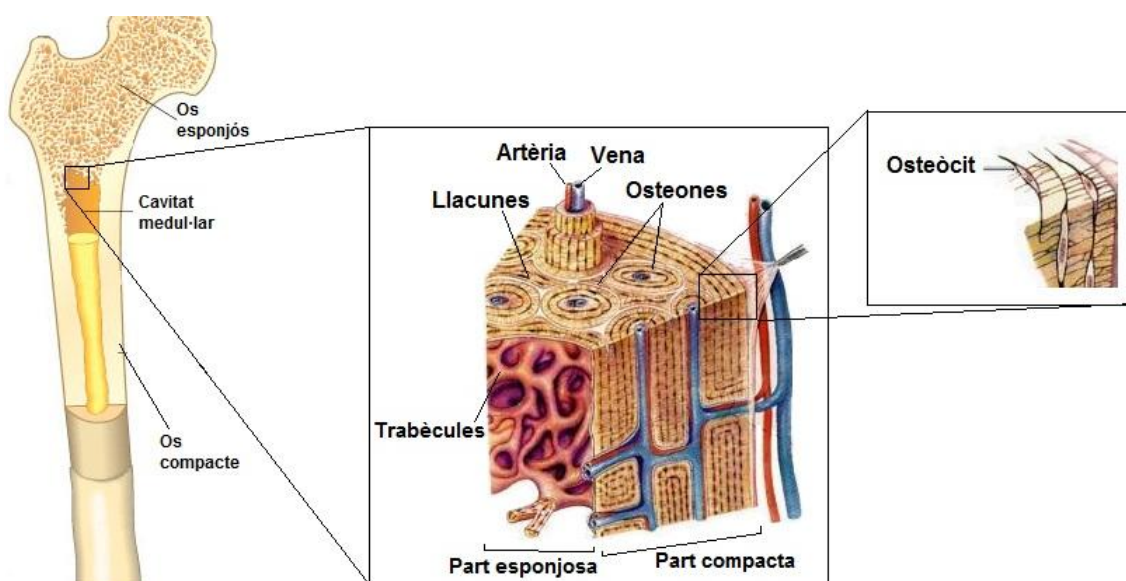
Per assegurar l'èxit d'un biomaterial es necessita que passi per un seguit d'assaigs al laboratori per comprovar que sigui biocompatible i que la seva implantació sigui favorable: assaigs de caracterització, on s'utilitzen diferents tècniques al laboratori per a investigar la seva estructura interna i propietats; simulacions biomecàniques, on es recreen les condicions fisiològiques (temperatura del cos humà) per descobrir el comportament del material com si es trobés implantat (estabilitat, manteniment de les propietats i estructura); proves toxicològiques, on es verifica si el material és tòxic per l'organisme; models *in vitro*, on es sembren cèl·lules sobre el material per observar la resposta i tolerància biològica del material al laboratori; i una implantació *in vivo* en últim terme, on s'implanta en organismes vius.

En el cas de la majoria de biomaterials polimèrics que s'estudien per ser implantats el teixit ossi, solen ser dissenyats per causar un efecte a les cèl·lules òssies per tal de que se l'hi adhereixin. D'aquesta manera, mitjançant les pròpies cèl·lules del malalt, es recobreix el biomaterial i es repara l'os. A més, si el material és biodegradable, no requerirà una segona intervenció quirúrgica ja que es degradarà per si sol dins del cos.

2. EL TEIXIT OSSI

El ossos són òrgans del sistema esquelètic formats principalment per teixit ossi, i també per vasos sanguinis, teixit adipós i medul·la òssia. El teixit ossi està format per una fase mineral (fonamentalment formada per calci, que és un mineral que els dóna duresa i blancor, i fòsfor) i per una xarxa proteica, bàsicament de col·lagen, que és una substància que dóna una mica de flexibilitat als ossos.

Per altra banda, els ossos no són completament sòlids, sinó que estan formats per una estructura que els dóna força (alta resistència a la tracció i a la compressió) però que no implica que tinguin una massa molt elevada ni que perdin elasticitat: tenen una part interior esponjosa formada per una superfície porosa gegant (les estructures amb espais buits que la formen s'anomenen trabècules) i una capa exterior sòlida que recobreix a la primera formant una estructura dura, densa i compacta. Aquesta part és una matriu dura i calcificada, formada per material col·lagen orgànic i sals minerals. Un 65% d'aquesta matriu és sal òssia, una part inorgànica responsable de la duresa de l'os. La unitat bàsica estructural són les osteones o sistemes de Havers. Aquestes es poden observar fàcilment al microscopi ja que la matriu calcificada forma unes unitats estructurals de forma circular, on hi ha un vas sanguini que passa pel centre d'aquestes.



Esquema d'un os amb les parts esmentades.

El teixit ossi té múltiples funcions; per una banda, la part compacta de l'os dona suport, separa i protegeix diferents estructures fràgils del cos, com ara els òrgans vitals o la medul·la òssia; a més, aquesta mateixa part calcificada emmagatzema calci, funció metabòlica molt important ja que aquest pot ser extret segons les necessitats del cos; per altra banda, els ossos intervenen en el moviment mecànic, ja que són un lloc d'inserció de músculs i tendons; i finalment cal destacar la gran importància de la funció de la medul·la òssia, perquè realitza la hematopoesis (en grec *hemato-* vol dir «sang» i *-poiesis* significa «fabricar»), és a dir, la formació de les cèl·lules de la sang (glòbuls vermells, blancs i plaquetes).

3. REGENERACIÓ ÒSSIA

Els ossos poden semblar estructures inerts però no és així; en petits espais que hi ha entre els sistemes de Havers, anomenats llacunes, es troben moltes cèl·lules vives anomenades osteòcits. Les osteones tenen també uns canals anomenats canículs que comuniquen les llacunes i els osteòcits amb els vasos sanguinis del conducte de Havers central per tal que es puguin alimentar.

Abans d'estar recoberts per matriu òssia, els osteòcits havien estat un altre tipus de cèl·lula òssia activa, encarregada de renovar el teixit que forma als ossos de manera continua al llarg de la vida. Les cèl·lules que es troben a la part esponjosa de l'os són les encarregades de renovar la substància òssia mitjançant un cicle constant i permanent de descomposició i reconstrucció de la matriu osteoide anomenat regeneració òssia. La fase de destrucció de l'os, coneguda com a resorció òssia, la realitzen els osteoclasts (en grec el prefix *osteo-* significa «os» i *-clasto* es refereix a «destruir»), que en descompon els minerals i les fibres de col·lagen. La reconstrucció òssia es basa en la incorporació de noves fibres de col·lagen i minerals gràcies a unes cèl·lules anomenades osteoblasts (en grec el sufix *-blasto* significa «cèl·lula jove»). Amb la realització de les funcions d'ambdues cèl·lules, s'aconsegueix eliminar teixit ossi antic i tenir-ne de nou. Els osteoblasts es van rodejant de teixit ossi nou fins que queden del tot envoltats i ja passen a formar part del nou os.

Aquest procés permet que els ossos siguin capaços de respondre a càrregues i agressions amb canvis de forma, densitat i mida. Per exemple les càrregues aplicades a determinats ossos durant l'exercici físic comporten més reconstrucció òssia i per tant uns ossos més forts i densos. D'altra banda el fet de canviar un teixit vell per un de nou dóna més seguretat que pugui realitzar totes les funcions que li corresponen.

Quan se li aplica una major càrrega a l'os, aquest procés li dóna força, com també la disminueix si la càrrega és més petita. Així doncs, amb la regeneració òssia es manté la força dels ossos, però també repara possibles fractures.

A un os d'un organisme se li remodela prop d'un 5-15% de la seva massa total al llarg de l'any. El grau de regeneració òssia de la part compacta de l'os es troba aproximadament a un 4%, en canvi l'índex de remodelació de la part esponjosa oscil·la el 20%. Tot i així, durant la tercera edat es perd prop d'un 1% de massa òssia per any (en algunes dones pot arribar entre un 3 i 5%), causat perquè els osteoclasts treballen a més rapidesa que els osteoblasts.

Gràcies a aquesta regeneració interna que tenen els ossos i a la capacitat de les seves cèl·lules de respondre a estímuls mecànics externs, el teixit ossi pot ser modificat mitjançant intervencions quirúrgiques, pròtesis ortopèdiques o empelts. Com que l'esperança de vida ha augmentat exponencialment al llarg dels anys, i com a conseqüència també ho ha fet l'índex d'envelliment, la investigació en biomaterials té un impuls més per poder cobrir les necessitats de la població actual i futura.

4. ENTREVISTA A UNA DOCTORA EN ENGINYERIA DE TEIXITS

La doctora Melba Navarro va realitzar la seva tesi doctoral sobre el desenvolupament i la caracterització de materials biodegradables per la regeneració òssia. Actualment és investigadora en l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya i ha treballat a la Universitat de Liverpool, de Twente i a l'INEB.

- La investigació que l'enginyeria de teixits està duent a terme serà determinant en el futur del tractament de lesions òssies?

Sí, serà molt determinant ja que a més de les opcions convencionals, com plaques i claus metàl·lics, i de les noves teràpies cel·lulars, que comporten despeses elevades i en alguns casos problemes ètics, de transport o emmagatzematge, entre d'altres, podrem comptar amb noves teràpies regeneratives. En aquestes l'os nou es regenerarà sense necessitat de l'ajuda d'agents biològics, mentre que el material implantat desapareix.

- Així doncs, creus que els materials biodegradables seran la solució per als problemes que existeixen en les actuals metodologies per reparar el teixit ossi?

En principi no hi ha un sol camí –en aquest cas els materials biodegradables– que pugui solucionar tots els problemes, perquè depenent del cas s'utilitzarà un material o un altre. Els metalls sempre es continuaran utilitzant, però els polímers biodegradables i bioceràmiques, juntament amb els seus corresponents tractaments superficials diversos, la creació de noves i diferents estructures, i variacions a la metodologia, sí que contribuiran a solucionar problemes que avui en dia no es poden solucionar amb els dispositius existents.

- Com creus que creixerà la recerca en aquest camp al llarg dels anys?

L'enginyeria de teixits és una àrea que es troba en ple creixement, ja que s'albira com una de les alternatives per solucionar molts dels problemes actuals relacionats amb els implants convencionals, com he dit abans. En el futur comptarem amb biomaterials per regeneració de teixits com una opció més.

- Actualment existeix alguna classe de material biodegradable que ja s'utilitzi per al tractament de lesions òssies? Quin és? I per a altres tractaments?

El PLA i EL PGA són dels polímers biodegradables més utilitzats. S'utilitzen per lesions òssies, sutures, pell, fins i tot en l'elaboració de *stents* (per a aplicacions cardiovasculars) biodegradables.

- El PLA o el PEG s'utilitzen actualment en pacients o encara queda molta investigació abans d'usar-los?

Tant el PLA com el PEG s'utilitzen actualment en pacients. Sobretot el PLA s'usa molt en sutures, plaques, cargols, claus...



D'esquerra a dreta: Quim Viñes (company de pràctiques i becat del Programa Joves i Ciència), **Melba Navarro** (entrevistada), Cécile Perrault (investigadora de l'IBEC), Laia Gili (becada del Programa Joves i Ciència) i Laia Gil (jo).

5. DISSENY EXPERIMENTAL

En aquesta part experimental s'han preparat materials de naturalesa polimèrica per determinar si poden ser útils com a biomaterial en el teixit ossi, realitzant alguns dels assajos que hem mencionat a l'apartat anterior: en primer lloc, varis assajos de caracterització, on amb diferents experiments s'investigarà l'estructura interna i propietats dels materials; i en segon lloc una simulació *in vitro* amb un cèl·lules òssies sobre el material, per observar la resposta biològica sobre el material.

L'objectiu de la part pràctica és determinar la biocompatibilitat dels materials i justificar quin d'ells o procediment seria millor en cada cas, en un hipotètic ús com a implant.

El treball experimental està dividit en tres parts: primer la preparació del material, en segon lloc diversos assajos de caracterització i finalment l'estudi de la resposta biològica. La part de preparació del material és necessària per tal de correlacionar els canvis fisicoquímics de la superfície del material, explicats més endavant, amb la resposta cel·lular, així com per controlar els procediments de transformació del material.

Tots els procediments que hem dut a terme i els materials utilitzats són els que es fan servir actualment a l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) pel tractament de biomaterials, on s'ha realitzat tota la part pràctica.

Els protocols i tots els passos seguits detallats es troben a l'annex A. Informe i protocols de pràctiques.



Imatge de l'edifici Hèlix del Parc Científic de Barcelona. A la primera planta es troben part dels laboratoris de l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), on vaig realitzar les pràctiques.

5.1. PREPARACIÓ DEL MATERIAL

5.1.1. PREPARACIÓ DELS FILMS

La primera part de preparació del material és necessària ja que es requereix que el material estigui en unes determinades condicions per poder realitzar l'experimentació posterior. Els materials de naturalesa polimèrica que prepararem a la primera part són els següents:

- **PLA:** l'àcid polilàctic és un polímer de naturalesa orgànica. La seva superfície és altament hidrofòbica, poc afí amb l'aigua. Malgrat tot, el contacte amb aquesta pot induir el trencament de les cadenes carbòniques per hidròlisi ester i degradar-se gradualment. Per aquest motiu es conserva en ambient sec (dins el congelador). El tenim en forma granulada.
- **Mescla PLA/PEG (70/30):** el PEG (polietilenglicol), és una molècula hidròfila, és a dir, té afinitat amb l'aigua, i per tant es dissol més fàcilment en aquesta. Mostra una major estabilitat que el PLA. Confeccionarem una mescla de proporcions (70/30) en massa per tal de veure com pot influir l'addició d'un polímer hidròfil amb un de hidròfob com és el PLA.
- **Mescla PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl:** actualment s'han realitzat diversos estudis que afegeixen vidre biodegradable en una mescla de polímers. Davant la impossibilitat d'adquirir-ne, en aquest cas es farà servir clorur de sodi per comprovar si l'agregació d'un component no polimèric però soluble en aigua, pot fer variar positivament els resultats a través de l'aparició de porus en el material quan es dissol, deguts a la solubilitat de la sal.

Aquests tres materials diferents els hem preparat en forma de film, és a dir, en forma de làmina molt prima de material. Ho fem d'aquesta manera perquè els assajos de caracterització i el cultiu que farem necessiten el material en forma de film, que més endavant ja es detallarà el motiu en cada experimentació.

Aquestes làmines s'aconsegueixen mitjançant una vaporització en una cambra saturada de cloroform gas. Els polímers i les seves mescles preparades es

solubilitzen en cloroform (CHCl_3), que és un solvent orgànic líquid a temperatura ambient, per poder-los transformar a líquids, ja que estan en forma sòlida. Es col·loquen les mescles en plaques de Petri dins d'una cambra amb un vas amb cloroform. L'evaporació del solvent del vas dóna lloc a l'obtenció de films. La saturació de l'aire amb cloroform en la cambra on es produeixen els films es realitza per reduir la velocitat d'evaporació del solvent, donant lloc així a una superfície del film més llisa i regular.

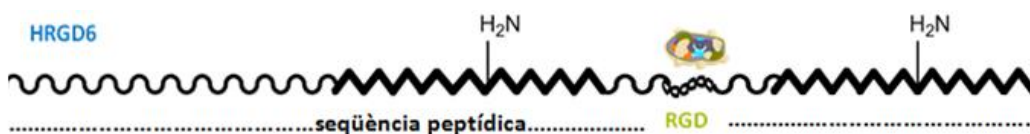


Campana de seguretat amb la capsa que conté les plaques de Petri. En aquest moment s'estava evaporant el cloroform solvent de les mescles i originant-se els films de material.

5.1.2. ELASTIN-LIKE POLYMERS I FUNCIONALITZACIÓ

Després de l'obtenció de films, s'ha procedit a modificar-ne químicament la seva superfície, ja que el material per si sol no té gaire capacitat de que se li adhereixin cèl·lules. Així doncs, aquesta segona part de la preparació té com a objectiu que el material indueixi a una bona adhesió cel·lular. Per poder fer-ho, hem utilitzat Elastin-Like Polymers (ELPs), uns polímers de naturalesa peptídica obtinguts a través de la modificació genètica de la proteïna elastina, d'origen natural. Els ELPs tenen una seqüència específica en la seva cadena, la qual és reconeguda per les proteïnes d'adhesió ubicades a la membrana cel·lular (les integrines). La seqüència és específica del llinatge cel·lular i permet la formació de punts focals, és a dir, punts d'unió entre les cèl·lules i el material. Si no introduíssim ELPs al PLA, les cèl·lules no reconeixerien la superfície i no s'adheririen a ella de forma satisfactòria. Hem fet servir dues classes de ELPs:

- **HRGD6**: incorpora una seqüència d'adhesió cel·lular específica de teixit ossi: el tripèptid "RGD".



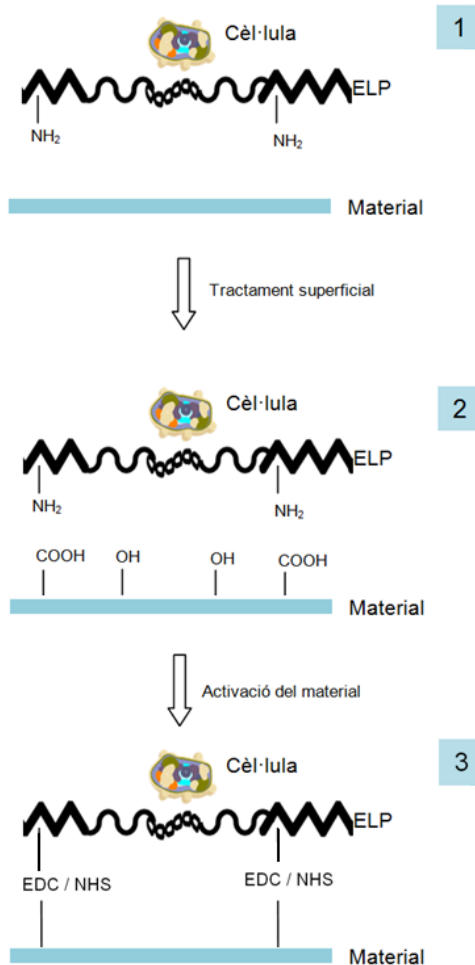
- **REDV**: la seva seqüència d'adhesió cel·lular és específica del teixit epitelial: els aminoàcids "REDV".



D'aquesta forma l'ELP s'uneix a la cèl·lula, però com és lògic l'ELP també s'ha d'unir al material, procés conegut com a funcionalització.

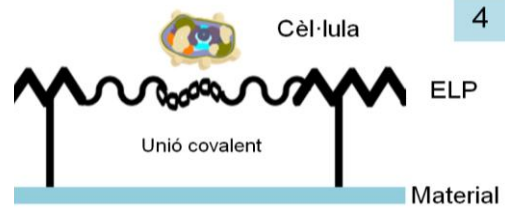
Ho aconseguirem a través de la unió dels radicals *amino* ($-NH_2$) dels ELP amb els radicals carboxils i hidroxils del material. Com que aquests últims no estan lliures a la cadena carbònica que forma el material (vegeu l'esquema 1), s'ha de realitzar un tractament superficial, on es trenquen els seus enllaços ester (hidròlisi éster), deixant-los amb NaOH (0,5M) durant 30 minuts. D'aquesta manera obtindrem radicals lliures (vegeu l'esquema 2).

Un cop acabat el tractament superficial, es realitza un procés anomenat activació del material, necessari perquè per si sol no és capaç d'unir els seus radicals lliures amb els grups *amino* dels ELP (vegeu l'esquema 3).



S'utilitzen dues molècules conegudes com a "crosslinkers" (molècules entrecruadores), que són l'EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) i l'NHS (N-hydroxysulfosuccinimide). És important fer primer el tractament superficial, perquè l'hidròxid de sodi (NaOH) que hem utilitzat llavors fàcilment alterarà els crosslinkers que fem servir a l'activació. La funció d'aquestes dues molècules entrecruadores és formar un complex intermediari unit al material, ja que pot reaccionar amb els grups *amino* de les biomolècules ELP, i així permetre la unió.

D'aquesta manera permetran la formació d'enllaços covalents entre els radicals lliures, uns enllaços molt forts i estables.



Els materials estan preparats en unes microplaques per tenir diferents rèpliques de cada ELP. Aquestes plaques tenen uns pous petits on s'han preparat els films del material.

5.2. ASSAJOS DE CARACTERITZACIÓ

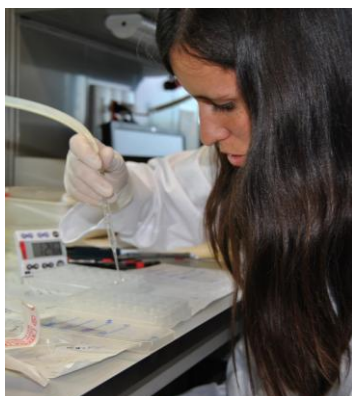
Un cop tenim el material preparat, procedim a fer els assajos de caracterització, per poder determinar les propietats de cada material.

5.2.1. DEGRADACIÓ

L'objectiu d'aquest assaig és determinar la velocitat de degradació dels materials dins d'un medi semblant al del teixit ossi. Si el material s'implantés dins del cos, quedaria recobert per cèl·lules òssies, i com que el medi intern d'aquestes està format per una dissolució aquosa, el medi de degradació que farem servir serà aigua. El fet que un material tingui una degradació més ràpida és millor, ja que significa que és més biodegradable i per tant simplifica una repetida intervenció quirúrgica. A més, per molt que un material sigui biocompatible, és un element extern al cos i com menys temps hi estigui dins millor.

La hipòtesi plantejada és la següent: el material amb el component no polimèric (PLA/PEG + NaCl) serà la que es degradarà més ràpid, perquè el PEG és molt més hidròfil i la sal és molt soluble en aigua, i al dissoldre's crearà l'aparició de porus al material i serà més fàcil de degradar-se.

El protocol seguit és el següent: s'han posat mostres de cada material en aigua i a 37°C (temperatura fisiològica del cos) i s'ha mesurat la seva pèrdua de massa al llarg d'un nombre de dies determinat. En aquest assaig no es necessita el material amb ELP, ja que no es treballa amb cèl·lules i per tant no és necessari l'addició d'aquest component, que recordem que té la funció que el material tingui la capacitat de que s'hi adhereixin.



Imatge de l'extracció d'aigua. Un cop s'extreuen les mostres del forn on es troben a 37°C s'han de pesar amb una balança per mesurar la seva massa. Abans, però, se'ls ha de extreure tota l'aigua que contenen amb un xuclador, ja que sinó la seva massa no seria precisa.

5.2.2. CALCINACIÓ

Aquest experiment el realitzem únicament amb el material que conté sal, ja que l'objectiu és saber la quantitat de clorur de sodi i de polímer que hem perdut a la degradació. Per aquesta raó la primera part (pèrdua de massa) la realitzarem conjuntament amb la degradació. Un cop realitzada, procedirem a la calcinació del material en si. El protocol que hem seguit es basa en agafar les mostres degradades, assecar-les, ubicar-les dins del forn amb cicles d'escalfament a 600°C (per tal d'evaporar tot el polímer i que quedi només la sal) i pesar la sal restant. D'aquesta manera podrem saber quanta sal s'ha degradat, a partir de la concentració de sal inicial i de la massa final. Amb aquest assaig es pretén conèixer si l'addició d'aquest tercer component no polimèric fa que el polímer es degradi més ràpidament.

La nostra hipòtesi és que serà així, ja que la sal un cop dissolta formarà uns porus que faran augmentar la superfície de contacte del material amb l'aigua, i d'aquesta manera elevar la velocitat de degradació.

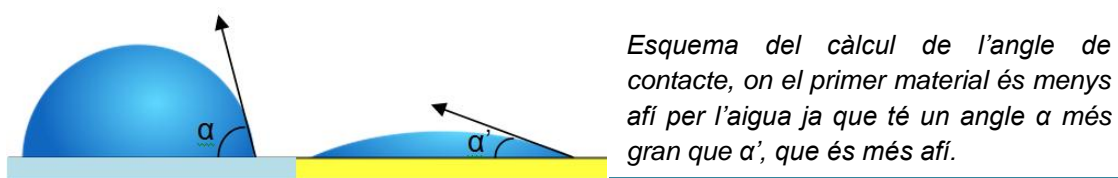


Imatge del forn que s'ha utilitzat per a posar les mostres a uns cicles d'escalfament de 600°C durant 24h per tal que quedés tot el polímer evaporat.

5.2.3. ANGLE DE CONTACTE

L'angle de contacte es realitza per estudiar l'afinitat per l'aigua que tenen els materials. És important saber aquesta dada ja que, com hem dit anteriorment, un cop introduïts a l'organisme seran recoberts per cèl·lules òssies, les quals el seu medi intern és bàsicament una solució aquosa. Si els materials són més hidròfils, tindran més afinitat per les cèl·lules, se n'adheriran més i l'ós es regenerarà més ràpidament.

La tècnica consisteix en calcular l'angle que forma una gota dipositada sobre la mostra. Com més petit sigui aquest angle, més afinitat tindrà per l'aigua i a l'inrevés.



Suposem que els factors que varien l'angle de contacte són la hidrofilitat, ja que si atrau l'aigua l'angle serà més petit, i la topografia del material, perquè si és rugós menys quantitat d'aigua arribarà al material i l'angle serà més gran. En aquest cas provocarà l'efecte Lotus, és a dir, les protuberàncies superficials seran més grans que la gota d'aigua i aquesta no es podrà estendre bé pel sòlid, d'aquesta manera l'angle serà més gran. Així doncs és molt important que el material estigui en forma de film, i que aquest sigui el més llis possible. No és necessari que funcionalitzem el material perquè no hi ha tractament cel·lular.

La nostra hipòtesis és que l'angle de contacte més petit serà de la mostra PLA/PEG (70/30) perquè, encara que la topografia no serà del tot llisa (el PEG és líquid i hi hem dissolt el PLA), el PLA és molt hidròfob i el PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl tindrà una topografia molt rugosa a causa de l'addició del clorur de sodi, que és granulat.



Imatge de les plaques de Petri que contenen les mostres per l'angle de contacte.

5.2.4. FUNCIONALITZACIONS COVALENT / FISISORBIDA

La funcionalització del material, que recordem que era la unió de l'ELP amb el material, es pot efectuar de dues maneres: fisisorbida i covalent. Cadascuna representa uns avantatges i inconvenients:

- *Fisisorbida*: unió amb enllaços de Van der Waals, és a dir, amb enllaços molt febles. Tot i així, com que n'hi ha tants conformen una unió prou estable. Té una simplicitat en el protocol, ja que evadeix tots els tractaments químics en la superfície del material.
- *Covalent*: unió amb enllaços covalents, per tant forts, fixos i permanents. No obstant té una sèrie de passos més costosos en quant a temps i reactius (vegeu a dalt el tractament superficial alhora de funcionalitzar el material amb els ELP), però les seves propietats asseguren una funcionalització més estable que la fisisorbida.

