

Treball de Recerca

**Biomaterials per a la
regeneració de teixit ossi**

Els meus sincers agraïments a la Isabel Ligeró, que ha tutoritzat i ajudat moltíssim en aquest treball de recerca, i a la Melba Navarro, investigadora de l'IBEC que ha dirigit tota la meua estada en el laboratori i ha respòs totes les preguntes que li he fet. Per altra banda, no vull oblidar-me de recalcar que la part pràctica del treball no hauria estat possible sense l'experiència que el programa Joves i Ciència de la fundació Catalunya La Pedrera m'ha ofert.

També cal agrair la col·laboració de la Dra. Mitjans, el Dr. Ximeno i el Dr. Pérez, que van dedicar-me una estona per contestar-me una entrevista.

Índex

0. Introducció	1
1. Fonaments de la regeneració òssia	3
1.1. Els ossos	3
1.1.1. Concepte d'os	3
1.1.2. Osteogènesis	4
1.1.3. Procés de calcificació dels ossos (mineralització)	6
1.1.4. El manteniment d'un bon estat del sistema ossi	7
1.2. Substitució i regeneració dels ossos	7
1.2.1. Tipus de fractures o alteracions que pot patir un esquelet	7
1.2.2. Tipus de transplantaments	9
1.2.3. Enginyeria òssia: els seus pilars	9
1.2.4. Polímers biodegradables	12
1.2.5. Àcid polilàctic (PLA)	14
1.2.6. Polimerització de l'àcid polilàctic	14
1.2.7. Metabolisme del PLA	15
1.2.8. Mètodes de fabricació de <i>scaffolds</i>	16
1.2.9. Caracterització dels materials	17
1.2.10. Mètodes d'esterilització de polímers biodegradables	20
1.2.11. Vidre G5 (P ₂ O ₅ - CaO-Na ₂ O-TiO ₂)	20
2. Experimentació amb <i>scaffolds</i>	22
2.1. Primera part: construcció de <i>scaffolds</i>	22
2.1.1. Introducció	22
2.1.2. Material	23
2.1.3. Mètodes utilitzats	24
2.2. Segona part: inserció de cèl·lules per a la comparació de la bioconductivitat dels dos tipus d'andamis	25
2.2.1. Introducció	25

Índex

2.2.2. Material	25
2.2.3. Preparació del medi: esterilització i preparació	26
2.2.4. Mètode utilitzat	26
2.2.4.1. Preparació de les cèl·lules per al cultiu	26
2.2.4.2. Cultiu de cèl·lules sobre el material	28
2.2.4.3. Tinció de les cèl·lules per al microscopi de fluorescència	28
2.3. Resultats	29
2.4. Conclusió	30
3. El PLA fora dels laboratoris	31
3.1. La sortida dels laboratoris dels descobriments	31
3.2. Utilització de l'àcid polilàctic en la traumatologia actual	32
3.3. Les mesures d'esterilització a l'hora d'implantar una pròtesi	32
3.4. Avantatges i inconvenients del PLA	33
3.5. El preu del PLA, un avantatge?	33
3.6. Nous camps d'investigació del polilàctic	33
3.7. Visions de futur dels transplants	34
4. Conclusions	35
5. Bibliografia	37
Annex 1: Neubauer Improved (imatge gràfica i càlcul de la quantitat de cèl·lules realitzat al IBEC)	39
Annex 2: Entrevistes	41
1. Melba Navarro	41
2. Doctora Montserrat Mitjans	43
3. Doctor Lluís Ximeno	45
4. Doctor Albert Pérez	48

0. Introducció

En un món en que cada vegada els individus tenen una esperança de vida més i més alta per factors alimentaris, mèdics i ambientals, la ciència es veu obligada a treballar a contrarellotge per tal de mantenir la nostra qualitat de vida. Tot i això, l'envelliment de l'organisme és inevitable (de moment), i és que, els nostres gens no venen codificats per mantenir en plena salut els teixits del cos encara que és cert que algunes parts han patit una evolució que les ajuda a no desgastar-se tant ràpidament. Hi ha oberts moltíssims projectes d'investigació que estudien les diferents maneres d'intentar mantenir un estat de salut òptim.