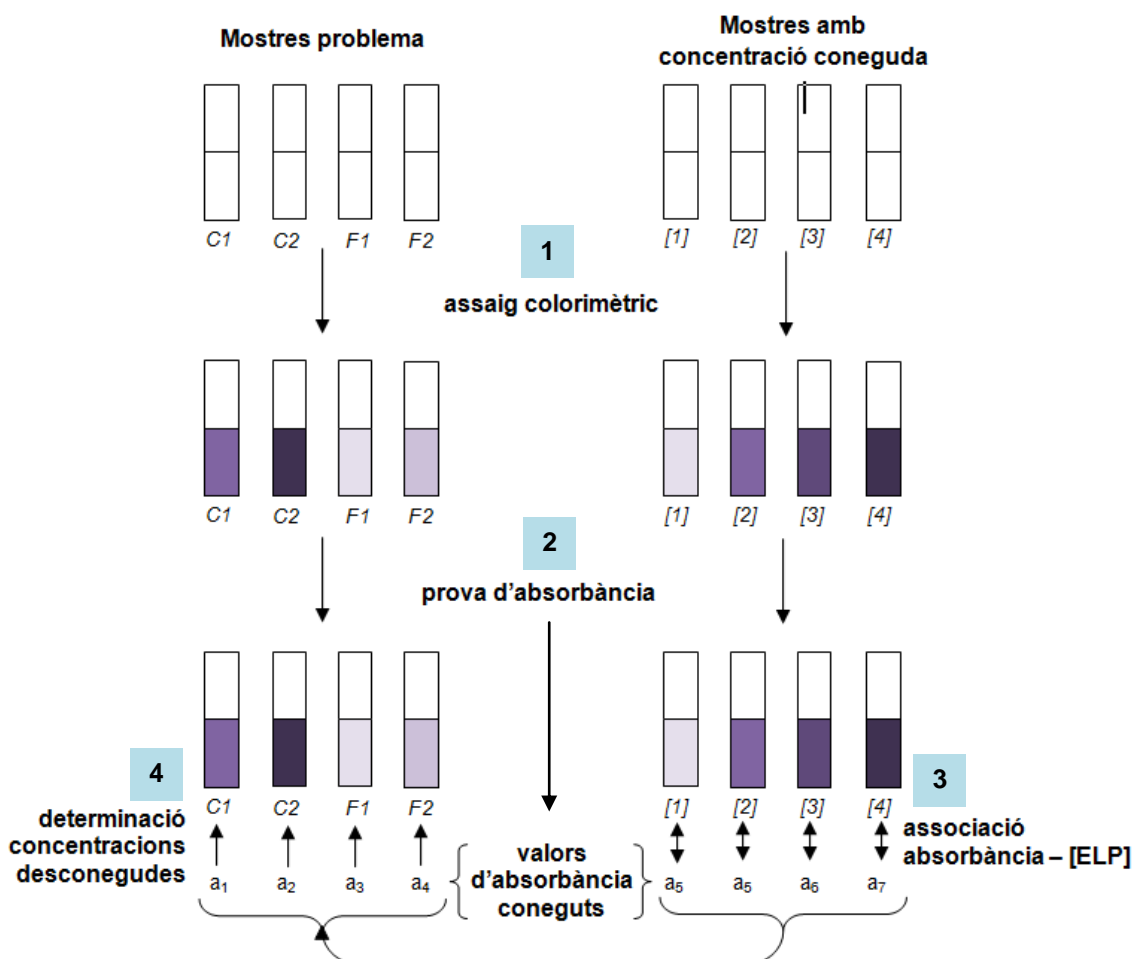
En aquest assaig de caracterització les realitzarem ambdues per determinar quina és la millor, una informació que pot ser rellevant a l'hora d'escollir la metodologia. La nostra hipòtesis en aquesta part de l'experimentació és que la funcionalització covalent serà millor que la fisisorbida, ja que els enllaços són més forts.

Per aconseguir resultats quantitius i poder-les comparar, durem a terme la quantificació de proteïnes (ELP) per gram de material, és a dir, mesurarem la concentració de ELP de cada mostra de material i el que en tingui més unit serà el millor. Aquest procés està format per dues parts: un assaig colorimètric i una prova d'absorbància.

Per fer l'assaig colorimètric s'utilitza el "Working Reagent", un kit format per una dissolució de tres components anomenada microBCA. Aquesta solució produeix una reacció de canvi de color a mescla, segons la quantitat de proteïnes. Aquesta variació de coloració, és deguda a que quan el microBCA detecta els enllaços peptídics de la cadena de l'ELP, redueix el Cu^{2+} -de color verdós- a Cu^+ -de color lila. Així doncs, com més concentració de ELP hi hagi,

més enllaços peptídics hi haurà i per tant el color morat resultant serà més fosc. Aquest assaig l'aplicarem a les mostres problema i també a una altra bateria de mostres amb unes concentracions de ELP conegudes, necessari per la segona part.

La prova d'absorbància és un anàlisi de l'espectre fotomètric, és a dir, segons el to morat de les dissolucions, un aparell dóna un valor anomenat "d'absorbància", que serà més alt com més alt sigui el to violeta. A partir dels resultats de les mostres conegudes que hem preparat anteriorment, associarem diferents valors d'absorbància amb una concentració de ELP i farem una recta patró. Aquesta recta ens permetrà conèixer la concentració de ELP de les mostres problema a partir dels seus valors d'absorbància.



Esquema que mostra com es determina una concentració de ELP desconeguda, mitjançant un assaig colorimètric i una prova d'absorbància (C1 i C2 representen concentracions amb funcionalització covalent desconeguda i F1 i F2 fisisorbida)

5.3. CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA BIOLÒGICA

Hem cultivat cèl·lules de medul·la òssia de rata sobre els materials funcionalitzats amb els diferents ELP, per observar en quin d'ells s'hi adhereixen més cèl·lules i millor, que determinarem segons les seves àrees.

La hipòtesis d'aquest experiment és que les cèl·lules amb HGDR6 s'adheriran més satisfactòriament, i per tant viuran més i creixeran millor que les que estiguin amb REDV, ja que l'HGDR6 és es específic pel teixit ossi. En aquest assaig, a més de veure quin ELP és millor per a les cèl·lules òssies, podrem veure experimentalment si aquests biomaterials són biocompatibles en contacte amb les cèl·lules, encara que ja s'ha estudiat prèviament en altres investigacions.

Seguim el següent protocol: preparació del medi i de les cèl·lules a sembrar, sembra de les cèl·lules al material i preparació de solucions per la tinció, fixació i tinció fluorescent. En tot moment s'han guardat les cèl·lules i els medis dins de unes incubadores de CO₂, que manté la temperatura i la pressió a nivells fisiològics, per tal de que les cèl·lules no es morin. Mitjançant un microscopi òptic invertit s'han pres fotografies de les cèl·lules, a partir de les quals s'han calculat les seves àrees. S'ha utilitzat fibronectina com a control positiu, ja que és una substància en la que les cèl·lules s'hi adhereixen molt fàcilment; i BSA com a control negatiu, que és una fracció proteica, una barreja de proteïnes que promouen l'adhesió i l'expansió de les cèl·lules, d'un fetus boví. Sembla contradictori que utilitzem com a control negatiu una substància que promogui a la adehsió, però cal tenir en compte que aquest sèrum s'inactiva davant del medi que prepararem pel cultiu, ja que el reconeix com a possible proteïna que competiria per la adhesió cel·lular. En aquests controls no hi hem afegit ELP, ja que no és necessari.

5.3.1. CÈL·LULES UTILITZADES

Les cèl·lules que utilitzem són mesenquimals (molt sovint abreviades com a MSC), que van ser extretes del moll de l'os del fèmur de rates de deu dies de

vida. S'utilitzen rates joves perquè comparades amb les velles aquestes produeixen més quantitats de cèl·lules mare. Aquestes cèl·lules són multi potencials, és a dir, que poden donar lloc a més d'un teixit, en aquest cas poden donar lloc a teixit adipós, muscular, ossi i cartilaginós. En funció del medi on es troben (normalment és el mateix medi en totes però varia els suplementes específics que s'hi afegeixen), es converteixen en un teixit o en un altre. L'enginyeria de teixits realitza aquest procés mitjançant bastides o scaffolds. Nosaltres n'utilitzarem ja que aquests contribueixen a la diferenciació cel·lular.

5.3.2. PROTOCOLS

Hem començat preparant dos medis diferents pel cultiu: un sense sèrum i amb sèrum, conegut com a medi complet. Després de descongelar les cèl·lules per preparar els cultius, les hem deixat al medi complet preparat, i al cap de tres dies aquestes estaven enganxades a la superfície del flascó.

Com que les volem sembrar, les hem de desenganxar amb tripsina, però abans s'extreu el sèrum ja que l'inactiva. Un cop estan desenganxades, es fa una centrifugació per obtenir només les cèl·lules. Prèviament a sembrar-les, utilitzarem un utensili anomenat "cambra de Neubauer" per determinar la concentració cel·lular, així sembrarem un nombre conegut i fix de cèl·lules a cada material.

Un cop es coneixen aquestes dades, procedim a sembrar-les. S'agafa una quantitat coneguda de cèl·lules i es barregen amb medi sense sèrum, ja que volem que les cèl·lules s'adhereixin al material per enllaços peptídics i no per el sèrum.

Per mirar les cèl·lules pel microscopi, necessitem que estiguin tenyides fluorescentment. Per fer-ho es necessita un fixador, una substància que permet que les dissolucions que produeixen la tinció s'adhereixin a les cèl·lules, mitjançant els seus grups aldehids, que reaccionen amb els grups *amino* de la cadena proteica de l'ELP i queden units.

Abans, però, preparem tres solucions diferents:

- Solució reductora de l'autofluorescència i necessària per la fixació: PBS - Gly.
- Solució que permet l'entrada dels compostos de tinció al citoesquelet i al nucli: PBS – Gly + Tryton x-100.
- Solució que el fixador requereix: Sacarosa + aigua Milly-Q.

Després es prepara el fixador i, un cop posat a les cèl·lules, es preparen dues dissolucions de tinció, una que tenyirà el citoesquelet i l'altre el nucli.

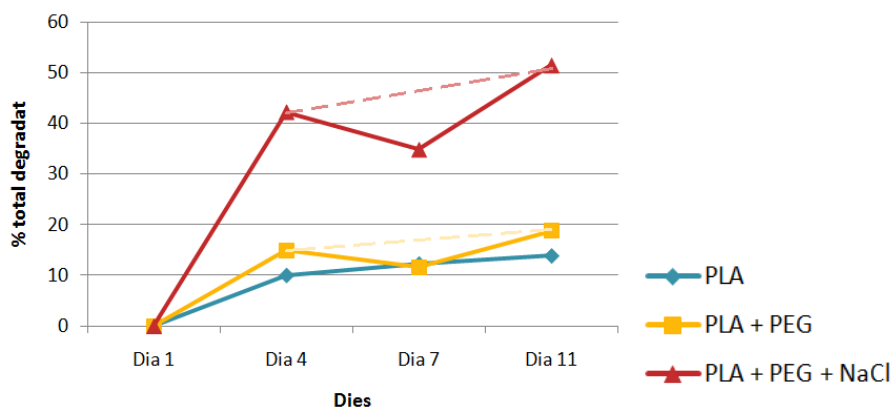
Un cop tenyides, les hem observat per un microscopi invertit. Més endavant voldrem calcular l'àrea de les cèl·lules, per poder saber quines s'han adherit millor. Per poder fer-ho, necessitem tenir una escala de les fotografies píxel – μm i també fotografies de les cèl·lules. A partir de les àrees, crearem un histograma amb l'excel per saber la distribució de la població a cada mostra. Com més àrea té una cèl·lula, significa que és més allargada, cosa que vol dir que s'ha adherit.

5.4. ANÀLISI DELS RESULTATS I CONCLUSIONS

5.4.1. DEGRADACIÓ

A la següent taula hi ha anotades les masses de les mostres que hem pesat al llarg dels dies i les seves mitjanes, així com el càlcul del tant per cent que total de cada mostra i degradat:

Mostra		Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11	
PLA	Massa (g)	1	0,0406	0,0375	0,0355	0,0349
		2	0,0345	0,0305	0,0305	0,0298
		3	0,0137	0,0119	0,0119	0,0118
		M	0,0296	0,0266	0,0260	0,0255
	% total		100	89,98	87,73	86,15
	% degradat		0	10,02	12,27	13,85
PLA/PEG	Massa (g)	1	0,018	0,0145	0,0149	0,0137
		2	0,0154	0,014	0,0142	0,0129
		3	0,0168	0,0142	0,0153	0,0142
		M	0,0167	0,0142	0,0148	0,0136
	% total		100	85,06	88,45	81,27
	% degradat		0	14,94	11,55	18,73
PLA/PEG + NaCl	Massa (g)	1	0,0457	0,0278	0,0261	0,0247
		2	0,0425	0,0278	0,0294	0,0191
		3	0,0455	0,0216	0,0316	0,0211
		M	0,0446	0,0257	0,0290	0,0216
	% total		100	57,74	65,15	48,54
	% degradat		0	42,26	34,85	51,46



Gràfic que mostra la relació entre tant per cent degradat i el temps. Es pot observar una degradació més ràpida en el material que conté clorur de sodi en comparació amb el PLA/PEG (70/30) i el PLA, molt més lenta. Es pot apreciar un error de mesura el dia 7.

S'observa que el PLA / PEG (70/30) + 50% NaCl es degrada molt més ràpid que el PLA / PEG (70/30) i que el PLA només es degrada molt lentament. Això pot ser degut a que el PEG és molt més hidròfil, té més afinitat per l'aigua i es degrada més ràpidament, ja que la sal és molt soluble en aigua. Quan el PLA està sol és poc degradable perquè té un 95% de xarxes cristal·lines, ja que les estructures d'aquest tipus dificulten el seu trencament i per conseqüència al despreniment del material. En canvi, quan ho barregem amb PEG augmenta la seva capacitat de degradar-se, causat probablement perquè té menys pes molecular i trenca les xarxes cristal·lines del PLA.

En conclusió, es pot assenyalar que en termes de nivell de degradació és millor utilitzar PLA/PEG (70/30) afegint un 50% de sal, ja que en una hipotètica intervenció quirúrgica el material introduït seria reabsorbit pel cos d'una forma ràpida, el que podria impedir l'aparició de possibles problemes sorgits per una llarga estada d'un material extern al cos.

5.4.2. CALCINACIÓ

A partir de les masses de les mostres després de la calcinació, s'ha pogut calcular el tant per cent de polímer perdut total durant els dies de degradació, anotat a la taula següent:

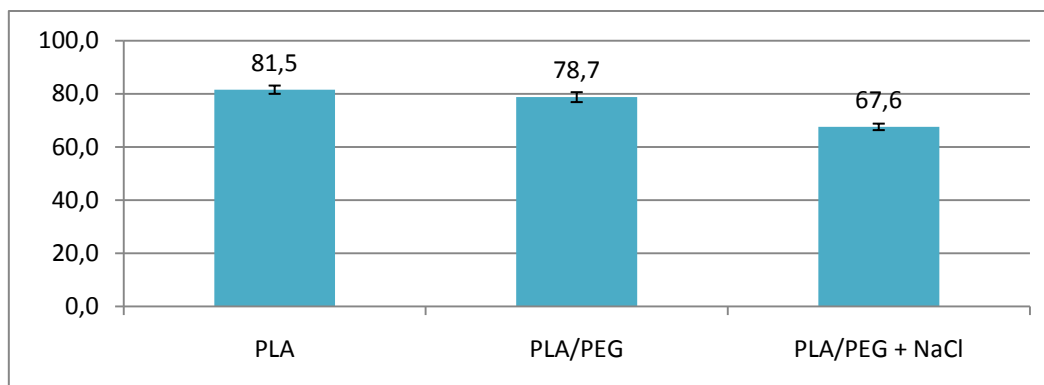
% polímer perdut total			
1	2	3	Mitjana
85,80%	90,54%	77,31%	84,55%

Com es pot extreure dels resultats de la taula, es va perdre una mitjana de 84,55% de polímer en la degradació del PLA / PEG (70/30) + 50% NaCl. Respecte a una degradació de 18,73% en el material que no contenia clorur de sodi, es pot afirmar clarament que la barreja polimèrica es degrada en molt més percentatge si s'afegeix la sal, no únicament pel fet que la sal és molt degradable en l'aigua, sinó que la degradació del polímer també augmenta considerablement.

5.4.3. ANGLE DE CONTACTE

A la taula que hi ha a continuació, estan anotats els angles obtinguts mitjançant l'aparell de mesura que calcula l'angle de contacte de cada material, la mitjana de cada mostra:

Mostres	PLA	PLA/PEG	PLA/PEG + NaCl
1	81,4	76	66,2
2	85,5	77,3	64,7
3	82,3	79	69,9
4	78,8	76,1	66
5	77,2	78	71
6	84,0	86	67,5
m	81,5	78,7	67,6



Gràfic que compara les mitjanes dels diferents angle de contacte de les mostres per poder observar gràficament les diferències entre materials. Amb una barra vertical està marcada la desviació estàndard de cada mostra.

Es pot establir que l'angle de contacte és més alt en PLA sol, d'una mitjana de $81,53^\circ$, el que significa que és més hidròfob, tal com ens esperàvem. En canvi, les mostres de PLA / PEG (70/30) + 50% NaCl, tenen un angle de contacte més petit, una mitjana de $67,55^\circ$, és a dir que són més afins amb aigua, també corroborant la hipòtesi. El PLA / PEG (70/30) té un angle de contacte de $78,73^\circ$, més petit que el de PLA sol, el que significa que és més afí amb l'aigua i que les propietats del PEG influeixen més en la angle de contacte que la topografia del material, ja que aquesta mostra era més rugosa que el PLA sol. Aquest segon assaig de caracterització ens torna a recalcar que el material que conté clorur de sodi seria més adequat ja que és més afí en aigua, condició favorable perquè se li s'adherissin més cèl·lules en el seu hipotètic ús com empelt ossi.

No obstant això hi ha poques diferències estadístiques significatives per poder extreure conclusions rellevants en aquest cas. A causa d'això, hem de tenir en compte quins factors influeixen en variar els angle de contacte: la hidrofobicitat i la topografia. Precisament les poques diferències entre materials poden ser degudes a que no estiguessin ben enganxades a la superfície i per tant la seva topografia pot haver variat. També pot haver influït una velocitat d'evaporació amb el cloroform en la formació de les pel·lícules inadequada i que variessin les propietats del material (més o menys hidròfil) o que no es formés un film perfecte (canvis en la topografia).

5.4.4. FUNCIONALITZACIONS COVALENT / FISISORBIDA

A partir dels resultats de la absorbència de la recta patró mesurats pel espectrofotòmetre i de les concentracions conegudes, hem realitzat una funció recta que ens relaciona els valors de absorbència amb els valors de concentració, ja que mantenen una relació lineal i directament proporcional (a major quantitat de ELP, més color violeta a l'assaig microBCA i per tant més absorbència mesurada per l'espectrofotòmetre). A la següent taula hi ha els valors de absorbència mitjans de cada mostra i els càlculs de la concentració a partir de la fórmula de la recta:

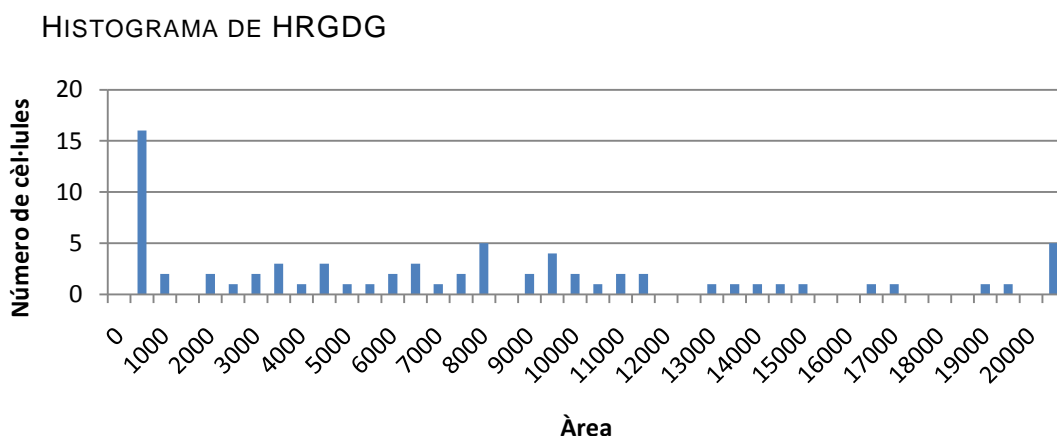
Mostra	Absorbancia (y)	Càlculs	Concentració ug/ml (x)
<i>Covalent</i>	0,30956667	$y = 0,0107x + 0,1104$	18,6137072
<i>Fisisorbida</i>	0,1815	$x = (y - 0,1104) / 0,0107$	6,64486007

A partir d'aquesta taula podem afirmar que la funcionalització realitzada covalentment té una concentració més elevada de ELP comparada amb la fisisorbida per tant és millor funcionalitzar covalentment que per fisisorbsió, una informació que pot ser rellevant a l'hora de triar la metodologia, ja que com més proteïna hi ha, més cèl·lules se li adheririen.

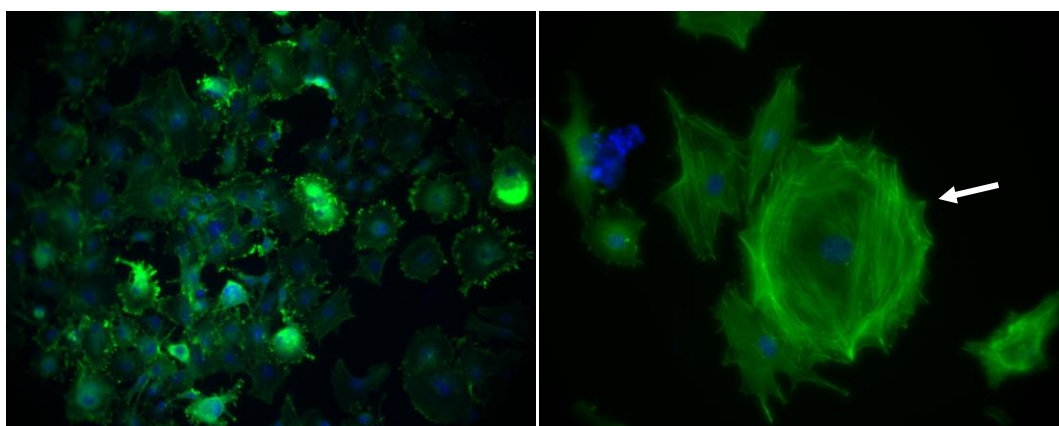
5.4.5. ANÀLISI DE LA RESPOSTA BIOLÒGICA

A partir de les àrees de les cèl·lules hem realitzat uns histogrames on s'indica la freqüència d'àrees mòbils en trams. En el control negatiu (BSA) no s'observa

cap cèl·lula adherida, com esperàvem, i en el control positiu (FN) hi ha moltes cèl·lules i molt estirades: es veuen molt clarament les fibres d'actina i predominen les àrees de 3000-9000 μm^2 . A més, hem realitzat fotografies de les cèl·lules que ens permeten observar els punts focals (punts d'unió entre la cèl·lula i el material) i les dimensions de la cèl·lula. A continuació hi ha l'anàlisi dels resultats de cada ELP a nivell individual:

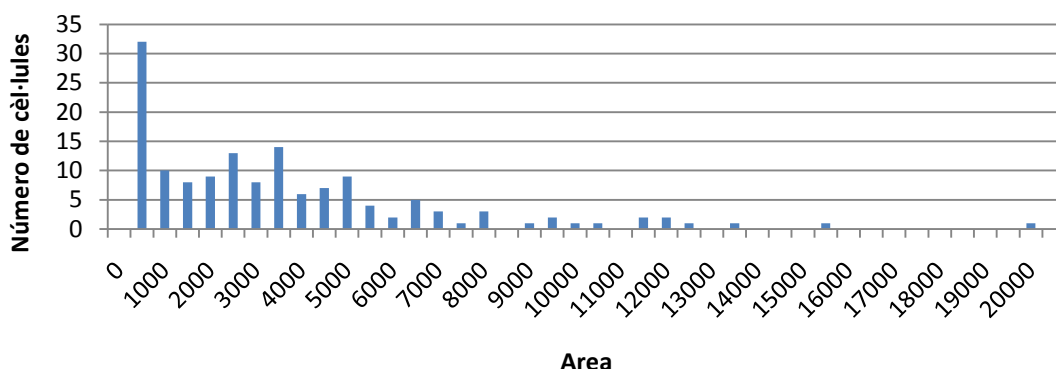


Hi ha molta diversitat de mides i una gran quantitat de cèl·lules, cosa que significa que el material seria apte per induir a una regeneració òssia. Observant les fotografies realitzades amb el microscopi, s'observa que les cèl·lules presenten molts punts focals (unions amb el material, marcades amb una fletxa a la fotografia de la dreta), que mostren una bona adherència. A més també es poden veure les fibres de la cèl·lula molt marcades, fet que indica que estan ben estirades i en creixement.

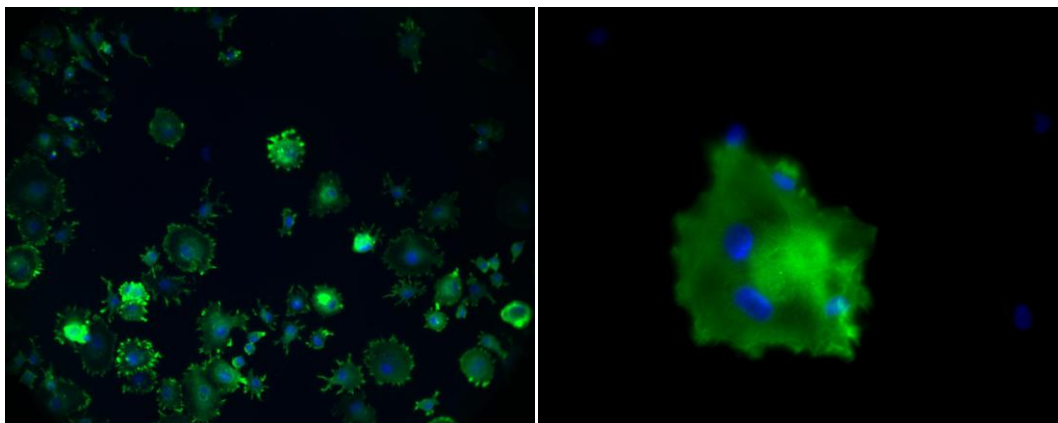


Fotografies amb el microscopi de les cèl·lules cultivades sobre HRGDG. La de l'esquerra està feta amb un augment de 20x i la de la dreta amb 40x.

HISTOGRAMA DE REDV



Les cèl·lules són una mica més petites que les del HRGDG, amb molta freqüència en les àrees de 500 a 5000 μm^2 , i que també n'hi ha molta quantitat en general. Observant les fotografies de sota, es veu que les cèl·lules han adoptat una forma més arrodonida i amb menys punts focals que les del primer ELP. A la fotografia de la dreta gairebé no es veuen fibres marcades de la cèl·lula com es veien amb l'HRGDG, sinó que apareixen moltes cèl·lules amuntegades. Això pot ser degut a que no s'han estirat del tot bé o que no s'han sembrat perfectament.



Fotografies amb el microscopi de les cèl·lules cultivades sobre REDV. La de l'esquerra està feta amb un augment de 20x i la de la dreta amb 40x.

A partir dels resultats podem concloure que és millor utilitzar HRGDG perquè s'adhereixen moltes més cèl·lules i millor, presentant àrees molt més grans, a més amb la formació de molts punts focals. Tot i així, hem vist que l'REDV també és compatible per cèl·lules òssies, ja que per molt que les cèl·lules no estiguin tan estirades ni n'hi hagin tantes, n'ha adherit més de les esperades.

6. CONCLUSIONS

Un cop finalitzat el treball, s'ha aconseguit l'objectiu principal, verificar la hipòtesi inicial: els materials biodegradables que actualment són investigats per l'enginyeria de teixits, seran una solució amb moltes perspectives de futur als problemes actuals en el tractament de lesions del teixit ossi. L'hem corroborat primerament a nivell teòric i després a nivell pràctic, on hem preparat biomaterials i hem observat com indueixen a una regeneració òssia i que són degradables. L'entrevista a la doctora Melba Navarro ha ajudat també a corroborar la hipòtesi.

L'ús de materials per al tractament de lesions òssies es remunta a fa milers d'anys, però l'ús del mètode tradicional comporta nombrosos problemes, com ara repetides intervencions quirúrgiques. Per aquest motiu als anys seixanta va sorgir un nou camp de la ciència anomenat enginyeria de teixits, que combina els coneixements de la medicina amb altres àmbits, com la química, la biologia o l'enginyeria de materials. Aquest canvi va permetre crear uns materials modificats per ser incorporats al cos, anomenats biomaterials, que realitzen la funció del teixit que substitueixen com si fos viu.

Mitjançant variacions en metodologia, tractaments d'estructura interna i superficial del material, entre d'altres aspectes, s'aconsegueixen cada vegada uns materials més adients, que fins i tot uns que són capaços de induir a la regeneració òssia. Ja més recentment ha sorgit una nova branca on s'estudien materials que tenen la capacitat de degradar-se dins del cos, per evitar una repetida intervenció quirúrgica.

El teixit ossi està format per una part mineral i una xarxa proteica (bàsicament col·lagen), organitzades en la part exterior en forma de matriu sòlida i calcificada i l'interior en forma esponjosa. Dins de la matriu calcificada els ossos tenen unes unitats bàsiques estructurals anomenades osteones o sistemes de Havers. Entre aquestes es troben unes llacunes on hi ha moltes cèl·lules òssies vives, anomenades osteòcits. Aquestes abans havien estat a la part esponjosa de l'os en una forma diferent, on renovaven el teixit mitjançant

un cicle anomenat regeneració òssia. En aquest procés primer hi ha la resorció òssia, quan unes cèl·lules anomenades osteoclasts descomponen l'os, i a continuació la reconstrucció, quan els osteoblasts creen noves fibres de col·lagen i minerals, recobrint el teixit antic i formant l'os nou.

Tenint en compte com es comporten les cèl·lules òssies, quan el nou biomaterial implantat entri en contacte amb elles, aquestes el recobriran, adherint-se a ell i creant una nova capa de cèl·lules al seu voltant. El material s'anirà degradant al llarg del temps i serà reabsorbit pel cos, i els espais que va deixant seran recoberts per cèl·lules noves que el mateix cos crearà. Aquest aspecte és molt important ja que el material no necessita cap agent biològic que indueixi a la regeneració, a més que no produeix cap tipus de rebuig i és eliminat al cos sense cap alteració. Aquestes característiques solucionen doncs els problemes que el mètode tradicional comporta, esmentats abans.

Abans que un biomaterial degradable s'utilitzi en pacients, ha de passar per un seguit d'assajos al laboratori per determinar si és biocompatible, és a dir, si és apte per ser implantat dins del cos, tan a nivell de tolerància del cos o de manteniment de les seves propietats al llarg de la degradació, entre d'altres.

A la part experimental hem preparat i funcionalitzat tres materials biodegradables de naturalesa polimèrica, hem realitzat varis assajos de caracterització i hem fet una simulació *in vitro* amb un cèl·lules òssies.

A la primera part es prepara el material, de tal manera que es trobi en les condicions que cada assaig posterior li requereix, i es funcionalitza amb un ELP (Elastin-Like Polymers), és dir, se li dóna la capacitat de que se li uneixin cèl·lules amb una substància de naturalesa peptídica, on s'hi adhereixen amb facilitat.

Els assaigs de caracterització que s'han efectuat són els següents: degradació, on s'ha establert quin dels materials és més biodegradable; calcinació, on s'ha quantificat la quantitat de fase inorgànica dins d'un material compost, en aquest

cas la sal; angle de contacte, on s'ha conegut la rugositat superficial i la hidrofòbia de cada material; comparació entre funcionalització covalent i fisisorbida, on s'ha determinat quina de les dues és més efectiva; i cultiu cel·lular, on s'ha contrarestat la resposta biològica en diferents ELP. Els resultats i conclusions extretes de la part experimental es troben a l'apartat 5.4. Anàlisi dels resultats i conclusions.

VALORACIÓ DEL TREBALL

Valoro molt positivament aquest treball ja que m'ha fet interessar-me encara més en una ciència multidisciplinària i m'ha fet decidir sobre el meu grau universitari i, molt probablement, la meva dedicació professional en la recerca.

A banda dels continguts teòrics, he après molt sobre com es treballa en un laboratori, procediments que es fan servir, com es fa un disseny experimental, entre moltes més coses que m'han donat una idea de com és la recerca. A més, aquest treball m'ha aportat valors com és el treball en grup i el respecte dins d'un laboratori, ja que sense una bona cooperació la ciència no hauria arribat fins on es troba ara, o també la constància, perquè gràcies al treball diari estic molt satisfeta del treball acabat.

AGRAÏMENTS

Primer de tot vull agrair a la meva tutora del treball, Rosa Justríbó, pel seguiment de tot el desenvolupament, per guiar-me sempre que ho he necessitat i per la seva dedicació al treball.

També vull donar les gràcies al Programa de Joves i Ciència de CatalunyaCaixa, per la beca per a realitzar les meves pràctiques experimentals a l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), ja que no només m'ha permès fer tot el treball de camp del treball, sinó que m'ha deixat fer un tastet del que és la recerca actualment de l'enginyeria de teixits i m'ha fet decidir per el meu futur universitari. A més, aquest mateix programa m'ha donat la oportunitat de presentar-me a l'ExpoE²C³ d'enguany i a l'Exporecerca 2012, amb un pòster sobre la temàtica del treball (vegeu l'annex D.).

D'altra banda vull agrair a l'organització de les "IV Jornades Sobre l'Ensenyament de la Química", per permetre'm la publicació d'un article sobre el tema tractat al treball (vegeu l'annex B.) dins del seu recull de ponències de la jornada.

Valoro molt el gran esforç que els científics de l'IBEC han fet per deixar entrar estudiants de batxillerat a treballar amb ells i especialment vull agrair als estudiants de doctorat Aitor Sánchez, Tiziano Serra i Xavier Puñet per les explicacions, el seguiment i la dedicació durant la meva estància, i a la doctora Melba Navarro, per les explicacions i l'entrevista. També els dono gràcies per parlar de nosaltres a la seva revista de l'IBEC (veure annex E.).

Finalment, vull fer menció de Joaquim Viñes, el meu company de pràctiques, ja que vam realitzar conjuntament tota la part experimental, una memòria pel programa (vegeu l'annex C.) i el pòster per l'ExpoE²C³; Milford Edge, per les seves correccions a un article científic en anglès, requisit necessari per obtenir plaça a l'IBEC; i a tots els familiars i amics que han dedicat un temps a llegir i corregir el treball, com també a escoltar l'exposició oral.

7. FONTS D'INFORMACIÓ

7.1. BIBLIOGRAFIA

LLIBRES

- BASSEY, Joan, DINAN, Susie. *Cómo fortalecer los huesos*. Londres: Parramón Ediciones S.A, 2002.
- MAUTALEN, Carlos. *¿Tiene usted osteoporosis?* Buenos Aires: Liudin, 1996.
- FAWCETT, D.W. *Tratado de histología*. Mèxic: Mc. Graw Hill – Interamericana, 1997. 11a. edició.
- THIBODEAU, Gaby A.; PATTON, Kevin T. *Estructura y función del cuerpo humano*. Madrid: El sevier, 2003. 4a. edició.
- DERRICKSON, Bryan H.; TORTORA, Gerard J. *Principles of Anatomy and Physiology*. Buenos Aires: John Wiley & Sons, 2006. 11a. edició.

ARTICLES

- HENCH, L.; ETHRIDGE, E. "Biomaterials. An interfacial approach." *Biophysics and Bioengineering Series*, vol.4 (1982), Academic Press NY.
- WILLIAMS, DF. "Biomaterials and biocompatibility." *Med Prog Technol*, núm.4 (1976), p.31-42.
- MURRAY, P.; GARCIA GODOY, C; GARCIA GODOY, F. "How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated?" *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, núm.12E (2007), p.258-266.
- MARQUES, A.; REIS, R.; HUNT, J. "The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies." *Biomaterials*, núm.23 (2002), p.1471-1478.
- CHANG, Y.; LIANG, H.; SUNG, H.; TSAI, C. "In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin)". *Biomaterials*, núm. 23 (2002) p.2447-2457.

- LIZARBE, Maria Antonia. "Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular". *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*, vol. 101 núm. 1 (2007), p. 227-246.
- ESTRADA, Catalina, LÓPEZ, Luis Ernesto, PAZ, Ana Cristina.. "Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas". *EIA*, núm. 5 (juny 2006), p. 93-100.

7.2. RECURSOS ELECTRÒNICS

- *Centro Médico Maestranza*. [Consultat el 08/08/2011]
<<http://www.cmaestranza.com/diccionario-medico/58-i.html?showall=>>>
- *Elmundo.es.DMedicina*. [Última actualització 05/08/2010]
<<http://www.dmedicina.com/enfermedades/musculos-y-huesos/osteoporosis>>
- Universitat de Barcelona [Consultat el 14/01/2012]
<<http://www.ub.edu/ibub/img/EVA-HELIX1-WEB.jpg>>

8. ANNEXOS¹

ANNEX A. INFORME I PROTOCOLS DE PRÀCTIQUES

ANNEX B. ARTICLE DE LES “IV JORNADES SOBRE L’ENSENYAMENT DE LA QUÍMICA”

ANNEX C. MEMÒRIA DE L’ESTADA A L’IBEC

ANNEX D. PÒSTER

ANNEX E. NOTÍCIA A LA REVISTA DE L’IBEC SOBRE LA NOSTRA ESTADA

¹ Tots els annexos excepte l'E són molt semblants, amb continguts molts cops idèntics, tan entre ells com amb el treball de recerca. És així perquè són de la mateixa temàtica i han requerit una determinada presentació segons l'organització a on els he enviat (com en els annexos B, C i D) o que a partir d'ells he fet el disseny experimental d'aquest treball de recerca.

ANNEX A.

INFORME I PROTOCOLS DE PRÀCTIQUES

ARTICLE DE LES “IV JORNADES SOBRE L’ENSENYAMENT DE LA QUÍMICA”

¹ Aquest article és en castellà perquè l'organització de les IV Jornades Sobre l'Ensenyament de la Química ho demanava, ja que les jornades van anar dirigides a nivell estatal.

ANNEX C.

MEMÒRIA DE L'ESTADA A L'IBEC

ANNEX D.²

PÒSTER

² Les mides originals d'aquest pòster són d'un metre d'altura i 70 centímetres d'amplada, el que està annexat és una miniatura en A3.

ANNEX E.³

NOTÍCIA A LA REVISTA DE L'IBEC SOBRE LA NOSTRA ESTADA

³ Aquesta notícia ha aparegut a l'última revista biennial de l'IBEC. Annexada només hi ha la pàgina 6, on es troba la notícia. La revista completa es pot trobar a:
http://www.ibebarcelona.eu/images/stories/downloads/insideibec_issue3web.pdf

INFORME I PROTOCOLS DE PRÀCTIQUES

1. Preparació del material	- 2 -
1.1. Preparació dels films.....	- 2 -
1.2. Funcionalització del material.....	- 5 -
2. Experimentació.....	- 10 -
2.1. Cultiu cel·lular	- 10 -
2.2. Degradació	- 25 -
2.3. Calcinació.....	- 26 -
2.4. Angle de contacte.....	- 29 -
2.5. Absorbància de la funcionalització covalent / fisisorbida	- 30 -



1. PREPARACIÓ DEL MATERIAL

1.1. PREPARACIÓ DELS FILMS

El primer que farem serà preparar els films per a la degradació, l'angle de contacte i la calcinació:

1. Hem preparat tres dissolucions formades per 50 ml de cloroform (CHCl_3) i polímers diferents en les proporcions indicades entre parèntesis:
 - PLA: dissolució del 2,5 %_{w/v} (pes/volum). Com que tenim 50ml de cloroform, en corresponen 1,25g de PLA. Els hem pesat amb una balança i hem fet la dissolució amb un vas de precipitats.
 - PLA/PEG (70/30): dissolució final de 2,5 %_{w/v}. Per tant corresponen 1,25g de solut (polímer), i com que la proporció és 70g de PLA per 30g de PEG, necessitem 0,875g de PLA i 0,375g de PEG. Primer hem pesat PLA i després hem afegit PEG amb una pipeta Pasteur – és líquid a temperatura ambient- fins arribar els 1,25g.
 - PLA / PEG (70/30) + 50% NaCl: com que el clorur de sodi s'afegeix més endavant, hem fet la mateixa dissolució que l'anterior.

Primer hem fet les mescles dels polímers i després hi hem afegit el cloroform, en una campana ja que és tòxic. Amb una proveta i amb l'ajut d'un embut hem mesurat els 50ml necessaris per a cada mescla i els hem posat a un vas de precipitats cadascun. Finalment, hem introduït cada mescla de polímers a un vas de precipitats diferent.

2. Per tal que no es malmetés la mescla, ho hem tornat a tapar amb un tros de paper de plata i a més hem fet servir parafilm, una espècie de cinta adhesiva flexible que ho deixa tapat hermèticament.
3. Finalment ho hem deixat a l'agitador, un aparell amb una placa que es mou a la velocitat que volem, durant 24 hores. Nosaltres la posarem a 150 rpm per tal que les mescles de polímers es dilueixin en el cloroform i així el puguem utilitzar per fer films.

Al cap de 24 hores, hem afegit el clorur de sodi a la tercera mescla:

1. Hem pesat 1,25 g de clorur de sodi trossejat (de dimensions $80\ \mu\text{m} < \text{NaCl} < 210\ \mu\text{m}$), ja que recordem que la mescla és de PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl, i com que de la primera dissolució en tenim 1,25 g, en necessitem la mateixa quantitat de sal.
2. L'hem afegit a la mescla, agitant perquè s'homogeneïtzés.

Hem tret els vasos de precipitats de l'agitador i hem posat les mescles que teníem dins en uns platets de petri de manera homogènia.

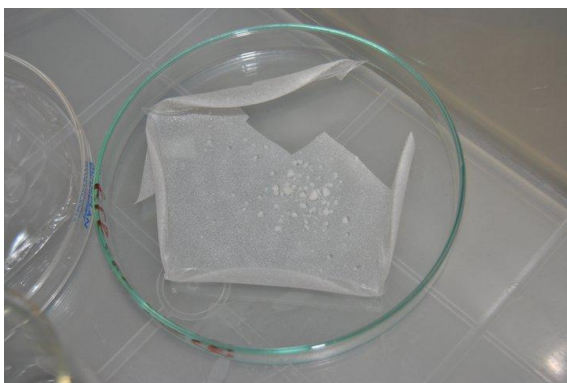
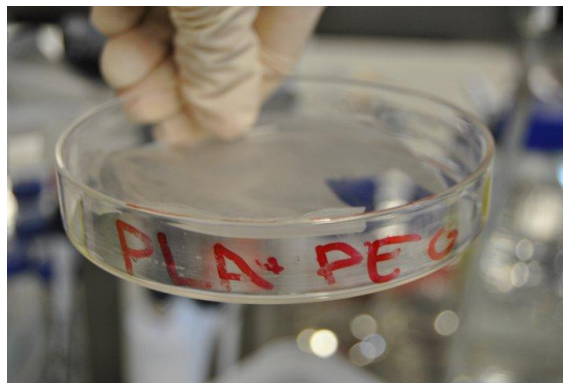
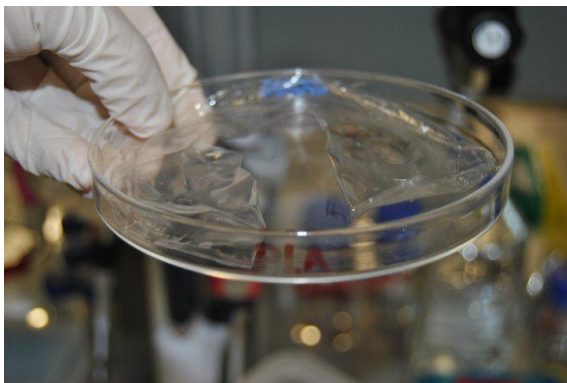
Hem deixat els tres platets de petri tapats en una capsa tapada però no del tot, ja que al seu costat hi hem posat cloroform en un vas de precipitats perquè les mostres no s'evaporin amb molta rapidesa i no quedin arrugades, sinó que es formi un film prim de superfície molt prima. Ho hem anat a fer dins d'una campana de seguretat ja que el cloroform és tòxic. Els deixarem dins durant els dies que facin falta perquè el líquid es torni completament sòlid i llis.



Campana de seguretat amb la capsa que conté les plates de petri per fer els films.

Després d'un dia encara no s'havien format els films perfectament, ja que encara quedava una mica líquid, i hem decidit esperar un dia més.

Al cap de dos dies, hem agafat els films de PLA, PLA/PEG 70/30, i PLA/PEG 70/30 + NaCl 50% de la campana, ja que ja estaven secs i ben llisos. Necessitàvem diferents mostres per fer diferents procediments: degradació, calcinació i angle de contacte. Cada mostra consisteix d'un tros d'1cm² de film aproximadament tallat amb tisores.



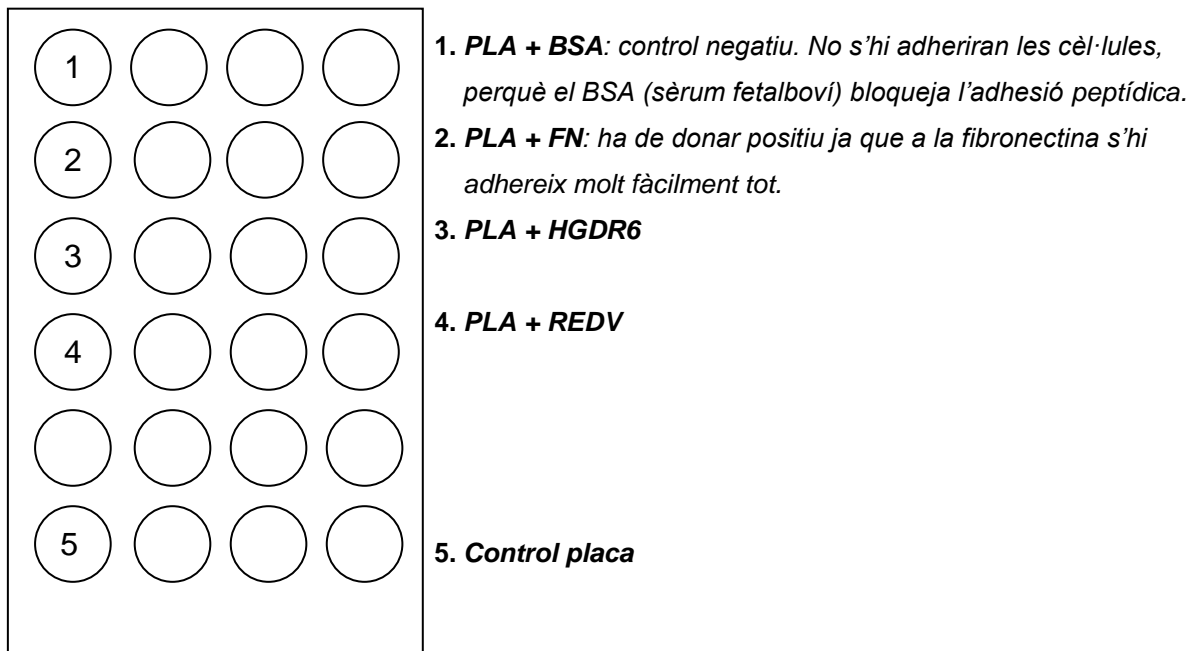
Films després que els hi talléssim les mostres (estan arrugats dels extrems ja que els vam desenganxar per tallar-los). A la imatge de dalt a l'esquerra podem veure el film de PLA, molt llis i transparent, a la de dalt a la dreta hi ha el film de PLA/PEG (70/30), rugós i blanquinós, i la imatge del final correspon al film de PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl, molt més rugosa (es poden observar els granets de clorur de sodi)

A la part de cultiu cel·lular utilitzarem unes microplaques de 24 pous que contindran un film de PLA a les quatre primeres files (setze pous). Per preparar aquest film s'ha seguit el mateix procediment que hem fet per preparar aquests. La microplaca utilitzada és específica per poder-hi treballar amb cloroform.

1.2. FUNCIONALITZACIÓ DEL MATERIAL

1.2.1. FUNCIONALITZACIÓ DEL MATERIAL PER AL CULTIU

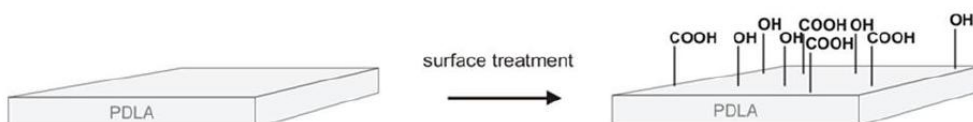
Tenim ja preparada una microplaca de 24 pous on hi havia film de PLA a les quatre primeres files. Esquema de la placa amb les substàncies que hi afegirem més endavant:



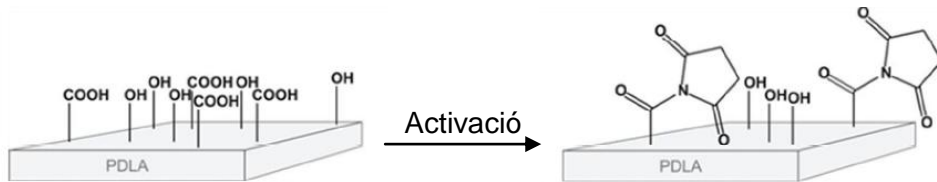
La funcionalització la realitzarem únicament als pous que hi afegim ELP (files número 3 i 4), ja que el sèrum fetalboví (BSA) i la fibronectina (FN) no en necessiten. Procedim a realitzar una funcionalització covalent d'aquests pous, és a dir, a unir l'ELP que afegirem amb el film de PLA de cada pouet amb enllaços covalents.

Per fer-ho duem a terme els següents passos:

1. *Tractament superficial:* afegim 1 ml d'hidròxid de sodi (NaOH), per tal de trencar els enllaços esters del PLA, deixant lliures els grups carboxils i hidroxils. El deixem a la microplaca de cultius durant mitja hora a l'agitador.



2. *Activació del material:* Hem afegit EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), una molècula entrecreudadora (crosslinker), líquida a temperatura ambient. La seva característica principal és que reacciona amb els grups carboxils i es col·loca al lloc on es trobaven aquests, però l'enllaç que crea té poca durada ja que és molt feble i poc estable. Per aquest motiu l'hem afegit conjuntament amb NHS (sòlid a temperatura ambient), també una molècula entrecreudadora que es col·loca al lloc de l'EDC, perquè té un enllaç que dura molt més (una hora aproximadament) i és més estable que el de l'EDC. Posarem aquesta mescla en PBS, una solució tampó amb el pH estable i que té una osmolaritat que coincideix amb la del cos humà.



Per preparar la mescla EDC/NHS, hem calculat la quantitat de cada component que necessitàvem per fer la mescla de proporció 0,1 M/0,2 M en una dissolució de 70 ml de PBS (agafem aquesta quantitat segons les mostres que necessitem):

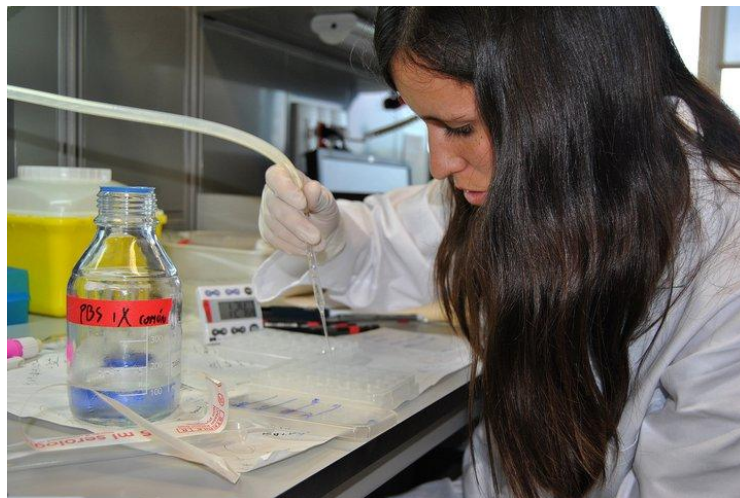
- $M_{\text{EDC}} = 155,24 \text{ g/mol}$
- $M_{\text{NHS}} = 115,09 \text{ g/mol}$
- $d_{\text{EDC}} = 0,875 \text{ g/ml}$

$$70 \text{ ml PBS} \frac{0,1 \text{ mol EDC}}{1000 \text{ ml PBS}} \frac{155,24 \text{ g EDC}}{1 \text{ mol EDC}} \frac{1 \text{ ml EDC}}{0,875 \text{ g EDC}} = 1,238 \text{ ml EDC}$$

$$70 \text{ ml PBS} \frac{0,2 \text{ mol NHS}}{1000 \text{ ml PBS}} \frac{115,09 \text{ g NHS}}{1 \text{ mol NHS}} = 1,611 \text{ g NHS}$$

Hem agitat perquè l'NHS es dissolgués en l'EDC i hem afegit aquesta dissolució amb una pipeta a cada pou. Deixem aquesta mescla durant una hora a l'agitador.

3. Hem fet tres neteges amb aigua, deixant cinc minuts entre neteja i neteja. Després n'hem fet dues més amb PBS. L'objectiu d'aquestes neteges és eliminar la màxima quantitat de NaOH possible, ja que és una base molt forta.