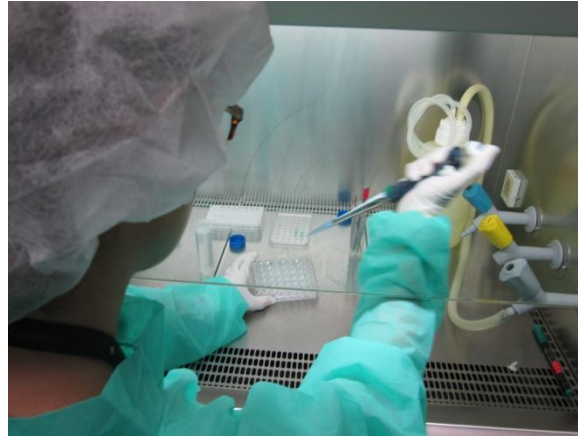
Una de les parts que no ha evolucionat és el sistema ossi. Això provoca que hi hagi un desgast molt fort al llarg dels anys. Per altra banda, deixant enrere el factor del desgast, els ossos també pateixen lesions que poden venir donades per un afebliment de la zona, càncers, ... En un principi, per tal d'ajudar a la fixació d'ossos trencats, s'utilitzaven plaques metàl·liques que no sempre donaven bona resposta immunològica. Per tal de solucionar aquest problema s'han dissenyat biomaterials amb característiques bioactives i bioabsorbents que permeten intervenir quirúrgicament al pacient només una vegada i que, quan es degraden, deixen l'os reparat i sense seqüeles.

Al llarg d'aquest treball, s'ha intentat entendre el mecanisme de reparació d'ossos danyats per algun tipus de càncer o lesió (cops, trencaments, ...) a partir de la utilització d'esponges de PLA (un biomaterial que compta amb la propietat de la bioabsorbència) i també, d'una combinació de PLA i vidre G5. A més, s'ha comparat com varia l'adhesió de les cèl·lules i la colonització en els dos tipus d'esponja ja mencionats. Aquesta experimentació s'ha pogut realitzar gràcies a una beca del programa de Joves i Ciència de la Fundació Catalunya La Pedrera, que m'ha permès accedir a estar dues setmanes, sota la supervisió de Melba Navarro, en un grup d'investigació de biomaterials per a teràpies regeneratives al *Institute for bioengineering of Catalonia* (IBEC).

Les principals motivacions per les que el tema escollit ha estat el de la regeneració òssia es redueixen al fet de voler provar un camp de la medicina relacionat amb la

Introducció

investigació, conèixer més dels sistema ossi i experimentar amb aquest camp per tal d'acabar de decidir què estudiar al finalitzar el Batxillerat. Per altra banda, també s'ha pogut comprovar la principal hipòtesi: la regeneració òssia a partir de la utilització de materials biodegradables és efectiva.



Imatge 0. Jo treballant en condicions estèrils a un laboratori de l'IBEC.

1. Fonaments de la regeneració òssia

1.1. Els ossos

1.1.1. Concepte d'os

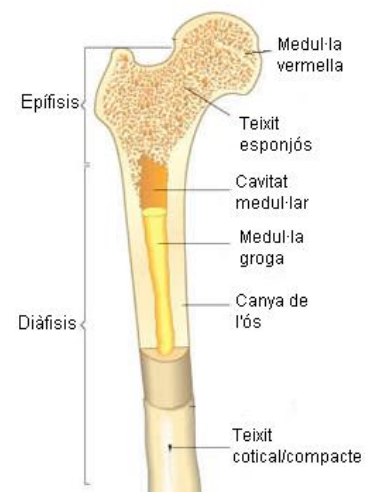
Els ossos són teixit conjuntiu de gran duresa que permet que el nostre cos tingui una forma i una rigidesa, una protecció dels òrgans i fa possible el moviment. A més, realitzen la important funció de crear cèl·lules sanguínies i regulen l'equilibri de sals en el medi intern.