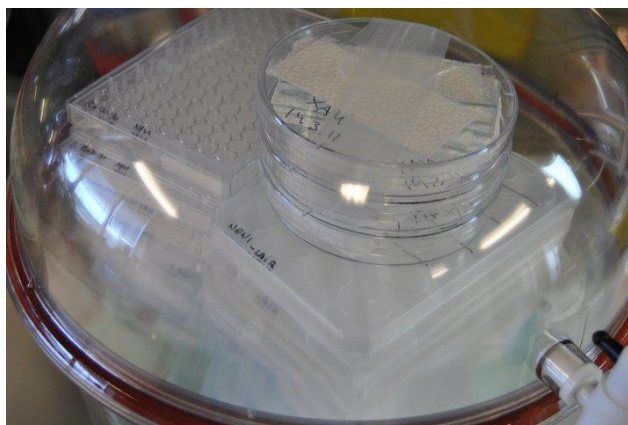
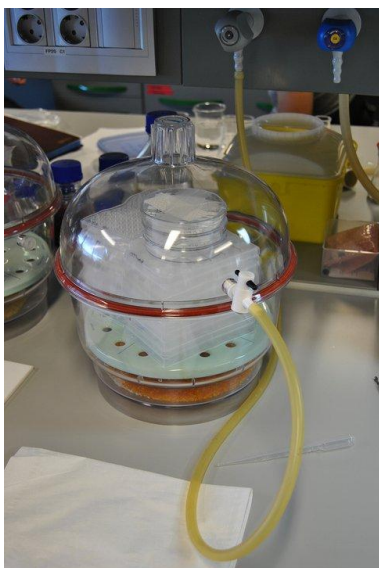
Fent les neteges amb PBS

4. Finalment s'hi afegeix l'ELP. Hem calculat la quantitat de HRGD6 i REDV que necessitàvem. Com que hi havia 4 mostres a cada microplaca de cada material i teníem 4 microplaques, necessitàvem 16 ml de cadascun, però n'hem agafat 20 ml en excés.
5. Per acabar afegim el volum necessari de cada ELP als pous corresponents (veure figura de sota) i ho deixem 24 hores a l'agitador.



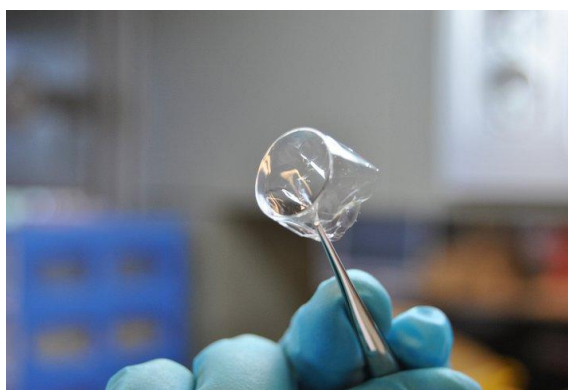
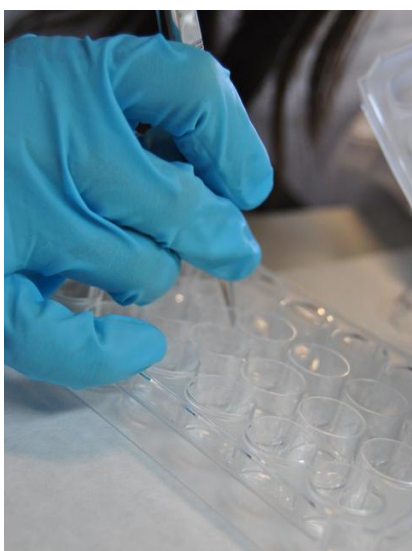
Microplaca que hem utilitzat.

Al cap de 24 hores, hem tornat a netejar els pous de la tercera i quarta fila amb aigua tres cops, esperant cinc minuts entre cada tanda. Després de les neteges, deixem les plaques sense aigua. Després les hem posat dins d'un dessecador, que fa el buit, i a sota conté sílica gel que agafa l'aigua perquè no hi hagi humitat. És de color taronja, i quan es torna blanc significa que no hi ha humitat. Abans de posar-les al dessecador les hem picat contra un paper higiènic perquè quan ho introduíssim tingués la menor aigua possible.



La dessecadora amb les plaques a dins. A la imatge de l'esquerra es pot veure la sílica gel de color taronja per la part de sota.

Hem tret les plaques de la dessecadora després d'una horeta i hem tret tots els films amb unes pinces i els hem posat a unes altres plaques. Ho hem fet ja que les noves plaques, a diferència de les primeres, es poden utilitzar per mirar pel microscopi de fluorescència: són més rígides i transparents. Teníem quatre microplaques de 24 pous i n'hem traspasat dues de les quatre perquè les altres les farem servir de control. Encara que quedin les parets arrugades, l'important és que la superfície quedi plana.



Imatges de quan vam canviar els films de placa. Els vam agafar amb unes pinces.

Al cap d'unes cinc hores hi hem posat BSA i FN a les dues primeres files. Primer hem posat el BSA, que estava a una concentració del 6% en aigua Milli-Q, i ho hem deixat a l'incubadora de CO₂ a 37°C durant 1 hora. Després hi hem afegit la fibronectina a raó a 1 µg/ml i hem tapat hermèticament les plaques utilitzant parafilm. Hem deixat la placa a la nevera a 4°C fins al cap de tres dies.

1.2.2. FUNCIONALITZACIONS COVALENT I FISISORBIDA



1. Hem preparat 6 tubs de 15 mL amb un dit i mig de PLA sense que estigués en forma de film, o sigui granulat, tal qual es treu de la nevera.
2. En cadascun necessitàvem 8 ml de HRGD o sigui que necessitàvem 48 ml.
3. Hem afegit la quantitat necessària a cada tub i ho hem deixat 24 hores a l'agitador.

		HRGD6		REDV	
Volum necessari		Pouets	Tubs	Pouets	Tubs
		20 ml	48 ml	20 ml	-
Total		64 ml		20 ml	

Al cap de 24 hores, hem fet tres neteges amb aigua, esperant cinc minuts entre cadascuna. Hi hem deixat una mica d'aigua i ho posarem en gel sec per liofilitzar-ho (treure l'aigua: fer el buit, canviar la pressió, de gel a gas i evaporació).



Els tubs en gel sec per liofilitzar-se

2. EXPERIMENTACIÓ

2.1. CULTIU CEL·LULAR

Els cultius cel·lulars es realitzen en uns laboratoris especials, que estan optimitzats per tal d'aconseguir les màximes condicions d'esterilització. Mesures del laboratori de cultius i precaucions a tenir en compte per garantir aquestes condicions:

- La sala del vestidor, la qual està entre l'exterior del laboratori de cultius i el passadís on hi ha les diferents sales de cultius, si una de les portes d'aquestes habitacions s'obre, l'altra no es pot obrir fins que la que està oberta es tanqui, per evitar corrent d'aire i que entrin organismes de l'exterior directament.
- Per travessar la porta que dona al passadís on hi ha les diferents sales de cultius, t'has de posar una bata especial, uns peücs, una gorra i uns guants.
- Abans d'utilitzar la sala de cultius, s'ha d'esterilitzar amb una radiació ultraviolada durant quinze minuts que elimina tots els bacteris que hi puguin haver.
- Tots els experiments es realitzen dins d'unes cabines de seguretat biològica, anomenades cabres de flux laminar. Quan l'obres t'has d'esperar perquè tenen un flux d'aire net cap a l'exterior que permet aconseguir unes condicions segures de màxima esterilitat.
- El material que entra en contacte amb les cèl·lules ha de ser estèril. Primer de tot abans d'utilitzar la campana t'has de mullar els guants amb etanol 70% i també has de netejar-la per dins amb el mateix producte. Això es fa per evitar contaminacions als cultius. Així doncs, cada vegada que haguem d'introduir alguna cosa dins, l'hauem de mullar abundantment amb l'etanol, com també quan s'acaba d'utilitzar la campana.
- Cada vegada que s'obra un recipient que contingui qualsevol substància el seu tap ha de quedar sobre la superfície de la campana mirant de cap per amunt, ja que d'aquesta manera tots els bacteris que pugui contenir a dins surtin per la campana.

- No s'han de passar les mans per sobre dels tubs o recipients que estiguin destapats i continguin substància per no contaminar els guants.

Les cèl·lules que utilitzem són mesenquimals (molt sovint abreviades com a MSC), que van ser extreïdes del moll de l'os del fèmur de rates de deu dies de vida. S'utilitzen rates joves perquè comparades amb les velles aquestes produeixen més quantitats de cèl·lules mare. Aquestes cèl·lules són multi potencials, és a dir, que poden donar lloc a més d'un teixit, en aquest cas poden donar lloc a teixit adipós, muscular, ossi i cartilaginós. En funció del medi on es troben (normalment és el mateix medi en totes però varia els suplementes específics que s'hi afegeixen), es converteixen en un teixit o en un altre. L'enginyeria de teixits (tissue engineering) pretén realitzar aquest procés mitjançant andamis o scaffolds. Nosaltres n'utilitzarem ja que aquests contribueixen a la diferenciació cel·lular.

2.1.1. PREPARACIÓ DEL MEDI

Hem començat preparant dos medis diferents pel cultiu:

- **Sense sèrum:** serà per l'assaig, format per 49 ml Advanced DMEM (que emularà un medi intern per a que les cèl·lules puguin viure perfectament) amb 0,5 ml de L-glutamina (que actuarà com un suplement per al cultiu de les cèl·lules mesenquimals) i 0,5 ml d'una mescla de penicil·lina i estreptomicina (que són uns antibiòtics per eliminar possibles colònies de bacteris que contaminin el cultiu).
- **Amb sèrum:** s'anomena medi complet i està format pels mateixos components que el medi anterior però afegint-hi sèrum fetalboví, que és una fracció proteica, és a dir, una barreja de proteïnes que promouen l'adhesió i l'expansió de les cèl·lules, d'un fetus boví. La vida mitjana de les cèl·lules en 10 ml de medi complet és aproximadament de tres dies.

Procediment per preparar el medi sense sèrum:

1. Hem agafat un pipetor o pipeta automàtica i s'hi col·loca una pipeta dins. S'ha de tenir molt de compte alhora de col·locar-la ja que no la podem tocar directament amb els guants, doncs l'hem introduïda a la cambra

amb l'embolcall de plàstic mullat amb etanol i la pipeta en si no estava molla amb etanol.

2. Hem agafat els 49 ml d'advanced DMEM amb la pipeta automàtica i els hem introduït en uns tubs d'assaig de 50 ml.
3. Hem afegit els 0,5 ml de L-glutamina amb una pipeta graduada, hem llançat la punta de plàstic i hem agitat la mescla. Quan s'utilitza una pipeta graduada cada vegada que es canvia de substància o s'acaba d'utilitzar, es llença la seva punta de plàstic perquè no es barregin les substàncies.
4. Hem afegit els 0,5 ml de la mescla de penicil·lina i estreptomicina amb l'ajut d'una pipeta graduada, i ho hem agitat per homogeneïtzar-ho.
5. Hem posat els 0,5 ml de la primera substància, hem llençat la punta de la pipeta perquè no es mesclassin les diferents substàncies i hem introduït els 0,5 ml restants.

Procediment per preparar el medi amb sèrum:

1. El mateix procés però canviant la quantitat d'advanced DMEM a 41,5 ml.
2. Hem afegit de la mateixa manera que l'altre medi les mateixes quantitats dels antibiòtics i de L-glutamina.
3. Amb una altra pipeta, i també amb l'ajut de la pipeta automàtica, hem agafat 7,5 ml de sèrum fetalboví (que serà un 15% del total de la mescla).
4. Hem posat 12 ml aquest medi amb sèrum en uns flascons especials (fotografia de sota a la dreta), que permeten l'adhesió cel·lular, encara que no es pot saber de que està format ja que té una patent. En aquest flascó és on hi farem el cultiu. Volem que les cèl·lules visquin aproximadament tres dies i en comptes d'afegir 10 ml, n'introduïrem 12 ml perquè les cèl·lules que hi introduïrem



hauran estat congelades i tindran un compost tòxic.

5. Hem posat el tub horitzontalment dins de l'incubadora a 37° i amb un 5% de CO₂, o sigui d'unes condicions semblants a les del cos humà. Per poder determinar la biocompatibilitat d'un material es necessita que els assajos que es realitzin amb ell i amb cèl·lules vives estiguin en entorns que simulin el fisiològic¹.

5.2.1.2. SEMBRA DE LES CÈL·LULES AL MEDI

Després hem anat a descongelar les cèl·lules per preparar els cultius. Aquestes portaven des del 10 de maig del 2010 congelades en nitrogen líquid (a una temperatura d'uns -196°). La seva congelació va ser esglaonada per no malmetre les cèl·lules: primer es van posar a una temperatura de -20°C, després a -80°C amb gel sec i finalment al nitrogen líquid. Estaven guardades dins d'un bidó amb diferents compartiments formats per plaques, on hi havia diferents Eppendorfs amb les cèl·lules i n'hem agafat un. Per extreure-les s'han de fer servir guants i careta especials, per tal de que et congelis les mans, a més que s'ha d'esperar que el nitrogen surti dels compartiments. La sala on estaven guardades estan dotades d'alarmes que s'activen quan el nivell d'oxigen està per sota dels límits. El medi on es trobaven quan estaven al congelador estava format per sèrum i dimetilsulfòxid, una substància tòxica. El pas de treure-les del congelador a sembrar-les ha de ser molt ràpid perquè les cèl·lules no es morin degut a la substància tòxica.

Després hem sembrat les cèl·lules als cultius. Hi ha dues maneres de sembrar: la més acurada, realitzar una centrifugació per tal de tenir només les cèl·lules, i la més ràpida, sembrar tot el contingut congelat, inclosa la substància tòxica amb el risc de que les cèl·lules tenen un petit tram de vida (de 8 a 10 hores). Hem fet servir el procediment més ràpid:

1. Introduir 1 ml de medi a l'Eppendorf que conté les cèl·lules per prevenir-les de la substància tòxica del mateix flascó on es troben.

¹ Marques AP, Reis RL, Hunt JA (2002) The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials*, 23:1471-1478.

2. Introduir-les al flascó horitzontal on hi teníem el medi amb sèrum ja preparat.
3. Agitar horitzontalment per tal de que les cèl·lules es reparteixin per tot el volum, ja que si no es reparteixen i estan en cultiu molt a prop es diferenciaran i no ens interessa.

Hem anat al microscopi a observar les cèl·lules en suspensió i les hem tornat a introduir a la incubadora de CO₂. Al cap de tres hores encara es trobaven en suspensió. Amb el pas del temps, arribaran al fons del recipient, s'hi enganxaran i s'aniran allargant i expandint.

Al cap de tres dies, hem tret el flascó amb el cultiu de la incubadora de CO₂ que es trobava a 37°C. L'hem observat al microscopi i podem observar que les cèl·lules estan adherides a la superfície del flascó, però se'n veuen també en suspensió en el medi, cosa que significa que estan mortes o que no han tingut temps de caure a la superfície del flascó i adherir-s'hi.

Com que hem vist que la majoria ja estan adherides, acabarem de preparar les microplaques ja caracteritzades al punt anterior per cultivar-hi les cèl·lules. Falta extreure la fibronectina (els quatre pous de la 2a fila de les dues plaques, tant les que no vam canviar el PLA de lloc com les altres. Al lloc de la fibronectina hi posem PBS i ho tornarem a posar dins l'incubadora a 37°C.

5.2.1.3. PREPARACIÓ DE LES CÈL·LULES PER SEMBRAR-LES AL MATERIAL

Mentrestant, hem agafat el flascó on hi teníem les cèl·lules. Actualment es troben enganxades a la superfície del flascó i nosaltres volem treure-les per poder-les cultivar al nostre material. Per poder-ho fer hi introduïrem tripsina, un enzim que actua òptimament a 37°C (per aquest motiu ho havíem deixat a la incubadora, a part que és la temperatura que aquest tipus de cèl·lules viuen millor) i que la seva funció és degradar la matriu extracel·lular de les cèl·lules i provocar que les cèl·lules es desenganxin de la superfície on es trobin adherides. Per poder afegir-n'hi, hem d'extreure tot el sèrum fetalboví perquè aquest inactiva la tripsina:

1. Primer de tot hem agitat el flascó i hi hem afegit una mica de PBS per netejar-lo de sèrum.
2. Hem agitat i s'ha format espuma: això significa que encara hi ha sèrum i per tant hi hem afegit més PBS.

Quan ja ha estat del tot net, hi hem posat 5 ml de tripsina, ja que amb aquesta quantitat en tenim suficient per cobrir tota la superfície del flascó on hi ha les cèl·lules adherides. Mentrestant hem anat movent el flascó per cobrir tota la seva superfície horitzontal d'enzim. És molt important que el líquid no toqui el tap del flascó perquè té un filtre on surten i entren els gasos, i també cal que estigui ben tapat. Ho hem deixat uns tres o quatre minuts a l'incubadora de 37°C i ho hem observat al microscopi per veure si les cèl·lules s'han desenganxat, si no fos així, ho hauríem de deixar a l'incubadora uns minutets més. Al microscopi hem pogut veure que les cèl·lules estan en suspensió i en diferents plans: això significa que s'han desenganxat.



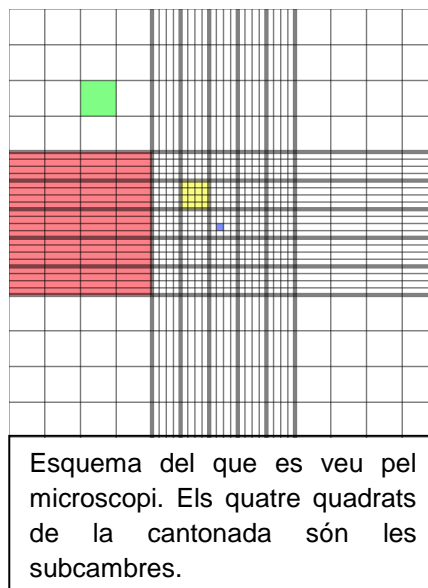
Fotografia del tap d'un flascó, on es pot veure el forat on hi ha el filtre per on surten i entren els gasos.

Per tenir només les cèl·lules farem una centrifugació. Recollim la mostra en un tub de centrifugació de plàstic, agitant perquè en recollim el nombre més gran possible. Finalment hi tirem 10 ml de PBS aproximadament per protegir les cèl·lules en la centrifugació, agitem el flascó i introduïm tot el contingut restant al tub on hi havíem tirat la mostra. Posem el tub a la centrifugadora a 1300 rpm durant 10 minuts. Ho traiem i veiem que les cèl·lules han quedat a baix i que el líquid a dalt.

Anem a la campana i decanem el tub per treure el líquid perquè el pellet (les cèl·lules) està a la part de sota del tub de centrifugació. El traiem amb la pipeta i deixem el pellet a sota. Tornem a deixar en suspensió al pellet amb 1 ml del medi sense sèrum que vam preparar per diluir les cèl·lules. Finalment posem 10 µl de dissolució de medi amb sèrum perquè es puguin alimentar.

5.2.1.4. CAMBRA DE NEUBAUER

Per sembrar un nombre conegut de cèl·lules a cada pouet de la placa, utilitzarem un utensili anomenat “cambra de Neubauer”, que determina la concentració cel·lular. És una placa que està formada per quatre cambres quadrades. Quan s’observa pel microscopi, podem veure que cada cambra està dividida en setze quadrets més petits. Per determinar la concentració cel·lular de la mostra, es conta



quantes cèl·lules es troben a cada cambra i es fa una mitjana de les quatre. És interessant que aquest recompte el dugui a terme més d’un observador ja que els resultats moltes vegades són subjectius i depenen del criteri que utilitza cada persona, per això fem una mitjana aritmètica amb tots els resultats.

Per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes es fa servir Trypan blue, un compost de tinció vital que coloreja el citoplasma de les cèl·lules mortes, ja que els travessa la membrana citoplasmàtica i les tenyeix el citoplasma blau, diferenciant-les visualment de les vives.

Farem una concentració de 1:1, per tant 10 µl de cèl·lules i 10 µl de Trypan blue, ja que necessitem 20 µl per introduir-los a la cambra de Neubauer. Fem la dilució amb l’ajut d’una pipeta graduada mentre agitem, encara que s’ha de tenir en compte que no es poden fer moviments gaire bruscos. Posem a cada banda de la cambra de Neubauer 10 µL de dilució, que entren per capil·laritat.

El següent pas és contar les cèl·lules que observem a cada cambra. Quan tinguem aquesta xifra, la multipliquem per un nombre determinat. Aquest nombre és 10000 (que és la quantitat de volum total que tenim) multiplicat pel factor de dilució que hem fet servir. Tenim 10 µl de cèl·lules i 10 µl de Trypan blue, o sigui que la proporció de cèl·lules respecte el volum total és 1:2, aquest 2 és el factor de dilució. Quan tinguem el nombre de cèl·lules per quadrat, ho haurèm de multiplicar per 20000.

Ho observem al microscopi i fem el recompte:

Observador núm.		1		2		3	
cambrà 1	cambrà 2	23	29	27	28	26	27
cambrà 3	cambrà 4	28	25	25	27	28	36
mitjana		$x_1 = 26,25$		$x_2 = 26,75$		$x_3 = 29,25$	
concentració		$525 \cdot 10^3 \text{ cel./ml}$		$535 \cdot 10^3 \text{ cel./ml}$		$585 \cdot 10^3 \text{ cel./ml}$	
concentració mitjana						$548,333 \cdot 10^3 \text{ cel./mL}$	

Tenim 4 mostres de cada substància, 64 mostres entre les quatre plaques i farem 6 mostres de control, o sigui que necessitem 70 mostres, però en farem 72 per si de cas. Sembrarem 5000 cel./pou. Calculem la quantitat de suspensió que hem d'agafar:

$$72 \text{ pous} \frac{5000 \text{ cèl·lules}}{1 \text{ pou}} \frac{1 \text{ ml suspensió}}{548333 \text{ cèl·lules}} \frac{1000 \mu\text{l suspensió}}{1 \text{ ml suspensió}} = 656,5 \mu\text{l suspensió}$$

Volem que el volum final sigui de 36 ml, per tant agafarem els 656,5 µl de suspensió de cèl·lules amb una pipeta graduada, i la resta seran 35,4 ml de medi sense sèrum (ja que volem que les cèl·lules s'adhereixen al material per enllaços peptídics i no per el sèrum). A la campana fem la dissolució amb les quantitats de dalt. Després de treure el PBS que quedava a les dues primeres files de la microplaca, posem 0,5 ml de la dissolució de cèl·lules a cada pou. Les posem a la incubadora de CO₂ a 37° durant quatre hores.

5.2.1.5. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS PER LA TINCIÓ DE LES CÈL·LULES

Per mirar les cèl·lules pel microscopi, necessitem que estiguin tenyides fluorescentment. Primer de tot preparam tres solucions diferents que permetran la tinció:

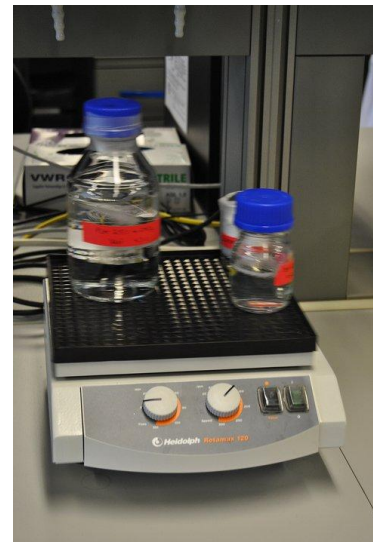
1a. Solució que necessitem pel fixador i que baixa l'autofluorescència: PBS - Gly.

1. Omplim una ampolla de 500 ml amb aigua Milli-Q.
2. Amb unes pinces blanques agafem una tableta de PBS i l'introduïm a l'ampolla.

3. Ho deixem a l'agitador durant uns minuts.
4. Pesem 0,75 g de Gly amb una balança i l'introduïm a l'ampolla on hi tenim el PBS i l'aigua Milli-Q. La glicina és el component de la solució que fa baixar l'autofluorescència.
5. Ho tornem a deixar a l'agitador.

2a. Solució que permetrà l'entrada dels compostos de tinció del citoesquelet i el nucli: PBS – Gly + 0,1% Tryton x-100.

1. La solució final volem que sigui de 100 mL, o sigui que agafem 99,9 ml de la dissolució PBS – Gly que hem preparat abans amb una pipeta.
2. Finalment agafem 0,1 ml de Tryton x-100 amb una pipeta graduada. El Tryton x-100 és un detergent que permet l'entrada per la membrana dels compostos per tenyir el citoesquelet i els del nucli.
3. Barrejar els dos components i deixar-ho a l'agitador.



Les dissolucions un cop fetes, a l'agitador

3a. Solució que necessitem pel fixador:

Sacarosa + Milli-Q

1. Pesar 0,75 g de sacarosa.
2. Agafar 21,91 mL d'aigua Milli-Q.
3. Posar la sacarosa amb l'aigua i deixar-ho a l'agitador.

El següent pas és preparar el fixador. És una substància que permet que les substàncies de tinció s'adhereixin a la cèl·lula. Té grups aldehids que reaccionen amb els grups amino de la cadena proteica i queden units. Calculem quant en necessitem:

$$72 \text{ mostres} \frac{200 \mu\text{l fixador}}{1 \text{ mostra}} = 14400 \mu\text{l fixador} = 14,4 \text{ ml fixador}$$

- 2736 μl = 2,736 ml de PFA (60°C)
- 864 μl = 0,864ml de sacarosa 1 M
- 7,2 ml PBS-Gly

- 3,6 ml d'aigua Milli-Q

Tot això suma 14,4 ml de dissolució de fixador. Posem el PFA a la dissolució i en posem 760 µl en cada pouet. Observem les cèl·lules al microscopi i hem vist que s'han adherit bé i que estan en expansió. Rentem les plaques per a treure les cèl·lules no adherides:

1. Posem medi als pous.
2. Al cap de cinc minuts, traiem el medi de les plaques i hi posem 100µl dissolució PBS-Gly calent.
3. Esperem cinc minuts més i traiem la dissolució, i hi podem 200µl de dissolució de PBS fred per netejar.
4. Tornem a fer el pas anterior perquè no quedin residus no desitjats.
5. Traiem el PBS i procedim a posar-hi azida sòdica (200 µl) que evita la contaminació (fungicida).
6. Ho posem a la nevera.

Al cap de 24 hores, hem tret l'azida sòdica dels pouets de les plaques i hem fet tres rentats de PBS. Aquests rentats els fem amb PBS ja que si ho féssim amb aigua hi hauria un xoc osmòtic a les cèl·lules. Després hem posat la mescla de Triton x-100 i ho hem deixat a l'agitador.

Després, farem dues dissolucions de tinció, una que tnyirà el citoesquelet i l'altre el nucli. Ho fem d'aquesta manera per poder observar-los per separat pel microscopi.

Primer preparem la solució per tnyir el citoesquelet. Utilitzarem fal·loïdina, una toxina de l'amanita fal·loides, que la tenim conjugada amb un compost que dóna fluorescència verda. Quan la fal·loïdina entra en contacte amb les cèl·lules es conjuga amb l'actina i produeix la fluorescència al citoesquelet. Tenim la fal·loïdina en una concentració 14 µM i volem tenir 100 nM a la nova concentració. A cada pouet hi volem posar 200 µl. Tenim 67 mostres i en prepararem per 70 (en excés). Calculem el volum que necessitem de la

fal·loïdina de concentració 14 μM i la quantitat de PBS – Gly que hem d'agafar per tenir la nova concentració desitjada:

$$200 \mu\text{l} \cdot 70 \text{ mostres} = 14000 \mu\text{l} \text{ en total de } d^{\circ} 100 \text{ nM}$$

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

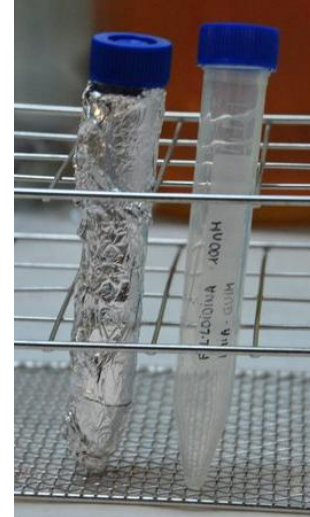
$$14 \mu\text{M} \cdot V_i = 100 \text{ nM} \cdot 14000 \mu\text{l}$$

$$14000 \text{ nM} \cdot V_i = 100 \text{ nM} \cdot 14000 \mu\text{l}$$

$$V_i = 100 \mu\text{l} \text{ de fal·loïdina}$$

Per tant de PBS - Gly en necessitem...

$$V_{\text{PBS-Gly}} = 14\,000 \mu\text{l} - 100 \mu\text{l} = 13900 \mu\text{l} = 13,9 \text{ ml}$$



Aquesta dissolució l'hem fet a la campana, utilitzant una pipeta automàtica per la mescla de PBS – Gly i una pipeta graduada per la fal·loïdina, ja que se n'ha d'agafar molt poca quantitat. S'ha de tapar en tot moment en paper de plata ja que la fal·loïdina quan entra en contacte amb la llum perd fluorescència. Posem 200 μl a cada pouet de la placa amb una pipeta graduada i ho deixem durant mitja hora.

Quan portem 28 minuts d'espera fem hi afegim la solució que tenyeix el nucli. Estarà formada per DAPI, que tenyeix l'ADN, i per tant el nucli. Aquest s'intercala entre la doble hèlix i la marca fluorescentment de color blau, per tant quedarà el nucli blau i el citoplasma verd.

La solució de DAPI volem que sigui d'una concentració 1:250 respecte la fal·loïdina. També posarem 200 μl a cada pou, igual que la fal·loïdina, o sigui que a cada pou hi haurà 400 μl en total de substància. Calculem el volum que necessitem per la concentració, o sigui que seran 122 μl DAPI en 13,88 ml de dissolució PBS – Gly.

Abans de fer la solució hem hagut d'agitar al vòrtex el DAPI, s'anomena fer un spin. Hem fet la mescla amb una pipeta graduada i hem tornat a fer un spin.

Finalment, hem posat 200 µl de DAPI a cada pouet, procediment que s'ha de fer ràpid ja que també perd fluorescència quan entra en contacte amb la llum. Ho hem deixat a l'agitador durant dos minuts i després hem tret tot el contingut dels pouets amb la pipeta. Hem fet dos rentats de PBS + Gly i ho deixem en 100 µl PBS a cada pouet.

Ho hem mirat al microscopi per comprovar que havien fet fluorescència i ho hem deixat a la nevera.

Posant el DAPI a les mostres.



5.2.1.6. OBSERVACIÓ DE LES CÈL·LULES PEL MICROSCOPI

Al cap de 24 hores hem obert les plaques que estaven a la nevera i hem vist que tenien poc PBS o gairebé no en tenien: en posem 100 µl més a cada pouet perquè les cèl·lules no es morin.

Les hem observat per un microscopi invertit. Primer de tot les observem directament des de la microplaca per veure quina de les quatre mostres que tenim de cada substància és la millor i després n'escollim una o dues de bones per poder fer observacions satisfactòries. Amb unes pinces traiem la mostra que es vegi millor i la col·loquem sobre un portaobjectes prim ja que es veu millor. És important que alhora de treure les mostres dels pouets tinguin la superfície plana perquè quan ho mirem pel microscopi les cèl·lules volem que estiguin totes al mateix pla.

Hi ha diferents variables per ajustar la fotografia: *exposure time* (temps d'exposició, en mil·lisegons, com més alt és més clara és la fotografia), *binning* (paràmetre que ajunta píxels), *image scaling* (per variar l'escala de grisos) i *gamma*. Aquests tres últims no els variarem i els deixarem amb els valors predeterminats del programa: el *binning* sempre el mantindrem a 1, el *image scaling* fix entre 0 - 4095 i *gamma* a 1,10. Els valors de *exposure time* els variarem per tenir la fotografia amb la intensitat de llum adient en es vegin bé les cèl·lules. És important no variar gaire aquests valors en una mateixa mostra perquè als resultats hem d'avaluar les cèl·lules conjuntament. Per observar els

nuclis fem servir una llum blava ultraviolada i ET petits, i per observar el citoesquelet fem servir llum verda i ET grans. Les llums són específiques per la substància amb que les hem tenyit.

Farem una mostra de cada substància i cinc fotos a 20x de nucli i del citoesquelet corresponent. Si hi ha alguna cèl·lula de forma interessant li farem una foto a 40x (marcades amb un asterisc a la taula de sota). Recordem que les mostres de PLA + BSA són un control negatiu, o sigui que s'ha de veure tot negre, que cap cèl·lula s'hagi adherit, en canvi les mostres de PLA + FN són un control positiu o sigui que s'han de veure cèl·lules adherides i estirades.

A la taula hi ha els paràmetres de *exposure time* i d'augments que hem fet servir per a cada fotografia i mostra:

Mostra	núm.	Foto núm.	Exposure time (ms)		Augment
			Citoesquelet	Nucli	
BSA	Q3 ²	1	Fotografia del DAPI - 75 ms		x20
FN	Q3	1	15	650	x20
		2	15	350	
		3	15	450	
		4	20	650	
		5	15	550	
		6	25	450	
	L1	1	35	3600	X20
		2	35	3600	
		3	35	3500	
		4	25	3500	
		5	25	3500	
		6	35	3500	
		7*	35	3500	
HGDR6	Q1	1	20	550	x20
		2	25	550	
		3	10	550	
		4	10	700	
		5	10	300	
	L2	1	15	600	x20
		2	15	800	
		3	15	750	
		4	15	1400	
		5	15	1200	
		6*	30	950	
REDV	Q3	1	15	1000	x20

² Podem observar que hi ha moltes restes grogues, que són de DAPI. Tot i així es veu tot negre, cosa que significa que no hi ha cap cèl·lula adherida, tal i com ens ho esperàvem.

		2	15	400	
		3	20	700	
		4	15	700	
		5	15	500	
		6*	15	750	
	L3	1	15	600	x20
		2	15	1100	
		3	15	800	
		4	15	800	
		5	15	2100	
Control placa	Q3	1	15	500	x20
		2	15	500	
		3	20	600	
		4	15	500	
		5	15	500	
	L1	1	40	1200	x20
		2	40	1500	
		3	40	1200	
		4	40	1650	
		5	40	2200	

Al cap de 24 hores, fem més fotografies amb el microscopi de fluorescència a 40 augments de les mostres de fibronectina que tenien les cèl·lules més estirades. Les variables del programa que no hem variat són les següents: *binning* = 1, *gamma* = 1.10 i augments = 40x.

A la taula hi ha els paràmetres de *exposure time* i de *image scaling* que hem fet servir per a cada fotografia i mostra:

Mostra	Nº fotografia	Exposure time (ms)		Image Scaling	
		Nucli	Citoesquelet	Nucli	Citoesquelet
L3	1	75	1500	265-4095	81-4095
	2	80	1500	81-4095	81-4095
	3	75	1700	693-4095	81-4095
	4	75	1700	774-4095	102-4095
	5	75	1700	591-4095	20 -4095
	1	50	2000	750-4095	200-4095
	2	50	1500	265-4095	150-4095

Més endavant voldrem calcular l'àrea de les cèl·lules, per poder saber quines s'han adherit millor. Per poder fer-ho, necessitem tenir una escala de les fotografies píxel – µm. El programa del microscopi ho fa automàticament,

dibuixant una barra de 200 µm a una fotografia de x10, x20 i x40, que són els augments que hem fet servir.

5.2.1.7. EDICIÓ DE LES FOTOGRAFIES DE LES CÈL·LULES

S'utilitza un programa d'ordinador anomenat ImageJ. Primer de tot s'ajunten les dues imatges de la cèl·lula: el nucli i el citoesquelet. Després es canvien uns paràmetres per variar el colors.

5.2.1.8. CÀLCUL D'ÀREES DE LES CÈL·LULES A PARTIR DE LES FOTOGRAFIES

Procediment per contar les cèl·lules i determinar la seva àrea:

1. Arrastrar les imatges de la carpeta al programa.
2. Image > Image to Stack (per ajuntar les imatges en una i sigui més còmode i ràpid treballar-hi).
3. Image > Type > 8 bit (per treballar-hi després necessitem que tingui aquesta resolució).
4. Image > Adjust > Brightness & Contrast (per variar el contrast i la brillantor). Canviem aquests paràmetres perquè el contorn de les cèl·lules es vegi clar i no es difumini amb el fons negre. Cal tenir en compte que quan canvies el contrast d'una imatge se't canvien totes ja que abans les hem ajuntat.
5. Si hi ha dues cèl·lules solapades, però que es veu clarament el seu contorn, repassar-lo amb negre. Si s'observen altres cossos que no semblen cèl·lules, marcar-ho amb blanc cap a l'exterior.
6. Image > Adjust > Threshold > Dark background (les cèl·lules quedaran en vermell i el fons negre, hem de variar la barra de dalt per posar més o menys vermell). > OK (la imatge quedarà en blanc i negre). Black & White
7. Analyze > Set Scale: Pixels Unknown (per fixar l'escala µm - píxel)
8. Analyze > Set Measurement: area, sh d... (escollir els paràmetres que volem que mesuri)
9. Analyze > Particles > 100 - ∞ > Include: holes, display results, show outlines, exclude edges > OK (per fer que analitzi les cèl·lules)
10. S'obra una finestra on surten els resultats amb un número de cèl·lula i l'àrea de cadascuna.

5.2.1.9. HISTOGRAMA AMB L'EXCEL

A partir de les àrees, crearem un histograma amb l'excel per saber la distribució de la població a cada mostra. Com més àrea té una cèl·lula, significa que és més allargada, cosa que vol dir que s'ha adherit. Si una cèl·lula és rodona, significa que no s'ha enganxat, si és allargada, sí. Farem una gràfica per a cada mostra. Copiarem les àrees de les cèl·lules obtingudes amb el programa al full d'excel. Trobarem l'àrea mínima i la màxima (amb la funció "Minim" i "Màxim") i també el promig de les àrees.

Datos > Anàlisis datos > Histograma > Rango entrada area, classes intervals (els hem escrit de 50 a 50).

Dibuixem una gràfica on ens surt la distribució de la població per àrees.

2.2. DEGRADACIÓ

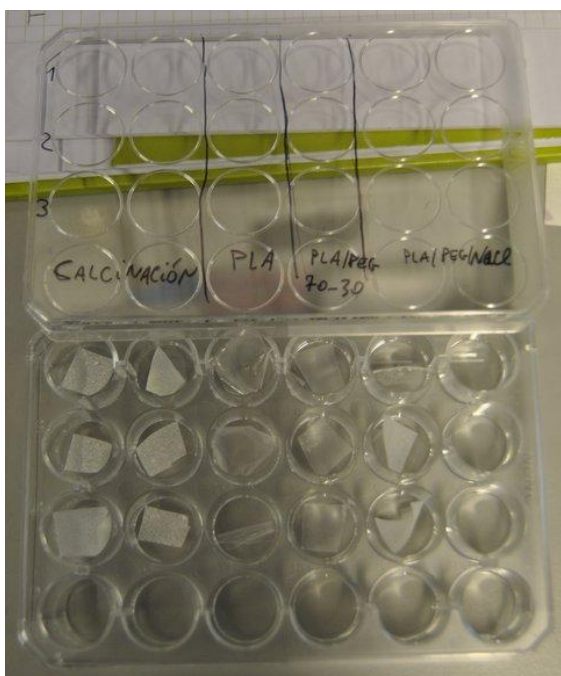
La degradació i la calcinació les realitzarem conjuntament al començament. Per fer la degradació necessitem 3 mostres de cada material i per la calcinació necessitem 6 mostres dels films de PLA + PEG + NaCl que hem preparat a la primera part de les pràctiques.



Pesem les mostres que hem tallat anteriorment amb una balança de sensibilitat de 0,0001 g (a la imatge de l'esquerra) i anotem els resultats en una taula. Després afegim aigua en una concentració de 250 mL d'aigua per gram de mostra i ho posem a l'estufa. La degradació comença quan introduïm els potets a l'estufa a una temperatura de més de 37°, ja que aquesta és la temperatura mitjana de dins del cos humà i volem accelerar el procés. A mesura que van passant els dies anirem pesant les mostres, traient

l'aigua per no variar la massa, per si han reduït la seva massa. Si és així

significarà que són materials biodegradables. Per la calcinació seguirem el mateix procés (almenys fins aquí). Les hem introduït el dia 8/7/2011 a 42°C i augmentarem la seva temperatura l'endemà, que ho posarem a 55°C. Ho deixarem dins l'estufa fins el penúltim dia de les pràctiques, el dia 18/7/2011.



A la imatge hi ha la microplaca que utilitzem per portar les mostres a pesar. Les mostres estaven dins de tubs en aigua a l'estufa i cada dia que les pesem les traiem d'allà, les assequem amb aire a pressió i les deixem dins de d'aquesta microplaca de la fotografia. És important assecar-les bé per no obtenir resultats incoherents.

A la taula hi ha la relació de masses (en grams) de cada mostra de la degradació al llarg dels dies:

	Mostra núm.	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11
PLA	1	0,0406	0,0375	0,0355	0,0349
	2	0,0345	0,0305	0,0305	0,0298
	3	0,0137	0,0119	0,0119	0,0118
PLA + PEG	1	0,018	0,0145	0,0149	0,0137
	2	0,0154	0,014	0,0142	0,0129
	3	0,0168	0,0142	0,0153	0,0142
PLA + PEG + NaCl	1	0,0457	0,0278	0,0261	0,0247
	2	0,0425	0,0278	0,0294	0,0191
	3	0,0455	0,0216	0,0316	0,0211

2.3. CALCINACIÓ

Després dels dies de degradació que les mostres de la calcinació han passat conjuntament amb les altres, les hem pesat amb una balança i hem obtingut les seves masses (en grams) ordenades a la següent taula:

Mostra	Abans degradació (m_{m0})	Després degradació i abans calcinació (m_{mi})
1	0,0479	0,0196
2	0,0444	0,0225
3	0,0520	0,0243

Preparem les mostres per la calcinació: agafem tres gresols i posem dues mostres a cada un. Seguidament pesem tot el conjunt (el gresol inclòs, sense posar tara), perquè quan ho introduïm en calent és possible que la mostra ens quedi enganxada. Ho posem al forn a una temperatura de 600°C durant 24h. Després programem 1 h a 0°C perquè es refredi.

Extraïem els crisols del forn quan ja estan freds i els tornem a pesar. A la següent taula hi ha una relació de les masses en grams que hem obtingut:

	Crisol + mostra abans calcinació (m_{c+mi})	Crisol + mostra després calcinació (m_{c+mf})
1	11,5670	11,5508
2	12,7026	12,6822
3	13,0978	13,0794

Durant la degradació, s'ha després ELP i NaCl. En canvi, a la calcinació, només s'ha després ELP. D'aquesta manera podrem saber quanta quantitat de sal hi havia abans i després de la degradació a la mostra:

$$m_{\text{NaCl } i1} = m_{\text{NaCl } f1} = m_{i1} - m_{f1} = 11,5670 - 11,5508 = 0,0162 \text{ g}$$

$$m_{\text{NaCl } i2} = m_{\text{NaCl } f2} = m_{i2} - m_{f2} = 12,7026 - 12,6822 = 0,0204 \text{ g}$$

$$m_{\text{NaCl } i3} = m_{\text{NaCl } f3} = m_{i3} - m_{f3} = 13,0978 - 13,0794 = 0,0184 \text{ g}$$

Com que ja sabem la quantitat de sal que teníem abans de la degradació i també la massa de la mostra, podem calcular la quantitat de ELP fent una resta:

$$m_{\text{ELP}i1} = m_{mi1} - m_{\text{NaCl}i1} = 0,0196 - 0,0162 = 0,0034 \text{ g}$$

$$m_{\text{ELP}i2} = m_{mi2} - m_{\text{NaCl}i2} = 0,0225 - 0,0204 = 0,0021 \text{ g}$$

$$m_{\text{ELP}i3} = m_{mi3} - m_{\text{NaCl}i3} = 0,0243 - 0,0184 = 0,0059 \text{ g}$$

Per altra banda, calcularem la quantitat de ELP i de clorur de sodi que teníem al començament. Recordem que les mostres estaven formades per PLA / PEG en una proporció de 70/30 i hi havia un 50 % de clorur de sodi, és a dir, la meitat era ELP i l'altre NaCl. Calcularem els grams de cada component que hi havia a cada mostra:

$m_{m01} = 0,0479$		$m_{m02} = 0,0444$		$m_{m03} = 0,0520$	
ELP	NaCl	ELP	NaCl	ELP	NaCl
0,02395	0,02395	0,0222	0,0222	0,0260	0,0260

A les següents taules hi ha ordenades totes les dades que hem obtingut:

	Mostra 1		Mostra 2		Mostra 3	
Abans degradació	m_{01} 0,0479		m_{02} 0,0444		m_{03} 0,0520	
	m_{ELP01} 0,02395	m_{NaCl01} 0,02395	m_{ELP02} 0,0222	m_{NaCl02} 0,0222	m_{ELP03} 0,0260	m_{NaCl03} 0,0260
Abans calcinació	m_{i1} 0,0196		m_{i2} 0,0225		m_{i3} 0,0243	
	m_{ELPi1} 0,0034	$m_{NaCl i1}$ 0,0162	m_{ELPi2} 0,0021	$m_{NaCl i2}$ 0,0204	m_{ELPi3} 0,0059	$m_{NaCl i3}$ 0,0184
Després calcinació	m_{f1} 0,0162		m_{f2} 0,0204		m_{f3} 0,0184	
	m_{ELPf1} 0	$m_{NaCl f1}$ 0,0162	m_{ELPf2} 0	$m_{NaCl f2}$ 0,0204	m_{ELPf3} 0	$m_{NaCl f3}$ 0,0184

L'objectiu principal de la calcinació és conèixer la quantitat de ELP i de NaCl que s'ha després a la degradació. Per saber-ho farem una resta:

$$m_{ELPd1} = m_{ELP01} - m_{ELPi1} = 0,02395 - 0,0034 = 0,02055 \text{ g}$$

$$m_{ELPd2} = m_{ELP02} - m_{ELPi2} = 0,0222 - 0,0021 = 0,0201 \text{ g}$$

$$m_{ELPd3} = m_{ELP03} - m_{ELPi3} = 0,0260 - 0,0059 = 0,0201 \text{ g}$$

$$m_{NaCl d1} = m_{NaCl01} - m_{NaCl i1} = 0,02395 - 0,0162 = 0,00775 \text{ g}$$

$$m_{NaCl d2} = m_{NaCl02} - m_{NaCl i2} = 0,0222 - 0,0204 = 0,0018 \text{ g}$$

$$m_{NaCl d3} = m_{NaCl03} - m_{NaCl i3} = 0,0260 - 0,0184 = 0,0076 \text{ g}$$

Per poder treure conclusions passem aquestes masses en tant per cent de massa perduda respecte l'inicial, realitzant en tots els casos el càlcul següent:

$$\% \text{ ELP}_{d1} = \frac{m_{\text{ELPd1}}}{m_{\text{ELP0}}} \cdot 100 = \frac{0,02055 \text{ g ELP}}{0,02395 \text{ g ELP}} \cdot 100 = 85,80\%$$

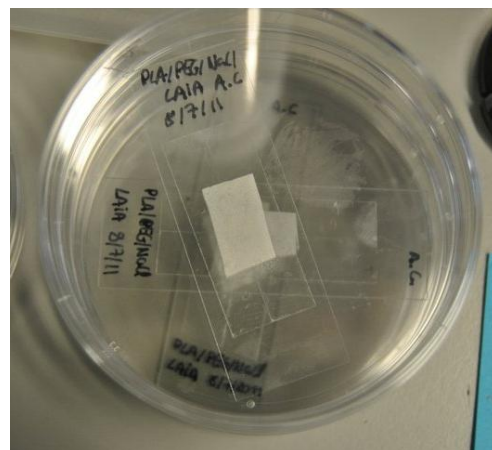
	% ELP perdut	% NaCl perdut
1	85,80 %	32,36 %
2	90,54 %	8,11 %
3	77,31 %	29,23 %



Forn on vam fer la calcinació.

2.4. ANGLE DE CONTACTE

Per fer l'angle de contacte necessitem tres mostres de cada material en forma de film que havíem preparat a la primera part de les pràctiques. Hem de procurar que aquestes siguin el més llises possible. Els trossos llisos de la mostra solen trobar-se a la part central del film ja que les cantonades estan arrugades. Col·locarem sobre un portaobjectes un tros d'uns 3 cm de cinta adhesiva de doble cara i tallarem

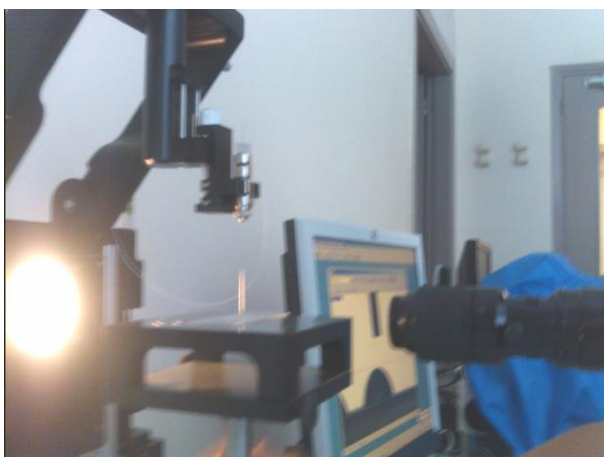


Mostres guardades dins de plaques per l'angle de contacte.

un tros d'uns 2 cm de mostra de les característiques ja esmentades per enganxar-lo sobre la cinta. Finalment guardarem els portaobjectes dins d'unes plaques per anar a calcular l'angle de contacte.

El procediment per calcular l'angle de contacte és el següent:

1. Obrir l'ordinador i l'aparell de l'angle de contacte.
2. Treure la mostra dels potets i posar la mostra sobre la placa de l'aparell.
3. Amb un programa d'ordinador, que està connectat a l'aparell, fem que surti una gota d'una agulla col·locada perpendicularment respecte la mostra.
4. La càmera de l'aparell capta la imatge de la gota sobre la mostra i fem una fotografia amb el programa. És important que la fem ràpid perquè com que hi ha poca quantitat d'aigua s'evapora fàcilment i la corba de la gota queda amb un angle diferent que el real.
5. Amb el mateix programa es calcula l'angle que forma la gota amb el material automàticament.



Aparell on vam fer l'angle de contacte.

A la següent taula hi ha els angles de contacte per a cada mostra:

Mostres	PLA	PLA/PEG 70/30	PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl
1	81,4	76	66,2
2	85,5	77,3	64,7
3	82,3	79	69,9
4	78,8	76,1	66
5	77,2	78	71
6	84	86	67,5

2.5. ABSORBÈNCIA DE LA FUNCIONALITZACIÓ COVALENT / FISISORBIDA

Durem a terme la quantificació de proteïnes per unitat de massa de PLA mitjançant un assaig colorimètric i una prova d'absorbència, per poder

comparar si hi ha més pèptids als que es troben units covalentment o els fisisorbits.

Preparem tres mostres de cada classe: tres amb enllaç covalent i tres fisisorbits. Pesarem una mica de mostra (0,3426 g) i agafarem la mateixa quantitat per totes les altres. Les posarem cadascuna en un tub d'assaig diferent.

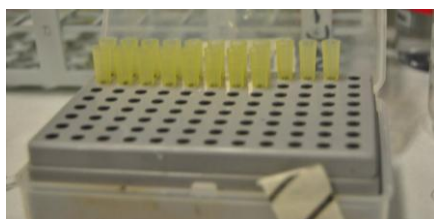
Abans però, preparem una recta patró amb unes concentracions conegudes per poder associar un nivell d'absorbància (que calcularem més endavant) a aquestes i poder determinar la concentració de les mostres. Les concentracions que farem servir són les següents, expressades en µg/ml: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,0625; 0,78125 i 0,390635. Per obtenir resultats més acurats, prepararem tres rectes patró. Utilitzarem una solució de ELP en aigua Milli-Q de 2 mg/100µl que tenim en una lícota. Procediment a seguir:

1. Agafem una gradeta amb 24 tubs.
2. Com que volem preparar tres rectes patró, que cada vegada les concentracions es vagin dividint per la meitat i que hi hagi 1 ml a cada tub, començarem preparant 6 ml en comptes de 3 ml. D'aquesta manera, omplim tots els altres tubs amb 1 ml d'aigua Milli-Q, agafem 1 ml del primer tub i el diluïm amb el següent, i així successivament, aconseguint cada vegada la meitat de concentració que l'anterior.
3. Abans, però, calculem la quantitat de dissolució de ELP que hem d'extreure de la lícota i la quantitat d'aigua Milli-Q que necessitem:

$$6 \text{ ml d' } \frac{50 \text{ } \mu\text{g HRGD6}}{1 \text{ ml d' }} \frac{100 \text{ } \mu\text{l d' ELP}}{2000 \text{ } \mu\text{g HRGD6}} = 15 \text{ } \mu\text{l d' ELP}$$

$$6000 \text{ } \mu\text{l} - 15 \text{ } \mu\text{l} = 5985 \text{ } \mu\text{l d'aigua Milli-Q}$$

4. Procedir a fer les concentracions utilitzant una pipeta graduada, tenint en compte que s'ha de canviar la punta després d'utilitzar-la a cada pouet, doncs són quantitats molt petites i una gota podria fer canviar la concentració.



Capsa on hi havia les puntes noves de pipeta per anar-les canviant cada vegada.

El kit que tenim per fer aquest experiment detecta proteïnes entre 20 µm/ml a 0,5 µm/ml. És una dissolució de tres components, anomenats “*Working Reagent*”, que quan entren en contacte generen la reacció colorimètrica. Necessitem 1 ml per pouet per tant 42 ml però en farem 45 ml per tenir-ne en excés. Els components (Micro BCA) estan en proporció 25:24:1 (A, B, C) i calculem la quantitat que en necessitem:

$$45 \text{ ml d'ò "kit"} \frac{25 \text{ ml substància A}}{50 \text{ ml d'ò "kit"}} = 22,5 \text{ ml substància A}$$

$$45 \text{ ml d'ò "kit"} \frac{24 \text{ ml substància B}}{50 \text{ ml d'ò "kit"}} = 21,6 \text{ ml substància B}$$

$$45 \text{ ml d'ò "kit"} \frac{1 \text{ ml substància C}}{50 \text{ ml d'ò "kit"}} = 0,9 \text{ ml substància C}$$

Posem 1 ml de *Working Reagent* a cada tub i els deixem al bany maria 50°C durant 1h i 20 minuts. Quan ha passat aquest temps, hem canviat l'aigua que estava calenta per freda i després ho hem posat en gel sec durant poca estona, per refredar els tubs.

Agafem una microplaca de 96 pous i amb una pipeta (a la imatge de la dreta) posem 200 µl de cada tub a un pouet diferent, ordenats segons si són de les rectes patró i tenint en compte la concentració o si són de les mostres.