Aquests estan composts per làmines concèntriques en les que trobem una matriu (estructura porosa que dona rigidesa a l'os), osteòcits (cèl·lules especialitzades dels ossos) separats per col·lagen i osteïna (la concentració d'aquesta varia amb l'edat de l'os) i parts d'altres sistemes com vasos sanguinis (que passen pels conductes de Havers), nervis, cartílags i materials minerals com fosfats de calci, fosfats de magnesi i carbonats de calci.

Una altra característica principal és que la calcificació que es produeix per tal d'endurir l'os és un procés que passa quan s'acumula una quantitat elevada de calci que provoca que deixi de ser tou. Tot i això, allò que marcarà el moment en què un os és rígid i elàstic a un xoc serà el medi que l'envolta que ve donat per una concentració d'aigua, matèria orgànica i sals minerals adequada, no solament la seva calcificació.

Un sol os acostuma a tenir dos tipus de teixits:

- Esponjós: format per espícules¹ de teixit i espais medul·lars. Té una gran quantitat de vasos sanguinis i és el lloc ideal per l'hematopoesi (formació de glòbuls vermells) ja que aquest teixit forma la medul·la òssia vermella (lloc on es formaran les cèl·lules sanguínies i les cèl·lules que



Imatge 1. Parts d'un os llarg

¹ Espícula: és una estructura microscòpica de naturalesa inorgànica que pot ser de naturalesa calcària, sílicia o còrnia.

formen els ossos (osteòcits, osteoblasts, i osteoclasts). També s'hi produeix l'activitat metabòlica, intercanvi d'ions de calci. Aquest tipus de teixit el trobem a l'interior de l'epífisi.

- Compacte/cortical: part externa del ossos que no té espais entre les diferents capes, cosa que li permet ser dur. La seva funció és protegir la part tova, suportar bé el pes del cos, emmagatzemar minerals, etc.

A la diàfisi trobem, dins del teixit compacte, la medul·la òssia groga, on es formaran les cèl·lules sanguínies.

Per altra banda, hi ha varis tipus d'ossos:

- Curts: són petits i proporcionats per tots els costats. Acostumen a estar situats a les mans, peus i esquena.
- Plans: tenen més superfície que volum. Els trobem al crani, omòplat, estèrnum, etc.
- Llargs: longitud gran. En diferenciem clarament l'epífisi i la diàfisi. En trobem a la cama, braç, etc.

1.1.2. Osteogènesi

L'osteogènesi és el procés en el que, a l'os, se li incorporen noves cèl·lules per tal de créixer al mateix temps que la resta del cos o per tal de regenerar teixit ossi. Trobem dos processos possibles per a la formació òssia:

- Endocondral: procés que sovint es produeix en els fetus en què un os es forma a partir d'un cartílag. Això es produeix quan el teixit ossi comença a formar-se al voltant d'aquest cartílag i, poc a poc, s'incorporen cèl·lules òssies al teixit cartilaginós. Hi intervenen els osteoblasts, per la formació del teixit, i els osteoclasts, per la resorció². Formen ossos de les extremitats.