Finalment, ho posem en una màquina que llegeix l'absorbància (λ=562), connectada a un programa d'ordinador on surten en una taula:

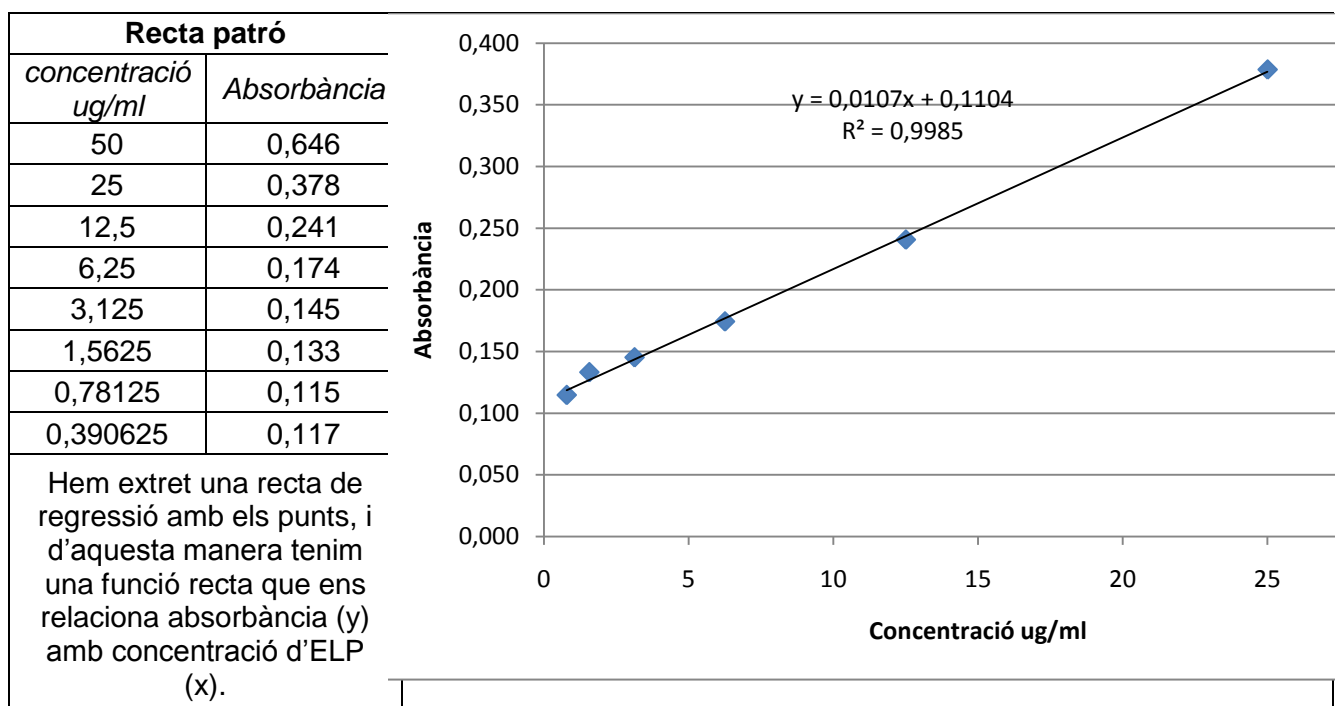


Aguantant una pipeta graduada, que era igual a tots els experiments.

Recta patró								
ug/ml	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125	0,390625
Absorbància	0,66000003	0,38080001	0,2421	0,16689999	0,145	0,12890001	0,1162	0,1278
	0,66109997	0,38260001	0,2357	0,1814	0,1488	0,12540001	0,1182	0,1168
	0,61809999	0,37189999	0,2441	0,17470001	0,142	0,1454	0,1099	0,1078

Absorbància de les mostres	
Covalents	Fisisorbides
0,3364	0,1874
0,24779999	0,1754
0,34450001	0,18170001

Càlcul de una recta de regressió per trobar els valors d'absorbància de les mostres problema:



Càlcul de la concentració mitjana:

Mostra	Absorbància (y)	Càlculs	Concentració ug/ml (x)
Covalent	0,30956667	$y = 0,0107x + 0,1104$	18,6137072
Fisisorbit	0,1815	$x = (y - 0,1104) / 0,0107$	6,64486007

CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES BIODEGRADABLES PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA

Laia Gil Molas (laiag_24@hotmail.com)

Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC)

Programa Joves i Ciència de CatalunyaCaixa

Palabras clave: polímero, caracterización, funcionalización

Resumen

Actualmente la ingeniería de tejidos está desarrollando materiales biodegradables como sustitutos orgánicos en el tratamiento de lesiones óseas (1). En el presente trabajo se han preparado materiales de naturaleza polimérica, en concreto PLA (ácido poliláctico), PLA/PEG (70/30) y PLA/PEG + 50% NaCl, para poder realizar diferentes ensayos de caracterización de su superficie y conocer sus grados de biodegradabilidad, rugosidad superficial, hidrofobicidad y crecimiento de celular, a la vez comparando el tipo de funcionalización usada, covalente o fisisorbida. Los factores estudiados son muy importantes a la hora de elegir un material para su uso como injerto ya que pueden influir por ejemplo en una regeneración ósea más rápida o pueden simplificar una repetida intervención quirúrgica por el hecho que sean biodegradables.

Desarrollo

a) Objetivos

El objetivo del trabajo es realizar ensayos de caracterización con materiales poliméricos preparados previamente para poder determinar diferentes características de cada uno y justificar qué material o procedimiento sería mejor en cada caso. Los ensayos de caracterización a efectuar son los siguientes: degradación, para poder establecer cuál de los materiales es más biodegradable; calcinación, para cuantificar la cantidad de fase inorgánica dentro de un material compuesto, en este caso la sal; ángulo de contacto, para conocer la rugosidad superficial y su hidrofilia de cada material; comparación entre funcionalización covalente y fisisorbida, para determinar cuál de las dos es más efectiva; y cultivo celular, para contrastar la respuesta biológica en diferentes ELP (Elastin-Like Polymers).

b) Descripción del trabajo

El trabajo está dividido el trabajo en tres partes: preparación del material, caracterización del material y experimentación con el material. Las partes de preparación y caracterización del material fueron necesarias para correlacionar los cambios físico-químicos con la respuesta celular así como para controlar los procedimientos de transformación del material.

1. Preparación del material

Los materiales biodegradables preparados en la primera parte son los siguientes (2) (3):

- PLA: Ácido poliláctico. Polímero de naturaleza orgánica. Su superficie es altamente hidrofóbica. Sin embargo, el contacto con el agua puede inducir la rotura de las cadenas carbónicas para hidrólisis éster. Por esa razón se conserva en ambiente seco (en el congelador), para evitar su paulatina degradación.
- PLA/PEG (70/30): El PEG (polietilenglicol), es una molécula hidrófila (tiene afinidad con el agua) que muestra una mayor estabilidad que el PLA.
- PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl: actualmente se han realizado varios estudios (4) que añaden vidrio biodegradable en la mezcla de polímeros. A la imposibilidad de obtener este material, en este caso se usará cloruro de sodio para comprobar si la adición de un tercer componente, soluble en agua, puede hacer variar positivamente los resultados a través de la aparición de poros en el material cuando se degrada.

Los polímeros y sus variantes se han solubilizado en un solvente orgánico (cloroformo) para su manipulación. Seguidamente estos tres materiales diferentes han sido preparados en forma de film (5) mediante una vaporización en una cámara saturada de cloroformo gas: la evaporación del solvente da lugar a la obtención de filmes. La saturación del aire con cloroformo en la cámara donde se producen los filmes se realiza para reducir la velocidad de evaporación del solvente, dando lugar así a una superficie del film más lisa y regular.

Tras la obtención de películas, se ha procedido a modificar químicamente la superficie. Esta parte tiene como objetivo que el material induzca a una buena adhesión celular. Para poder hacerlo, se ha utilizado Elastin-Like Polymers (ELPs), unos polímeros de naturaleza peptídica obtenidos a través de la modificación genética de la proteína elastina, de origen natural. Los ELPs tienen una secuencia específica en su cadena, la cual es reconocida por las proteínas de adhesión ubicadas a la membrana celular (las integrinas). La secuencia es específica del linaje celular y permite la formación de puntos focales. Si no introdujéramos ELPs al PLA las células no se adherirían a ella de manera satisfactoria. Hemos utilizado dos clases de ELPs: el HRGD6, un ELP que incorpora una secuencia de adhesión celular específica de tejido óseo: el tripéptido RGD; y el REDV, un ELP que incorpora una secuencia de adhesión celular específica de tejido epitelial: los aminoácidos REDV.

Se han funcionalizado los materiales covalentemente uniendo los ELP con el material mediante un enlace covalente, un tipo de enlace muy fuerte y estable. Para ello, se han roto los enlaces éster de las cadenas carbónicas del film de PLA con NaOH 0,5 M durante 30 minutos. Después se ha preactivado la superficie a través de la reacción química con la molécula N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) y la carbodiimida EDC. Esto permite la formación de un complejo intermediario en el que la molécula NHS queda unida a los carboxilos obtenidos en la hidrólisis éster de las cadenas de PLA. Este complejo activado carboxilo-NHS puede reaccionar con los grupos amino (-NH₂) de las biomoléculas ELP y permitir la unión covalente.

2. Ensayos de caracterización del material

2.1. Degradación del material

El objetivo de este experimento es determinar la velocidad de degradación de los materiales en forma de film sin funcionalizar. Para ello se han puesto muestras de cada material en agua y 37 ° C (temperatura fisiológica) y se ha medido su pérdida de peso a lo largo de un número de días determinado. El protocolo seguido es el siguiente: secar las muestras, pesarlas e introducir las de nuevo en agua y 37°C hasta el último día de la degradación.

2.2. Calcinación

La calcinación se realiza únicamente con el material que contiene sal, ya que el objetivo es cuantificar la cantidad de fase inorgánica dentro de un material compuesto, el cloruro de sodio, después de la degradación. Por esta razón la primera parte se realiza conjuntamente con la degradación y una vez acabada, se procede a la calcinación en sí. El protocolo seguido se basa en secar las muestras, ubicarlas dentro del horno con ciclos de calentamiento a 600°C (para evaporar todo el polímero y que quede sólo NaCl) y pesar la sal restante. A partir de la concentración de sal inicial y de la masa final se puede saber cuánta cantidad de sal tenemos y cuánta se ha degradado.

2.3. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se realiza para estudiar la hidrofobicidad y rugosidad superficial de los materiales en forma de film, sin funcionalizar. La técnica consiste en calcular el ángulo que forma una gota depositada sobre la muestra. Los factores que varían el ángulo de contacto son: la hidrofilia, ya que si el material atrae el agua el ángulo será más pequeño; la topografía del material, porque si es rugoso llegará menos cantidad de agua al material y el ángulo será más grande; y la energía superficial del material.

2.4. Comparación entre la funcionalización covalente y fisisorbida

La funcionalización del material se puede realizar de dos maneras: fisisorbida y covalente. Cada una representa unas ventajas y unos inconvenientes: mientras que la fisisorbida mantiene una simplicidad en el protocolo-ya que evade todos los tratamientos químicos-es menos estable (formada con muchos enlaces débiles de Van der Waals, pero aún así no es del todo estable), por el contrario, la funcionalización covalente tiene una serie de pasos más costosos en cuanto a tiempo y reactivos, pero asegura una funcionalización más estable (unión con enlaces químicos, fuerte, fija y permanente)⁽⁶⁾. Se han realizado ambas y luego se ha llevado a cabo la cuantificación de proteínas por gramo de material mediante un ensayo colorimétrico y una prueba de absorbencia, a partir de una recta patrón con unas concentraciones conocidas.

3. Caracterización de la respuesta biológica

Se han cultivado células de médula ósea de rata sobre los materiales funcionalizados para ver en cuál de ellos se adhieren más células y mejor, siguiendo el siguiente protocolo: preparación del medio y de las células a sembrar, cálculo de la concentración celular usando una cámara de Neubauer, siembra de las células al material, preparación de soluciones para la tinción, fijación y tinción fluorescente. Mediante un microscopio óptico invertido se han tomado fotografías de las células, a partir de las cuales se han calculado sus áreas

para saber en qué material se han adherido mejor. Se ha usado fibronectina como control positivo, puesto que es una sustancia en la que las células se adhieren muy fácilmente, y BSA como control negativo, ya que el suero usado en la preparación del medio de cultivo lo inactiva como posible proteína de adhesión celular.

c) Resultados y conclusiones

1. Degradación

En la siguiente tabla hay anotadas las masas de las muestras que hemos pesado a lo largo de los días y sus medias, así como el cálculo del tanto por ciento que total de cada muestra y degradado:

Muestra		Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11	
PLA	Masa (g)	1	0,0406	0,0375	0,0355	0,0349
		2	0,0345	0,0305	0,0305	0,0298
		3	0,0137	0,0119	0,0119	0,0118
		M	0,0296	0,0266	0,0260	0,0255
	% total	100	89,98	87,73	86,15	
	% degradado	0	10,02	12,27	13,85	
PLA / PEG	Masa (g)	1	0,018	0,0145	0,0149	0,0137
		2	0,0154	0,014	0,0142	0,0129
		3	0,0168	0,0142	0,0153	0,0142
		M	0,0167	0,0142	0,0148	0,0136
	% total	100	85,06	88,45	81,27	
	% degradado	0	14,94	11,55	18,73	
PLA / PEG + NaCl	Masa (g)	1	0,0457	0,0278	0,0261	0,0247
		2	0,0425	0,0278	0,0294	0,0191
		3	0,0455	0,0216	0,0316	0,0211
		M	0,0446	0,0257	0,0290	0,0216
	% total	100	57,74	65,15	48,54	
	% degradado	0	42,26	34,85	51,46	

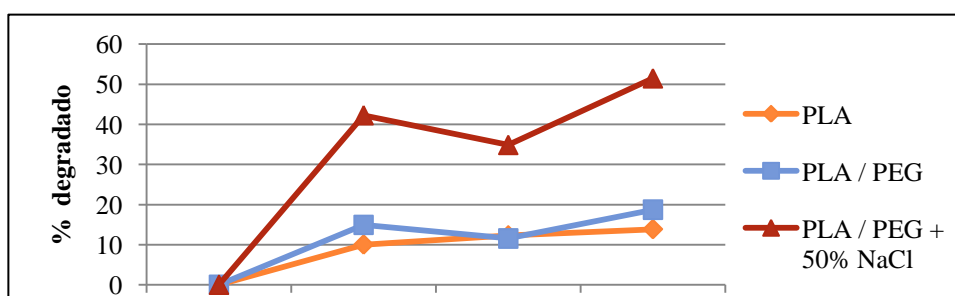


Gráfico 1. Relación entre tanto por ciento degradado y el tiempo. Se puede observar una degradación más rápida en el material que contiene cloruro de sodio en comparación con el PLA / PEG (70/30) y el PLA, mucho más lenta. Se puede apreciar un error de manipulación al día 7.

Se puede observar que el PLA / PEG (70/30) + 50% NaCl se degrada mucho más rápido que el PLA / PEG (70/30) y que el PLA solo se degrada muy lentamente. Esto puede ser debido a que el PEG es mucho más hidrófilo, tiene más afinidad por el agua y se degrada más rápidamente, y a que la sal es muy soluble en agua. Cuando el PLA está solo es poco degradable porque tiene un elevado porcentaje de redes cristalinas (3), puesto que las estructuras de este tipo dificultan su rotura y por consecuencia al desprendimiento del material. En cambio, cuando lo mezclamos con PEG aumenta su capacidad de degradarse, causado probablemente porque tiene menos peso molecular y rompe las redes cristalinas del PLA.

En conclusión, se puede señalar que en términos de nivel de degradación es mejor utilizar PLA/PEG (70/30) añadiendo un 50% de un tercer componente soluble en agua, puesto que en una hipotética intervención quirúrgica el material introducido sería reabsorbido por el cuerpo de una forma más rápida, lo que podría impedir la aparición de posibles problemas surgidos por una larga estancia de un material externo en el cuerpo.

2. Calcinación

A partir de las masas de las muestras después de la calcinación, se ha podido calcular el tanto por ciento de cloruro de sodio perdido total durante los días de degradación, anotado en la tabla siguiente:

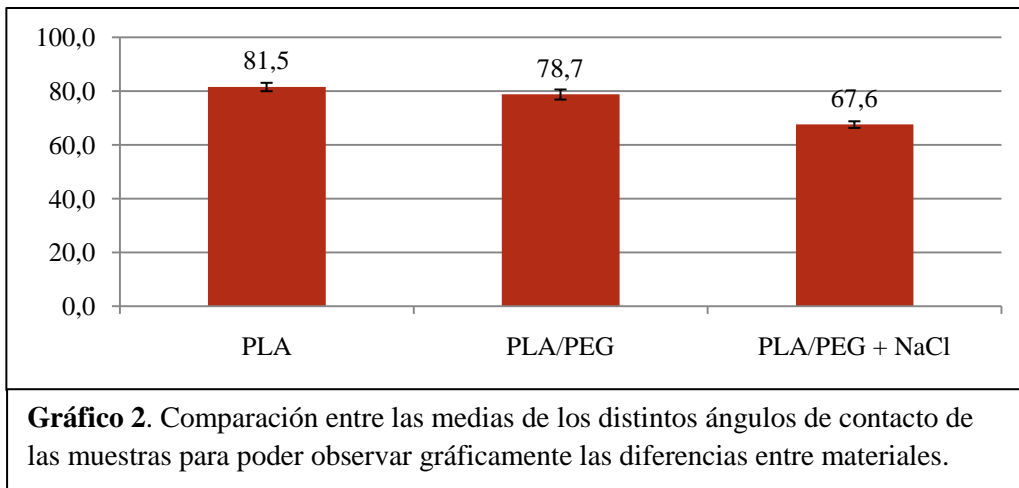
% NaCl perdido total			
1	2	3	Media
32,36%	8,11%	29,23%	23,23%

Como se puede extraer de los resultados de la tabla, se perdió una media de 23,23% de sal en la degradación del PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl. Respecto a una degradación de 18,73% en el material que no contenía cloruro de sodio, se puede afirmar claramente que la mezcla polimérica se degrada en mucho más porcentaje si se añade la sal, no únicamente por el hecho que la sal es muy degradable en el agua, sino que la degradación del polímero también aumenta considerablemente.

3. Ángulo de contacto

En la tabla que hay a continuación están anotados los ángulos obtenidos a partir del cálculo del ángulo de contacto de cada material mediante el aparato de medición, la media de cada muestra y su desviación estándar:

Muestras	PLA	PLA/PEG	PLA/PEG + NaCl
1	81,4	76	66,2
2	85,5	77,3	64,7
3	82,3	79	69,9
4	78,8	76,1	66
5	77,2	78	71
6	84,0	86	67,5
m	81,5	78,7	67,6
DE	3,12	3,74	2,44



Se puede establecer que el ángulo de contacto es más alto en PLA solo, de una media de 81,53°, lo que significa que es más hidrófobo, tal y como nos esperábamos. En cambio, las muestras de PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl, tienen un ángulo de contacto más pequeño, una media de 67,55°, o sea que son más afines con agua, también corroborando la hipótesis. El PLA/PEG (70/30) tiene un ángulo de contacto de 78,73°, más pequeño que el de PLA solo, lo que significa que es más afín con el agua y que las propiedades del PEG influyen más en el ángulo de contacto que la topografía del material, ya que esta muestra era más rugosa que el PLA solo.

Este segundo ensayo de caracterización nos vuelve a recalcar que el material que contiene un tercer componente sería más adecuado puesto que es más afín en agua, condición favorable para que se le adhiriesen más células en su hipotético uso como injerto óseo. Sin embargo hay pocas diferencias estadísticas significativas para poder extraer conclusiones relevantes en este caso. Debido a esto, debemos tener en cuenta algunos factores que influyen en variar los ángulos de contacto: la hidrofobicidad y la topografía. Precisamente las pocas diferencias entre materiales pueden ser debidas a que no estuvieran bien pegadas a la superficie y por lo tanto su topografía puede haber variado. También puede haber influido una velocidad de evaporación con el cloroformo en la formación de las películas inadecuada y que variasen las propiedades del material (más o menos hidrófilo) o que no se formara un filme perfecto (cambios en la topografía).

4. Comparación entre la funcionalización covalente y fisisorbida

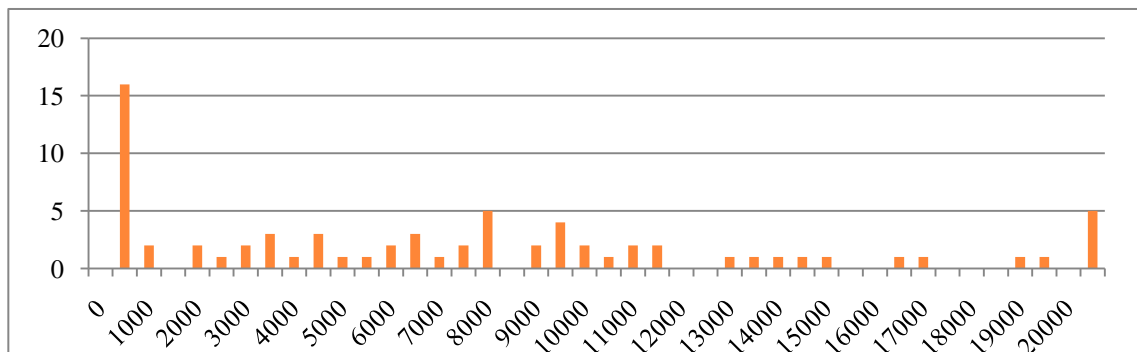
A partir de los resultados de la absorbencia de la recta patrón medidos por el espectrofotómetro y de las concentraciones conocidas, hemos realizado una función recta que nos relaciona los valores de absorbencia con los valores de concentración, ya que mantienen una relación lineal y directamente proporcional (a mayor cantidad de ELP, más color violeta al ensayo microBCA y por tanto más absorbencia medida por el espectrofotómetro). En la siguiente tabla hay los valores de absorbencia medios de cada muestra y los cálculos de la concentración a partir de la fórmula de la recta:

Muestra	Absorbencia (y)	Cálculos	Concentración ug/ml (x)
Covalente	0,30956667	$y = 0,0107x + 0,1104$	18,6137072
Fisisorbida	0,1815	$x = (y - 0,1104) / 0,0107$	6,64486007

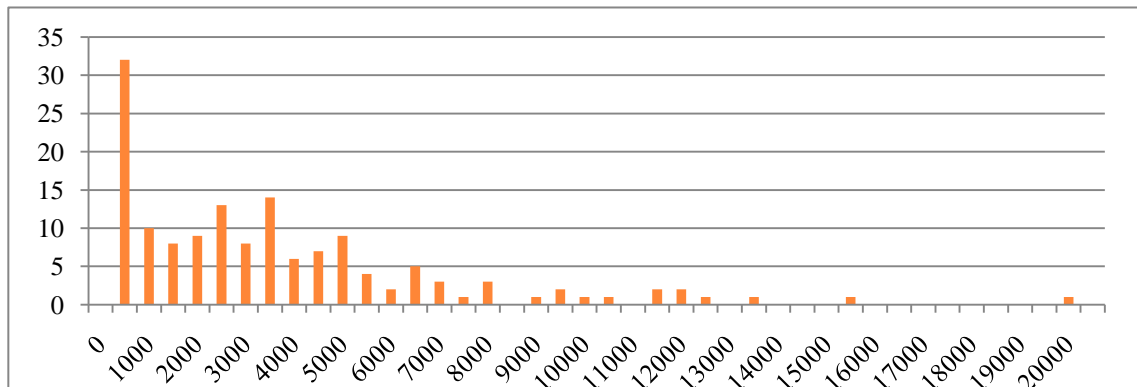
A partir de esta tabla podemos afirmar que la funcionalización realizada covalentemente tiene una concentración más elevada de ELP comparada con la fisorbida por lo tanto es mejor funcionalizar covalentemente que por fisorbsión, una información que puede ser relevante a la hora de elegir la metodología, ya que como más proteína hay, más células se le adherirían.

5. Análisis de la respuesta biológica

A partir de las áreas de las células hemos realizado unos histogramas donde se indica la frecuencia de áreas celulares en tramos. En el control negativo (BSA) no se observa ninguna célula adherida, como esperábamos, y en el control positivo (FN) hay muchas células y muy estiradas: se ven muy claramente las fibras de actina y predominan las áreas de 3000 a 9000 μm^2 . Análisis de los histogramas de los ELP:



Histograma de HRGDG. Hay mucha diversidad de tamaños y una gran cantidad de células, las cuales presentan muchos puntos focales observados con el microscopio.



Histograma de REDV. Las células son algo más pequeñas que las del HRGDG, con mucha frecuencia en las áreas de 500 a 5000 μm^2 .

A partir de los resultados podemos concluir que es mejor utilizar HRGDG porque se adhieren muchas más células y mejor, presentando áreas mucho más grandes, además con la formación de muchos puntos focales.

d) Bibliografía

- ¹ Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat (ESp)* , 227-246.
- ² Martin, O.; Avérous, L. (2001). Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer 42*, 6209-6219.
- ³ Kulinski, Z.; Piorkowska, E. (2005). Crystallization, structure and properties of plasticized poly(L-lactide). *Polymer 46*, 10290-10300.
- ⁴ Navarro, M.; Engel, E., Planell, J.A. (2007). Surface characterization and cell response of PLA/CaP glass biodegradable composite material.
- ⁵ Pillin, Isabelle; Montrelay, Nicolas; Grohens, Yves (2006). Thermo-mechanical characterization of plasticized PLA: Is the miscibility the only important factor?. *Polymer 47*, 4676-4682.
- ⁶ Atkins, Peter; Loretta Jones (1997). *Chemistry: Molecules, Matter and Change*. New York: W. H. Freeman & Co. 294–295



IBEC

*Caracterització de materials
biodegradables per a la
regeneració òssia.*

1. Introducció

El passat juliol vam realitzar unes pràctiques en els laboratoris de l'IBEC (Institut de Bioenginyeria de Catalunya), dins del departament de Bio/Non-Bio Interactions for Regenerative Medicine. Durant dues setmanes vam treballar amb diferents materials biodegradables els quals estan essent desenvolupats actualment en el camp de la enginyeria de teixits com a substituïts orgànics en el tractament de lesions òssies. Aquests materials, de naturalesa polimèrica, indueixen a una regeneració òssia quan són introduïts en l'organisme i a més són biodegradables, d'aquesta manera no caldrà extreure'ls de l'organisme, simplificant la invasivitat quirúrgica.

La nostra tasca al laboratori serà preparar aquests materials i experimentar amb ells per veure quin és més adient, com també conèixer quins processos es duen a terme actualment en els laboratoris d'enginyeria de teixits. Tots els procediments realitzats i els materials utilitzats són els que es fan servir actualment a l'IBEC pel tractament de biomaterials.

Hem dividit el treball en tres parts i cadascuna ens la dirigeix un científic diferent: preparació del material, amb el Tiziano Serra; caracterització del material, amb el Xavier Puñet; i experimentació amb el material, amb l'Aitor Sánchez i els altres dos científics. Les parts de preparació i caracterització del material van ser necessàries per tal de correlacionar els canvis fisicoquímics amb la resposta cel·lular així com per controlar els procediments de transformació del material.

L'objectiu d'aquestes pràctiques és experimentar amb diferents materials biodegradables que haurem preparat prèviament per observar si indueixen a la regeneració òssia i determinar quin dels materials preparats i procediments realitzats és més eficaç.