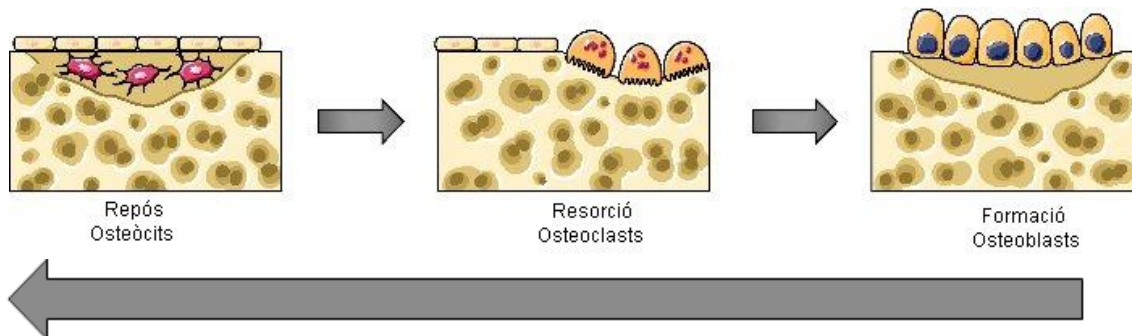
² Resorció: Absorció de matèria orgànica (com teixit ossi) a partir dels osteoblasts. Els ions de calci que es dependran d'aquest procés seran enviats a la sang.

Fonaments de la regeneració òssia

- Intramembranosa: creació de teixit sense una matriu càlcica. Es produeix sobre teixit cartilaginós a partir d'osteoblasts que es diferencien en osteòcits. Formen ossos plans.

En els dos tipus de formació intervien diverses cèl·lules:

1. Osteoblasts: són les cèl·lules encarregades de formar substància òssia, concretament la matriu. Tenen dos estats possibles: actiu (forma una capa de cèl·lules que es connecten entre elles formant una xarxa) i passiu o osteòcit (no sintetitza res).
2. Osteòcits: fase en la que un osteoblasts s'acumulen en la matriu i es transformen cèl·lules òssies madures que s'adapten a l'os mineralitzat.
3. Osteoclasts: cèl·lula provinent de la fusió de monòcits. Té com a funció la remodelació i resorció del teixit ossi a partir del lloc on se situen, anomenat llacuna de Howship.



Imatge 2. Procés d'ossificació i cèl·lules que hi intervien

Durant els primers anys de vida dels vertebrats, els osteoblasts treballen molt més que els osteoclasts. A partir dels 13-14 anys d'edat es crea un equilibri entre osteoclasts i osteoblasts fent que al llarg d'un sol any es regeneri un 5-15%. Aquest procés contribueix a mantenir l'os fort i reparar petites lesions. A la tercera edat es comença a perdre al voltant d'un 1% de teixit ossi a l'any degut a causa de que l'equilibri osteoblast-osteoclast es perd. Hi ha vegades que fins i tot, especialment en dones, es pot arribar a prendre entre un 3-5%.

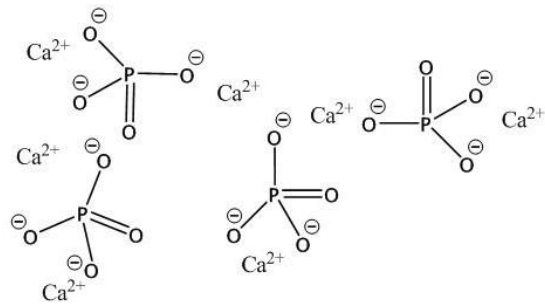
El creixement dels ossos pot ser de dues maneres diferents:

- Gruix: el diàmetre de l'os es mantindrà sempre. A partir de cèl·lules presents en la capa interna, on hi ha cèl·lules osteoprogenitores, es començaran a dividir fins que es diferenciïn en osteoblasts. Llavors, aquests, es dipositaran a la superfície externa (periosti) i sintetitzaran matriu orgànica, que poc a poc es mineralitzarà. Al quedar-se atrapats en la matriu es convertiran en osteòcits.
- Longitud: és com el procés endocondral, es va substituint teixit cartilaginós per teixit ossi i, lentament, es va creant teixit sòlid.