2. Fitxa tècnica

- a. Centre: Institut de Bioenginyeria de Catalunya
- b. Adreça: Baldri Reixac, 10-12 | 08028 Barcelona - Spain
- c. Línies d'investigació: Cellular Biotechnology, Biomechanics and cellular biophysics, Nanobiotechnology, Biomaterials, implants and tissue engineering, Medical signals and instrumentation, Robotics and biomedical imaging
- d. Àrea o departament: Biomaterials, implants and tissue engineering - Bio/Non-Bio Interactions for Regenerative Medicine
- e. Científic al càrrec: Melba Navarro, Tiziano Serra, Aitor Sánchez, Xavier Puñet.
- f. Projecte: Caracterització de materials biodegradables per a la regeneració òssia.
- g. Període de realització de l'estada: dues setmanes, del 5 de juliol al 19.

3. Treball desenvolupat

3.1. Preparació del material

Els materials biodegradables que prepararem a la primera part són els següents:

- **PLA:** Àcid polilàctic. Polímer de naturalesa orgànica. La seva superfície és altament hidrofòbica. Malgrat tot, el contacte amb l'aigua pot induir el trencament de les

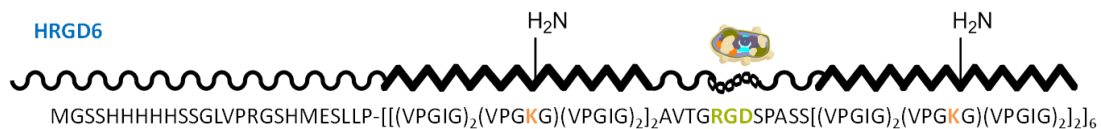
cadena carbònica per hidròlisi ester. Per això es conserva en ambient sec (dins el congelador), per evitar la seva gradual degradació.

- **Mescla PLA / PEG (70/30):** El PEG (polietilenglicol), és una molècula hidròfila (té afinitat amb l'aigua) que mostra una major estabilitat que el PLA.
- **Mescla PLA / PEG (70/30) + 50% NaCl:** en aquest cas hi afegim clorur de sodi per observar si l'addició d'aquest component, soluble en aigua, pot fer variar positivament els resultats a través de l'addició de porus en el material quan és dissolt.

Aquests tres materials diferents els hem preparat en forma de film mitjançant una vaporització en una cambra saturada de cloroform gas. Els polímers i les seves variants es solubilitzen en un solvent orgànic (cloroform) per a la seva manipulació. L'evaporació del solvent dona lloc a l'obtenció de films. La saturació de l'aire amb cloroform en la cambra on es produeixen els films es realitza per reduir la velocitat d'evaporació del solvent, donant lloc així a una superfície del film més llisa i regular.

Després de l'obtenció de films, s'ha procedit a modificar-ne químicament la seva superfície. Aquesta part té com a objectiu que el material indueixi a una bona adhesió cel·lular. Per poder fer-ho, hem utilitzat *Elastin-Like Polymers* (ELPs), uns polímers de naturalesa peptídica obtinguts a través de la modificació genètica de la proteïna elastina, d'origen natural. Els ELPs tenen una seqüència específica en la seva cadena, la qual és reconeguda per les proteïnes d'adhesió ubicades a la membrana cel·lular (les integrines). La seqüència és específica del llinatge cel·lular i permet la formació de punts focals. Si no introduïssim ELPs al PLA, les cèl·lules no reconeixerien la superfície i no s'adheririen a ella. Hem fet servir dues classes de ELPs:

- **HRGD6:** ELP que incorpora una seqüència d'adhesió cel·lular específica de teixit ossi: el tripèptid RGD.



- **REDV:** ELP que incorpora una seqüència d'adhesió cel·lular específica de teixit epitelial: els aminoàcids REDV.



Hem funcionalitzat els materials covalentment unint els ELP amb el material mitjançant un enllaç covalent, un tipus d'enllaç molt fort i estable. Per fer-ho, hem trencat els enllaços ester de les cadenes carbòniques del film de PLA amb NaOH 0,5M durant 30 minuts. Després hem reactivat la superfície a través de la reacció química amb la molècula N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) i la carbodiimida EDC. Això permet la formació d'un complex intermediari en el qual la molècula NHS queda unida als carboxils obtinguts en la hidròlisi ester de les cadenes de PLA. Aquest complex activat carboxil-NHS pot reaccionar amb els grups amino (-NH₂) de les biomolècules ELP i permetre la unió covalent.

3.2. Assajos de caracterització del material

3.2.1. Degradació del material

L'objectiu d'aquest experiment és determinar la velocitat de degradació dels materials. Per fer-ho posarem mostres de cada material en aigua i a 37°C (temperatura fisiològica) i mesurarem la seva pèrdua de pes al llarg d'un nombre de dies determinat. Per realitzar la degradació del material necessitem el material en forma de film, que prepararem a la primera part de les pràctiques, però sense funcionalitzar. El protocol que hem seguit era assecat les mostres, pesar-les i introduir-les de nou en aigua i a 37°C fins a l'últim dia de la degradació.

3.2.2. Calcinació

Aquest experiment el realitzem únicament amb el material que conté sal, ja que l'objectiu és saber la quantitat de sal i de polímer que hem perdut a la degradació. Per aquesta raó la primera part (pèrdua de pes) la realitzarem conjuntament amb la degradació. Un cop realitzada, procedirem a la calcinació en si. El protocol que hem seguit es basa en agafar les mostres, assecat-les, ubicar-les dins del forn amb cicles d'escalfament a 600°C (per tal d'evaporar tot el polímer i que quedi només la sal) i pesar la sal restant. D'aquesta manera podrem saber quanta sal s'ha degradat, a partir de la concentració de sal inicial i de la massa final. A l'annex 5.4. hi ha els protocols i els càlculs.

3.2.3. Angle de contacte

L'angle de contacte es realitza per estudiar la hidrofobicitat dels materials. La tècnica consisteix en calcular l'angle que forma una gota dipositada sobre la mostra. Per realitzar l'angle de contacte necessitem el material en forma de film, però sense funcionalitzar. Els factors que varien l'angle de contacte són la hidrofilitat, ja que si atrau l'aigua l'angle serà més petit, i la topografia del material, perquè si és rugós menys quantitat d'aigua arribarà al material i l'angle serà més gran.

3.2.4. Comparació entre la funcionalització covalent i fisisorbida

La funcionalització del material es pot realitzar de dues maneres: fisisorbida i covalent. Cada una representa unes avantatges i uns inconvenients: mentre que la fisisorbida manté una simplicitat en el protocol –ja que evadeix tots els tractaments químics– és menys estable (formada amb molts enllaços febles de Van der Waals, però tot i així no és del tot estable); per contra, la funcionalització covalent té una sèrie de passos més costosos en quant a temps i reactius, però assegura una funcionalització més estable (unió amb enllaços químics, forta, fixa i permanent). Les realitzarem ambdues i després durem a terme la quantificació de proteïnes per gram de material mitjançant un assaig colorimètric i una prova d'absorbància. D'aquesta manera veurem si hi ha diferències en quantitat de proteïna funcionalitzada, una informació que pot ser rellevant a l'hora d'escollir la metodologia.

3.3. Caracterització de la resposta biològica

Hem cultivat cèl·lules del moll d'os de rata sobre els materials funcionalitzats per observar en quin d'ells s'hi adhereixen més cèl·lules i millor. El protocol de cultiu que vam seguir va ser preparar el medi on sembrar-les, preparació de les cèl·lules per la sembra, sembra, càlcul de la concentració amb una cambra de Neubauer i preparació de solucions per la tinció. Després de cultivar-les les vam fixar i tenyir fluorescentment per poder-les observar al microscopi. Es van prendre fotografies de les cèl·lules i calcular les seves àrees per saber en quin material s'han adherit millor.

4. Resultats i conclusions

4.1. Cultiu cel·lular al material

A partir de les àrees de les cèl·lules hem realitzat uns histogrames on s'indica la freqüència d'àrees cel·lulars en trams. Els histogrames obtinguts es troben a l'annex 5.1. Anàlisi del resultat:

- **Control placa:** en l'histograma 1a podem observar que hi ha menys cèl·lules i més arrodonides, tenint menys punts focals. Predominen les àrees al voltant dels 500 a 6500 μm^2 .
- **Fibronectina:** respecte el control placa hi ha més cèl·lules i molt més estirades. Es veuen molt clarament les fibres de actina. Predominen les àrees de 3000 a 9000 μm^2 , en l'histograma 1b, i de 2000 a 8000 μm^2 al 1c.
- **REDV:** són una mica més petites que les de la fibronectina, tot i així presenten molts més punts focals, cosa que significa que s'han adherit millor. Les àrees van de 500 a 5000 μm^2 , com podem observar a l'histograma 1d.
- **RGD:** hi ha molta diversitat de mides (a l'histograma 1e hi ha més freqüència d'àrees que van des dels 500 als 11500 μm^2) i les cèl·lules presenten més punts focals que el REDV.

A partir dels resultats podem concloure que és millor utilitzar REDV perquè s'adhereixen moltes més cèl·lules i millor, presenten molts punts focals.

4.2. Angle de contacte

A la taula 2a (veure annex 5.2.) hi ha anotats els angles que hem obtingut a partir del càlcul de l'angle de contacte de cada material. A partir de la mitjana i la desviació estàndard de cada resultat, hem realitzat el gràfic 2b (també a l'annex 5.2.).

A partir del gràfic podem observar que l'angle de contacte és més alt en PLA sol, d'una mitjana de 81,53°, cosa que significa que és més hidròfob, tal i com ens esperàvem. En canvi, les mostres de PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl, tenen un angle de contacte més petit, una mitjana de 67,55°, o sigui que són més afins amb l'aigua, també corroborant la hipòtesis. El PLA/PEG (70/30) té un angle de contacte de 78,73°, més petit que el de PLA sol, cosa que vol dir que és més afí amb l'aigua i que les propietats del PEG influeixen més en l'angle de contacte que no pas la topografia del material, ja que aquesta mostra era més rugosa que el PLA sol. Tot i així, hi ha poques diferències estadístiques significatives per poder extreure conclusions rellevants.

A causa d'això, hem de tenir en compte quins factors influeixen a variar els angles de contacte: la hidrofilitat i la topografia. Les poques diferències entre materials poden ser degudes a que no les vam enganxar bé i per tant la seva topografia ha variat. També pot haver passat que la velocitat d'evaporació amb el cloroform no fos l'adequada i que variessin les propietats del material (més o menys hidròfil) o que no es formés un film perfecte (canvis en la topografia).

4.3. Degradació

A la taula 3a (veure annex 5.3.) hi ha anotades les masses de les mostres que hem pesat al llarg dels dies i les seves mitjanes, com també el càlcul del tant per cent que tenim i el que s'ha degradat. A partir del tant per cent que s'ha degradat, hem realitzat el gràfic 3b (a l'annex).

Podem observar que el PLA / PEG + NaCl es degrada molt més ràpid que el PLA + PEG i que el PLA sol es degrada molt lentament. El PEG és molt més hidròfil (afinitat per l'aigua) i es

degrada més ràpidament, i com que la sal es degrada en aigua, la mostra de PLA/PEG + NaCl tenia més quantitat de material que es degradava ràpid comparat amb els altres. Quan posem PLA sol és poc degradable perquè té un 95% de xarxes cristal·lines, i com més cristal·lí és menys degradable és. Quan hi posem PEG té menys pes molecular i trenca les xarxes cristal·lines.

4.4. Calcinació

A l'annex 5.4. hi ha les masses obtingudes després de la calcinació. A partir d'aquestes dades hem calculat (càlculs i procediments a l'annex 5.4.) el tant per cent de ELP i NaCl perduts durant la degradació, anotats a la taula de continuació:

	% ELP perdut	% NaCl perdut
1	85,80 %	32,36 %
2	90,54 %	8,11 %
3	77,31 %	29,23 %

Podem veure que si s'afegeix un 50% de sal a la mescla de PLA/PEG 70/30, el ELP es degrada molt més que si no en poséssim., com podem observar a partir dels resultats de la degradació.

4.5. Comparació entre la funcionalització covalent i fisisorbida

A la taula 5a i 5b hi ha els resultats de l'absorbància que ha mesurat l'espectrofotòmetre de la recta patró i de les mostres respectivament. A més hem realitzat una altra taula (5c) amb la mitjana dels valors d'absorbància de la recta patró per poder fer una gràfica (5d) i relacionar-los amb la concentració coneguda.

La funció recta que hem obtingut ens relaciona els valors d'absorbància amb els valors de concentració, ja que mantenen una relació lineal i directament proporcional (com més quantitat d'ELP, més color violeta a l'assaig microBCA i per tant més absorbància mesurada per l'espectrofotòmetre). Nosaltres volem saber la quantitat de ELP que tenim a les mostres per tant a partir de la fórmula de la gràfica, obtindrem les concentracions que busquem.

Fem una altra taula amb els valors d'absorbància mitjans de cada mostra i calculem la concentració a partir de la fórmula de la recta:

Mostra	Absorbància (y)	Càlculs	Concentració ug/ml (x)
<i>Covalent</i>	0,30956667	$y = 0,0107x + 0,1104$ $x = (y - 0,1104) / 0,0107$	18,6137072
<i>Fisisorbit</i>	0,1815		6,64486007

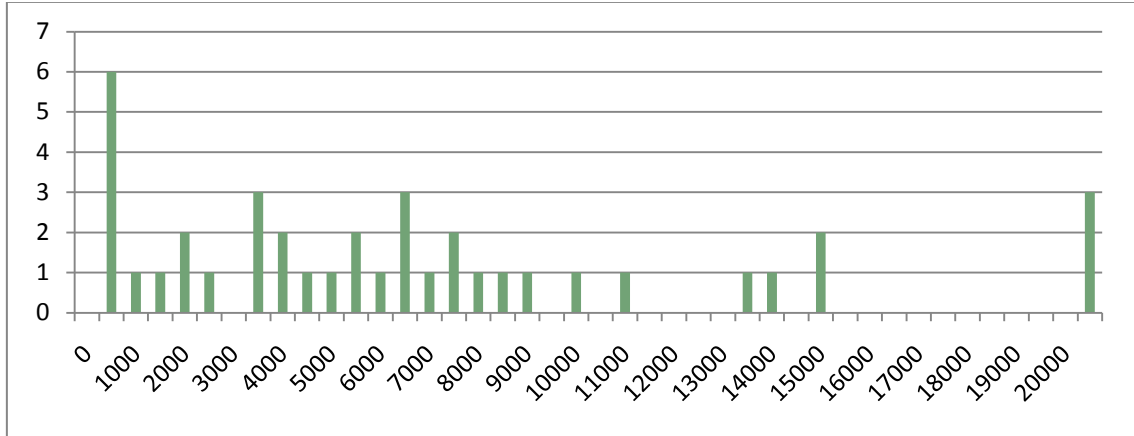
A partir d'aquesta taula podem afirmar que la funcionalització realitzada covalentment té una concentració més elevada de ELP comparada amb la fisisorbida per tant és millor funcionalitzar covalentment que per fisisorbsió.

5. Annexos

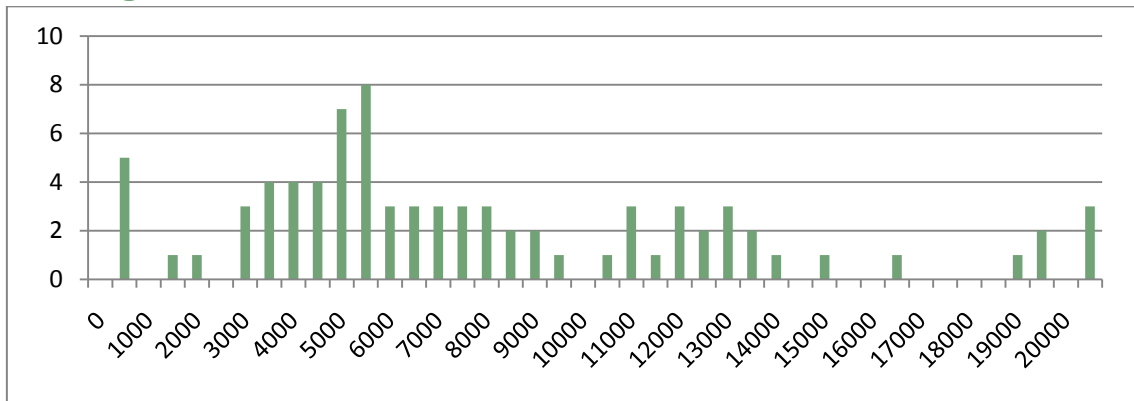
5.1. Cultiu

A continuació hi ha els histogrames que hem obtingut:

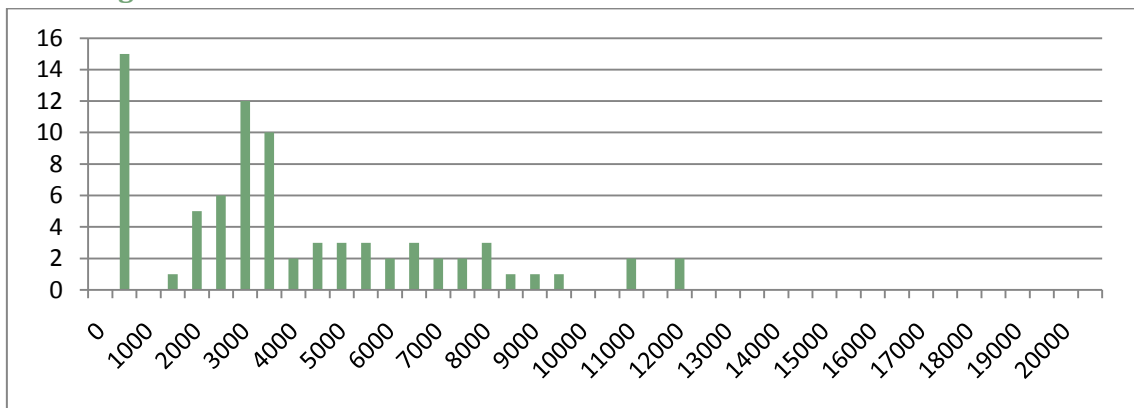
1a. Histograma del control placa



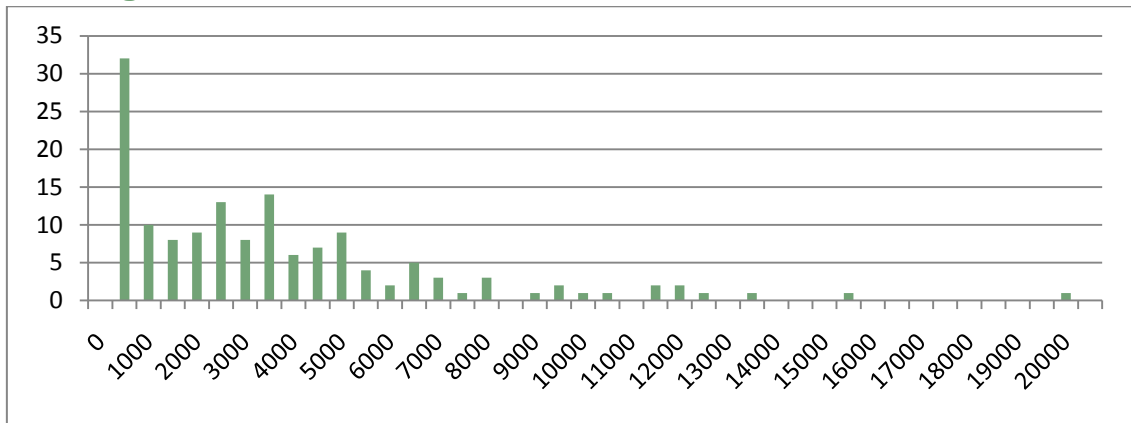
1b. Histograma de la 1a. mostra de fibronectina



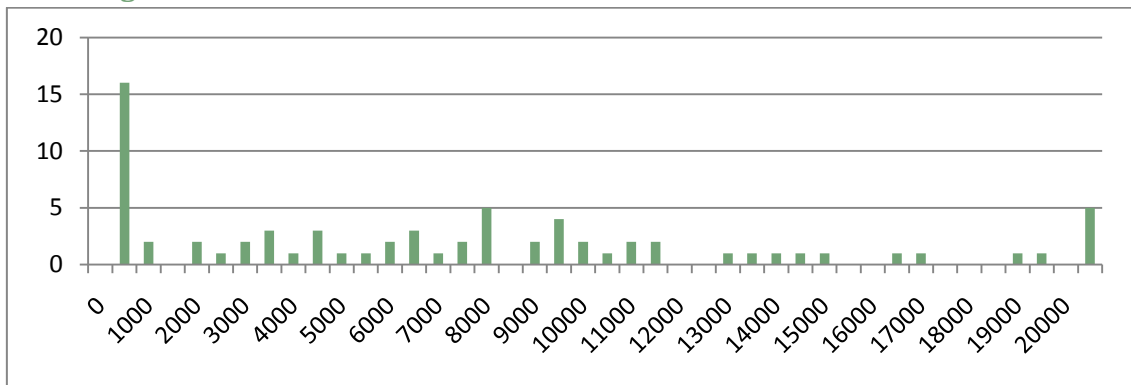
1c. Histograma de la 2a. mostra de fibronectina



1d. Histograma de la 3a. mostra de REDV



1e. Histograma de la 1a. mostra de RGD



5.2. Angle de contacte

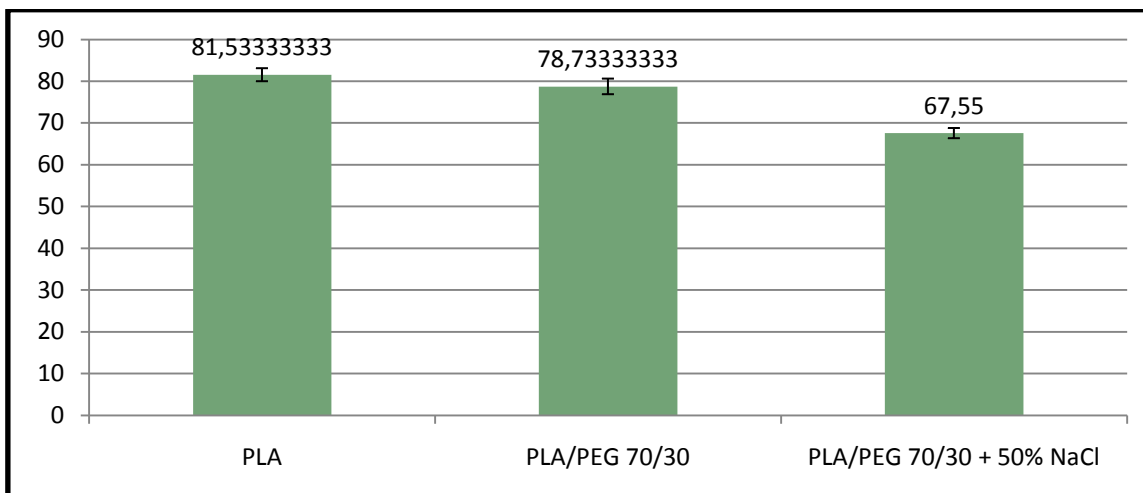
2a. Taula

En aquesta taula hi ha anotats els angles de contacte obtinguts amb l'aparell de mesura. El DE és la desviació estàndard, la diferència entre l'angle més gran i el més petit. La m és la mitjana de totes les mostres, que utilitzarem per fer el gràfic i comparar l'angle de contacte en les diferents mostres.

Mostres	PLA	PLA/PEG 70/30	PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl
1	81,4	76	66,2
2	85,5	77,3	64,7
3	82,3	79	69,9
4	78,8	76,1	66
5	77,2	78	71
6	84	86	67,5
m	81,53333333	78,73333333	67,55
DE/2	1,560021367	1,869135272	1,220143434

2b. Gràfic

Aquest gràfic compara les mitjanes dels distints angles de contacte de les mostres per poder observar gràficament les diferències entre materials:



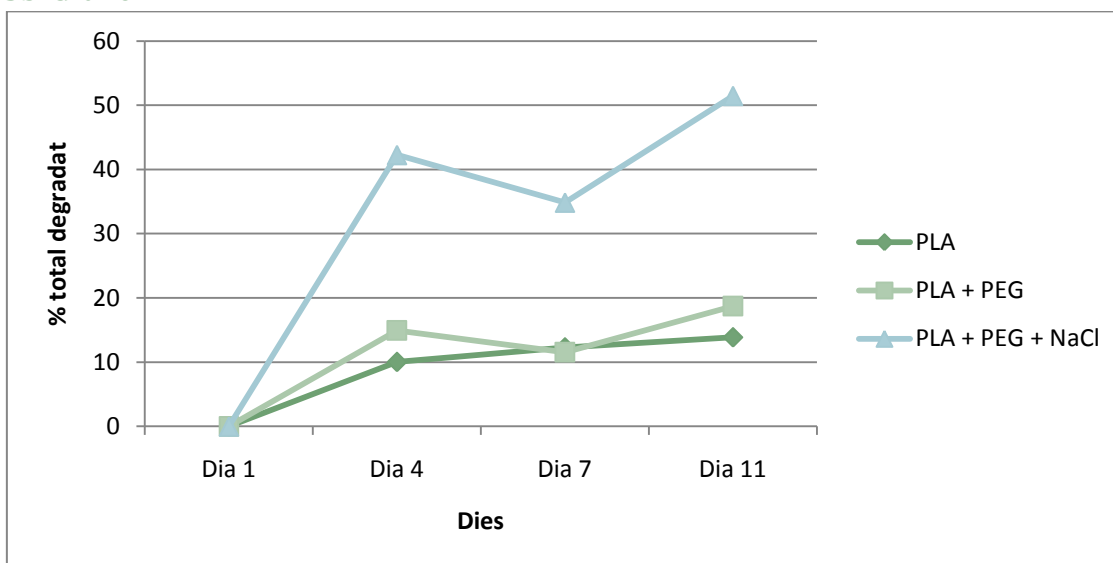
5.3. Degradació

3a. Taula

Resultats de la degradació al llarg dels dies, amb les mitjanes i els percentatges que tenim i degradat:

Mostres		Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11
PLA	1	0,0406	0,0375	0,0355	0,0349
	2	0,0345	0,0305	0,0305	0,0298
	3	0,0137	0,0119	0,0119	0,0118
	m	0,0296	0,02663333	0,02596667	0,0255
	% que tenim	100	89,9774775	87,7252252	86,1486486
	% s'ha degradat	0	10,0225225	12,2747748	13,8513514
PLA + PEG	1	0,018	0,0145	0,0149	0,0137
	2	0,0154	0,014	0,0142	0,0129
	3	0,0168	0,0142	0,0153	0,0142
	m	0,01673333	0,01423333	0,0148	0,0136
	% que tenim	100	85,059761	88,4462151	81,2749004
	% s'ha degradat	0	14,940239	11,5537849	18,7250996
PLA + PEG + NaCl	1	0,0457	0,0278	0,0261	0,0247
	2	0,0425	0,0278	0,0294	0,0191
	3	0,0455	0,0216	0,0316	0,0211
	m	0,04456667	0,02573333	0,02903333	0,02163333
	% que tenim	100	57,7412117	65,1458489	48,5415108
	% s'ha degradat	0	42,2587883	34,8541511	51,4584892

3b. Gràfic



A partir de la gràfica podem observar un error de mesura el dia 7, ja que és impossible que hi hagi hagut un augment de pes al llarg dels dies. Podem suposar que és degut a que no vam eixugar correctament les mostres amb aire i que quedava una mica d'aigua, cosa que va fer augmentar el seu pes. El PEG absorbeix molta aigua per això costa eixugar-lo i pesar-lo correctament (com podem veure a la gràfica les mostres que contenen PEG són les que han variat més el dia que no les vam eixugar prou bé).

5.4. Calcinació

Després dels dies de degradació que les mostres de la calcinació han passat conjuntament amb les altres, les hem pesat amb una balança i hem obtingut les seves masses (en grams) ordenades a la següent taula:

Mostra	Abans degradació (m_{m0})	Després degradació i abans calcinació (m_{mi})
1	0,0479	0,0196
2	0,0444	0,0225
3	0,0520	0,0243

Extraiem els crisols del forn quan ja estan freds i els tornem a pesar. A la següent taula hi ha una relació de les masses en grams que hem obtingut:

	Crisol + mostra abans calcinació (m_{c+mi})	Crisol + mostra després calcinació (m_{c+mf})
1	11,5670	11,5508
2	12,7026	12,6822
3	13,0978	13,0794

Durant la degradació, s'ha després ELP i NaCl. En canvi, a la calcinació, només s'ha després ELP. D'aquesta manera podem saber quanta quantitat de sal hi havia abans i després de la degradació a la mostra:

$$m_{\text{NaCl } i1} = m_{\text{NaCl } f1} = m_{i1} - m_{f1} = 11,5670 - 11,5508 = 0,0162 \text{ g}$$

$$m_{\text{NaCl } i2} = m_{\text{NaCl } f2} = m_{i2} - m_{f2} = 12,7026 - 12,6822 = 0,0204 \text{ g}$$

$$m_{\text{NaCl } i3} = m_{\text{NaCl } f3} = m_{i3} - m_{f3} = 13,0978 - 13,0794 = 0,0184 \text{ g}$$

Com que ja sabem la quantitat de sal que teníem abans de la degradació i també la massa de la mostra, podem calcular la quantitat de ELP fent una resta:

$$m_{\text{ELPi1}} = m_{mi1} - m_{\text{NaCl}i1} = 0,0196 - 0,0162 = 0,0034 \text{ g}$$

$$m_{\text{ELPi2}} = m_{mi2} - m_{\text{NaCl}i2} = 0,0225 - 0,0204 = 0,0021 \text{ g}$$

$$m_{\text{ELPi3}} = m_{mi3} - m_{\text{NaCl}i3} = 0,0243 - 0,0184 = 0,0059 \text{ g}$$

Per altra banda, calcularem la quantitat de ELP i de clorur de sodi que teníem al començament. Recordem que les mostres estaven formades per PLA / PEG en una proporció de 70/30 i hi havia un 50 % de clorur de sodi, és a dir, la meitat era ELP i l'altre NaCl. Calcularem els grams de cada component que hi havia a cada mostra:

$m_{m01} = 0,0479$		$m_{m02} = 0,0444$		$m_{m03} = 0,0520$	
ELP	NaCl	ELP	NaCl	ELP	NaCl
0,02395	0,02395	0,0222	0,0222	0,0260	0,0260

A les següents taules hi ha ordenades totes les dades que hem obtingut:

	Mostra 1		Mostra 2		Mostra 3	
Abans degradació	m_{01} 0,0479		m_{02} 0,0444		m_{03} 0,0520	
	$m_{\text{ELP}01}$ 0,02395	$m_{\text{NaCl}01}$ 0,02395	$m_{\text{ELP}02}$ 0,0222	$m_{\text{NaCl}02}$ 0,0222	$m_{\text{ELP}03}$ 0,0260	$m_{\text{NaCl}03}$ 0,0260
Abans calcinació	m_{i1} 0,0196		m_{i2} 0,0225		m_{i3} 0,0243	
	m_{ELPi1} 0,0034	$m_{\text{NaCl}i1}$ 0,0162	m_{ELPi2} 0,0021	$m_{\text{NaCl}i2}$ 0,0204	m_{ELPi3} 0,0059	$m_{\text{NaCl}i3}$ 0,0184
Després calcinació	m_{f1} 0,0162		m_{f2} 0,0204		m_{f3} 0,0184	
	m_{ELPf1} 0	$m_{\text{NaCl}f1}$ 0,0162	m_{ELPf2} 0	$m_{\text{NaCl}f2}$ 0,0204	m_{ELPf3} 0	$m_{\text{NaCl}f3}$ 0,0184

L'objectiu principal de la calcinació és conèixer la quantitat de ELP i de NaCl que s'ha després a la degradació. Per saber-ho farem una resta:

$$m_{\text{ELPd1}} = m_{\text{ELP}01} - m_{\text{ELPi1}} = 0,02395 - 0,0034 = 0,02055 \text{ g}$$

$$m_{\text{ELPd2}} = m_{\text{ELP}02} - m_{\text{ELPi2}} = 0,0222 - 0,0021 = 0,0201 \text{ g}$$

$$m_{\text{ELPd3}} = m_{\text{ELP}03} - m_{\text{ELPi3}} = 0,0260 - 0,0059 = 0,0201 \text{ g}$$

$$m_{\text{NaCl}d1} = m_{\text{NaCl}01} - m_{\text{NaCl}1} = 0,02395 - 0,0162 = 0,00775 \text{ g}$$

$$m_{\text{NaCl}d2} = m_{\text{NaCl}02} - m_{\text{NaCl}2} = 0,0222 - 0,0204 = 0,0018 \text{ g}$$

$$m_{\text{NaCl}d3} = m_{\text{NaCl}03} - m_{\text{NaCl}3} = 0,0260 - 0,0184 = 0,0076 \text{ g}$$

Per poder treure conclusions passem aquestes masses en tant per cent de massa perduda respecte l'inicial, realitzant en tots els casos el càlcul següent:

$$\% \text{ ELP}_{d1} = \frac{m_{\text{ELPd1}}}{m_{\text{ELP0}}} \cdot 100 = \frac{0,02055 \text{ g ELP}}{0,02395 \text{ g ELP}} \cdot 100 = 85,80\%$$

	% ELP perdut	% NaCl perdut
1	85,80 %	32,36 %
2	90,54 %	8,11 %
3	77,31 %	29,23 %

5.5. Absorbància

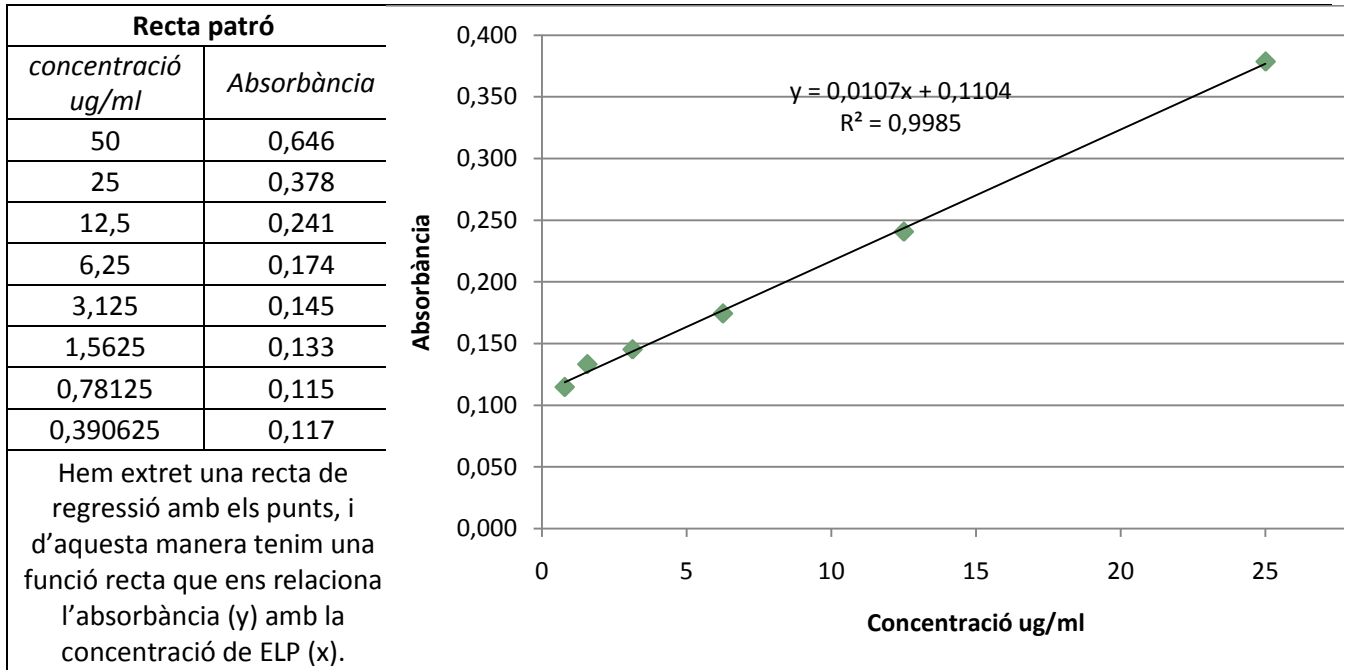
5a. Taula

Recta patró								
ug/ml	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125	0,390625
Absorbància	0,66000003	0,38080001	0,2421	0,16689999	0,145	0,12890001	0,1162	0,1278
	0,66109997	0,38260001	0,2357	0,1814	0,1488	0,12540001	0,1182	0,1168
	0,61809999	0,37189999	0,2441	0,17470001	0,142	0,1454	0,1099	0,1078

5b. Taula

Absorbància de les mostres	
Covalents	Fisorbides
0,3364	0,1874
0,24779999	0,1754
0,34450001	0,18170001

5c. Taula i 5d. Gràfica



CARACTERITZACIÓ DE MATERIALS BIODEGRADABLES PER A LA REGENERACIÓ ÒSSIA

Laia Gil Molas (IES Jaume Callís, Vic) & Joaquim Viñes Pujol

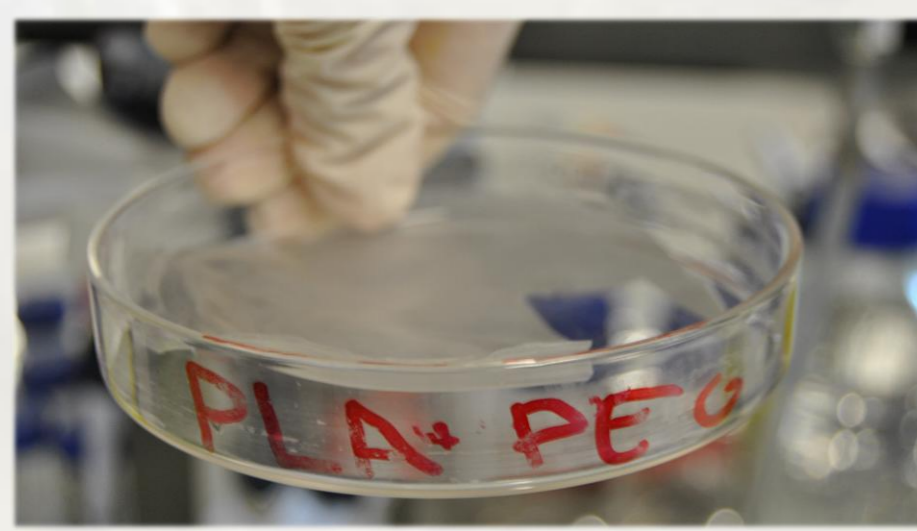
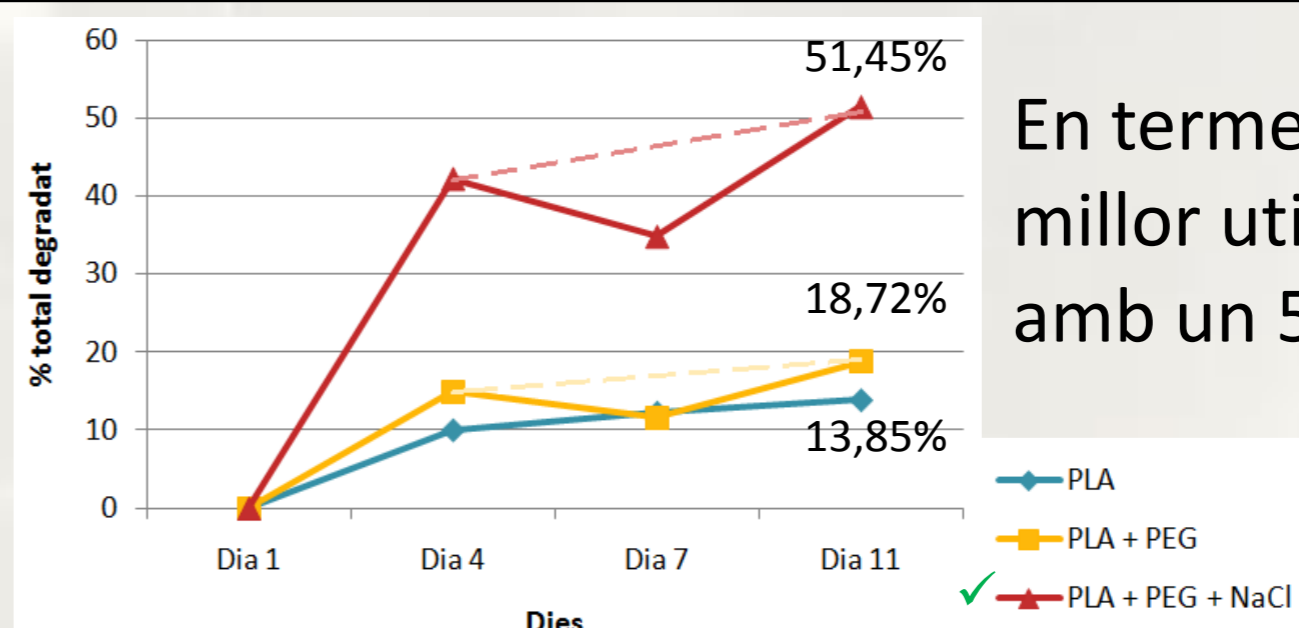

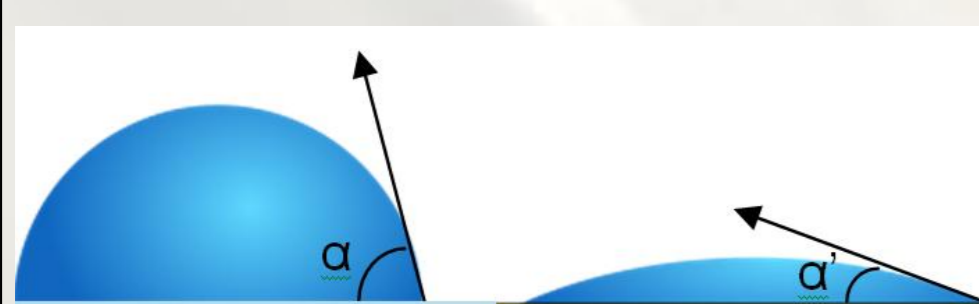

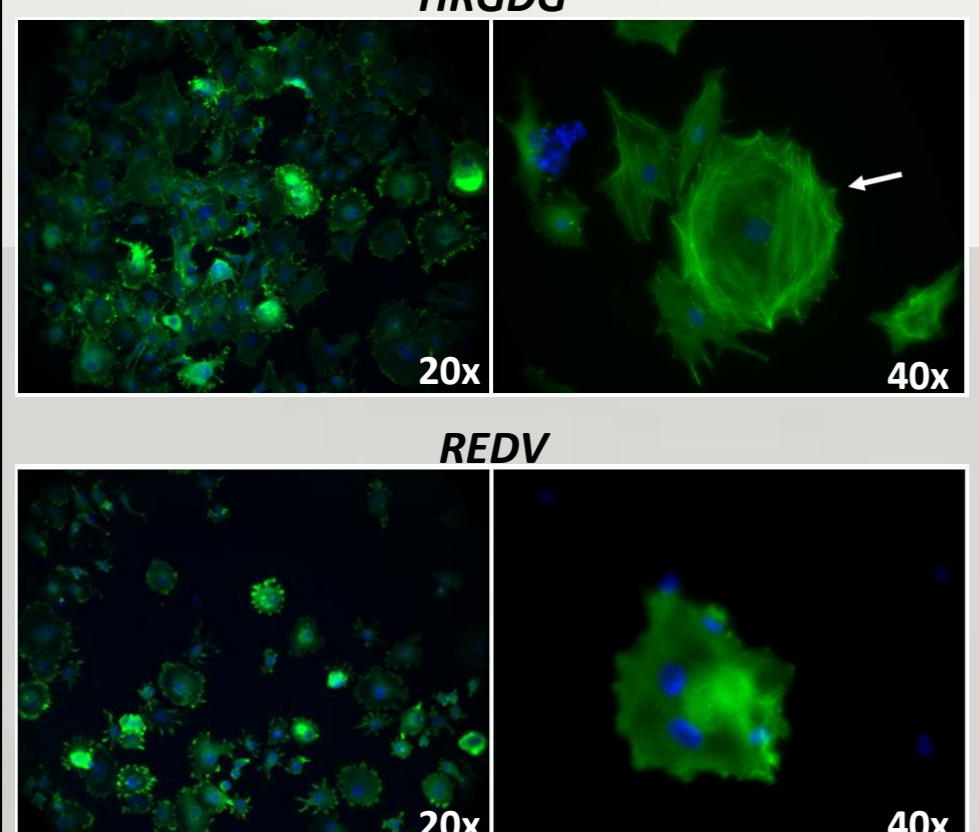
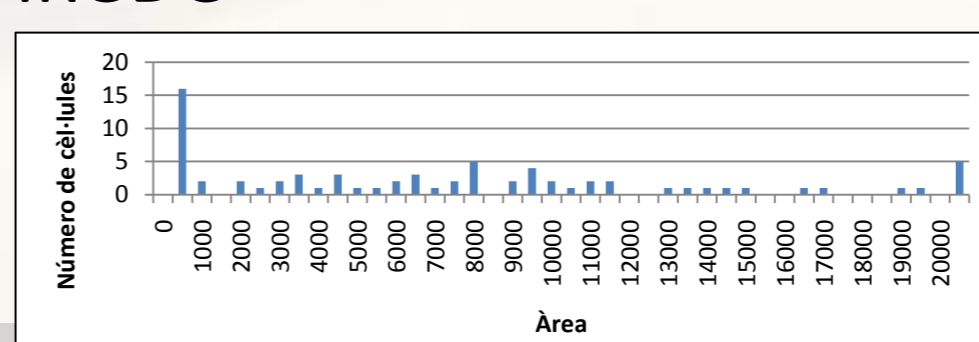
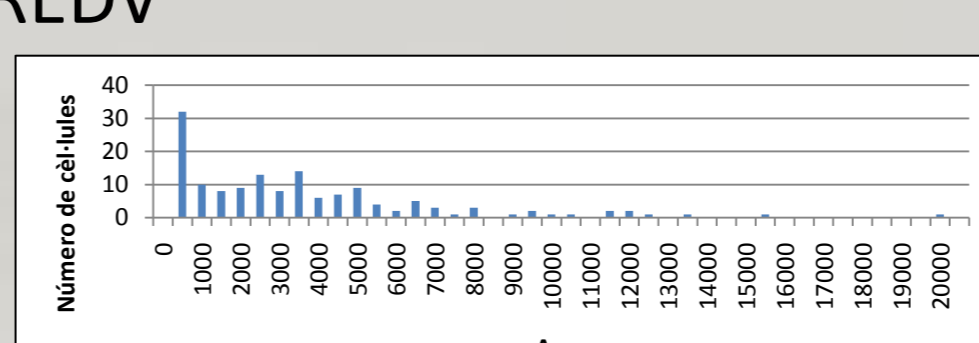
(INS Fontanelles, Les Borges del Camp)

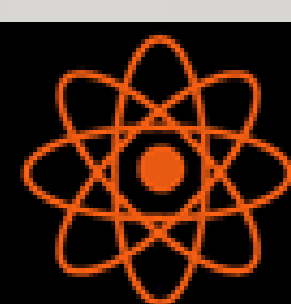
IBEC (Institute for Bioengineering of Catalonia)

Programa Joves i Ciència de Catalunya Caixa Obra Social

INTRODUCCIÓ

Actualment l'enginyeria de teixits està desenvolupant materials biodegradables com a substituïts orgànics en el tractament de lesions òssies. Hem preparat i funcionalitzat materials de naturalesa polimèrica, en concret PLA (àcid polilàctic), PLA/PEG (70/30) i PLA/PEG + 50% NaCl, per a poder realitzar diferents assajos de caracterització de la seva superfície i conèixer les seves propietats, d'aquesta manera determinar quin d'ells seria més apte pel tractament de lesions òssies.

ASSAJOS	OBJECTIUS I HIPÒTESIS	RESULTATS I CONCLUSIONS						
DEGRADACIÓ 	OBJECTIU: determinar la velocitat de degradació dels materials dins d'un medi semblant al del teixit ossi. HIPÒTESI: el material amb el component no polimèric (PLA/PEG + NaCl) serà el que es degradarà més ràpid.	 <p>En termes de degradació, és millor utilitzar PLA/PEG 70/30 amb un 50% de sal.</p>						
CALCINACIÓ 	OBJECTIU: saber la quantitat de NaCl i polímer perduda a la degradació del material que en conté. HIPÒTESI: l'addició d'un component no polimèric fa que el polímer es degradi més ràpidament.	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Degradació del PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl</th> </tr> <tr> <th>Polímer degradat</th> <th>NaCl degradat</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>84,55%</td> <td>23,23%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Amb la calcinació s'ha confirmat que és millor emprar PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl.</p>	Degradació del PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl		Polímer degradat	NaCl degradat	84,55%	23,23%
Degradació del PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl								
Polímer degradat	NaCl degradat							
84,55%	23,23%							
ANGLE DE CONTACTE 	OBJECTIU: estudiar l'afinitat per l'aigua que tenen els materials. HIPÒTESI: l'angle de contacte més petit serà de la mostra PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl.	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>PLA</td> <td>81,53°</td> </tr> <tr> <td>PLA/PEG 70/30</td> <td>78,73°</td> </tr> <tr> <td>✓ PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl</td> <td>67,55°</td> </tr> </tbody> </table> <p>El PLA/PEG (70/30) + 50% NaCl és més afí en aigua, condició favorable perquè se li s'adhereixen més cèl·lules.</p>	PLA	81,53°	PLA/PEG 70/30	78,73°	✓ PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl	67,55°
PLA	81,53°							
PLA/PEG 70/30	78,73°							
✓ PLA/PEG 70/30 + 50% NaCl	67,55°							
FUNCIONALITZACIÓ 	OBJECTIU: comparar la funcionalització covalent i la fisisorbida. HIPÒTESI: la covalent és millor respecte la fisisorbida.	<p>La covalent és millor perquè té una concentració major d'ELP, i com més n'hi ha, més cèl·lules s'hi adhereixen.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Mostra</th> <th>Concentració ug/ml (x)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>✓ Covalent</td> <td>18,6137072</td> </tr> <tr> <td>Fisisorbida</td> <td>6,64486007</td> </tr> </tbody> </table>	Mostra	Concentració ug/ml (x)	✓ Covalent	18,6137072	Fisisorbida	6,64486007
Mostra	Concentració ug/ml (x)							
✓ Covalent	18,6137072							
Fisisorbida	6,64486007							
RESPOSTA BIOLÒGICA 	OBJECTIU: realitzar un cultiu de cèl·lules per poder esbrinar quin ELP és més adient, observant els punts focals que es formen, les àrees i el nombre de cèl·lules. HIPÒTESI: les cèl·lules amb HGDR6 s'adheriran més satisfactòriament, presentant més punts focals, amb àrees més grans i en més quantitat.	<p>HRGDG ✓</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Moltes cèl·lules - Àrees més grans - Més punts focals <p>REDV</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Més cèl·lules - Àrees petites - Bastants punts focals 						



PROGRAMA JOVES I CIÈNCIA DE CATALUNYACAIXA



ibec Institut de bioenginyeria de Catalunya





Off to a flying start

High school students Joaquim Viñes (left), Laia Gil (right) and Laia Gili (second from right) joined IBEC researchers Melba Navarro (second from left) and Cécile Perrault (centre) for some hands-on lab experience during July. The visitors, who stayed at IBEC for two weeks, were participants in CatalunyaCaixa's E²C³ Youth and Science Programme, which exposes talented and motivated young students to 'real' scientific work to encourage more of them to embark on a scientific career.

Strength in numbers

IBEC's Communications and Events units have merged to combine their expertise and provide the best support and services to researchers.

The new unit, Communications and Outreach, is the overall responsibility of Vienna Leigh. Pilar Jiménez will continue to manage events, and Àngels López and Marta Redón will provide support to both. Marta, formerly of HR, will also continue her previous responsibilities of booking travel and accommodation.

"Communications and outreach in a research institute like IBEC are vitally important to encourage continued financial support based on our reputation for top results and transparency, and to attract the best researchers," says Vienna. "With funding coming from outside, we also have a moral obligation to help advance the public understanding of science and to encourage the next generation of researchers."



L-r: Vienna (standing), Pilar, Àngels and Marta

"We've got so many ideas about adding to and improving our activities both externally and internally, and I hope that combining our resources and skills will allow us to achieve more of these faster. It's the same for events; we'll work to develop a reputation for providing top-class conferences, symposia and meetings to provide the best knowledge exchange for our researchers, students and visitors."

The team has moved to floor 10 of Tower I at the PCB, and they'll be operating an 'open door' policy for all queries, suggestions or gripes, and inviting researchers to visit regularly for a coffee, glass of cava or just a chat. "One of the most important and immediate areas to work on is internal communication, both to build a sense of 'belonging' for everyone within IBEC and to facilitate further scientific collaboration," says Vienna. //



Learning to communicate

Throughout the year, IBEC's researchers have had the chance to improve their complementary skills at a selection of workshops aimed at supplementing their professional expertise. This year, training was focused on efficiency in communication in three main areas: scientific writing, oral presentations, and communicating with colleagues.

"While most researchers are fluent in spoken English, when writing their PhD theses, publishing articles or participating in competitive EU projects, we've noticed that they need help to communicate their scientific results clearly, succinctly and – when necessary – persuasively," says Head of HR Carol Marí, who organised the training. To this end, the Writing Style Workshop: What Makes a Competitive Proposal? aimed at senior researchers, postdocs and project managers was held every Thursday in November, and in the same month a one-day Scientific Writing workshop attracted 28 PhD students.

In June, 11 PhD students were given the opportunity to improve their confidence in presenting in English at scientific conferences. Later in the semester, while the Leadership and Management of Challenging Situations was the last of a cycle of workshops addressed to group leaders and heads of units, 16 support staff took part in the workshop Efficient Communication, aimed at improving customer service and communication between the different support units. "I learnt that I often have a very inflexible stance, so I'll try to use a more collaborative approach," remarked one participant afterwards. "It's been a great team experience, as we've helped each other to find solutions," said another.

"All the courses scored between 8 and the maximum 10 points in the questionnaires afterwards," says Carol. "We're glad that they fit peoples' requirements and that we're on the right track to help the IBEC community with their career progression."