Aquests processos són regulats per les glàndules endocrines (tiroide i hipòfisi), que segreguen les hormones tiroxina i del creixement.

1.1.3. Procés de calcificació dels ossos (mineralització)

La mineralització del teixit ossi es caracteritza per tenir com a component principal la hidroxiapatita (fosfat de calci). Trobem que els ions de calci i fosfats inorgànics que les cèl·lules específiques (induïdes a formar matriu) utilitzen per a formar matriu òssia provenen de l'exterior i, la sang, els transporta. Aquesta matriu comença estant formada per proteïnes i lípids que, amb els ions en estat de sobresaturació i



catalitzadors, es transformen en hidroxiapatita que acabarà formant cristalls.

La primera hipòtesis sobre com era el procés de calcificació va ser proposada per Franz Hofmeister l'any 1910. Ell va suggerir, a partir d'observar que la fosfatasa alcalina era activa en les àrees en les que l'os calcificava, que els mecanismes que utilitzava el cos eren una precipitació espontània de fosfat de calci a partir de l'enzim fosfatasa alcalina.

En l'actualitat sabem que el procés de calcificació segueix uns passos i que té un factor local que fa que només se'n creï en zones determinades. En primer lloc, el calci

s'enllaça amb proteïnes de col·lagen i després s'enllaça un grup fosfat formant un complex proteïna–calci–fosfat. El col·lagen (també pot l'elastina) indueix a formar cristalls d'apatita. Cal dir que la fosfatasa alcalina elimina els grups d'estrès de fosfats que puguin impedir la calcificació. Durant la maduració es perd matèria orgànica (proteïnes) i aigua.

1.1.4. El manteniment d'un bon estat del sistema ossi

Quan ens posem a pensar què s'ha de prendre per tal d'enfortir i mantenir una bona salut dels nostres ossos sovint pensem en la ingesta d'aliments amb calci però hi ha altres factors, com les correctes postures, que poden ajudar, també, a evitar el desgast.

Si focalitzem aquesta conservació del bon estat en els bons hàbits alimentaris hem de tenir en compte que no només és important el calci, que el podem trobar en el peix, mol·luscs, llet, llegums i fruita seca entre d'altres. També hem de tenir en compte que el fòsfor, que el trobem en la carn, peix, crustacis i xocolata, per exemple, és imprescindible d'una manera similar. A part, hauríem de controlar que s'aportin suficients vitamines, especialment la D (adquirida per aliments i per el Sol), ja que actua com a factor regulador de l'ossificació i el creixement.

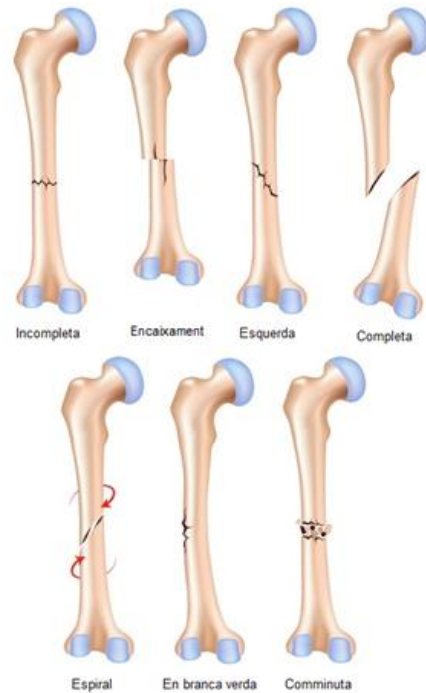
1.2. Substitució i regeneració dels ossos

1.2.1. Tipus de fractures o alteracions que pot patir un esquelet

Com que els ossos es caracteritzen per tenir una flexibilitat limitada, tenen una alta probabilitat de fracturar-se. És per això que hi ha moltes maneres de fer-se una fissura o trencament i, en conseqüència, molts tipus de fractures:

Fonaments de la regeneració òssia

- Completes: trencament en el que se separa l'os en dos trossos.
- Incompleta: mantenen una certa continuïtat.
- Tancada: l'os no travessa el teixit cutani
- Oberta: travessa el teixit cutani.
- Comminuta: quan l'os queda reduït a resquills en el lloc del impacte.
- En branca verda: fractura parcial per un cantó de l'os mentre l'altre s'encorba.
- Espiral: la línia de trencament segueix una direcció espiral en relació a l'eix de l'os, que es torça.
- Encaixament: un fragment penetra dins de l'altre.
- Esquerdes: pèrdua parcial de la continuïtat.



Imatge 4. Tipus de fractura

Per altra banda, hi ha les malalties que afecten als ossos, com són l'osteoporosi i els tumors. En el cas de l'osteoporosi el que passa és que hi ha una disminució de la densitat òssia i, per tant, la fragilitat d'aquest teixit augmenta. Sol produir-se en la menopausa de les dones. Al parlar de tumors, tant benignes com malignes, no poden definir-se ni les causes ni les conseqüències ja que és un camp sobre el qual s'està investigant encara. Altres que també resulten ser força freqüents són l'artrosi i l'osteoartritis, malalties reumàtiques que es produeixen especialment en dones, en les que el desgast del cartílag produeix dolor perquè entre os i os no hi ha cap protecció.

Altres patologies més estranyes són l'osteomielitis (infecció òssia que es pot produir per la presència en el teixit de *Staphylococcus aureus*), la malaltia de Paget (engruïment i estovament anormal dels ossos en individus de més de 50 anys del que se'n desconeix la causa), raquitisme (deformació dels ossos per falta de vitamina D), ...

1.2.2. Tipus de transplantaments

A l'hora de reparar un teixit, allò que fins ara s'ha dut a terme amb més freqüència ha estat el transplantament. L'aparició de l'enginyeria de teixits ha revolucionat aquest camp tot i que, al focalitzar-nos en el camp dels ossos, trobem l'avenç més importat.

Les teràpies usades per danys parcials o totals eren els transplantaments i n'hi ha de diversos tipus:

- Autoempelt: implant d'un teixit del mateix pacient d'una part a una altra del cos. Els avantatges d'aquest mètode són l'osteoconductivitat (matriu perfecte per la proliferació de les cèl·lules), l'osteoinductivitat (proliferació de cèl·lules no diferenciades) i les propietats osteogèniques (les cèl·lules poden generar la regeneració ràpida del teixit ossi). Sempre resulta un èxit però té un problema evident, i és que poques vegades podem utilitzar ossos grans d'un mateix individu.
- Aloempelt: a partir d'un cos humà mort se n'extreuen ossos per a ser trasplantats a persones vives. Els resultats són menys positius perquè la pròtesi no conté cèl·lules osteoprogenitores i, sovint es produeix una reacció immunitària de rebuig. A més, a l'existir la possibilitat de transmetre agents patògens no és una tècnica massa utilitzada.
- Xenoempelt: fragments d'os provinents d'animals, moltes vegades modificats genèticament, que s'implanten en humans. Aquesta tècnica està en una fase experimental i, per això, no és gaire freqüent.

1.2.3. Enginyeria òssia: els seus pilars

Actualment, l'esperança de vida ha augmentat considerablement i amb això, el nombre de pacients que esperen ser trasplantats d'algun òrgan també ho ha fet. Amb aquesta necessitat ha aparegut l'enginyeria de teixits, que té com objectius sintetitzar *biocomposites* que tinguin com a resultat que un os artificial sigui similar a l'os natural.

S'ha començat a buscar i crear materials que simulen un os però aquests materials no tenen un origen viu i presenten desavantatges com el desgast, la fatiga, les fractures, la toxicitat i la no remodelació amb el temps. Avui en dia ja s'utilitzen diversos que s'adeqüen a algun dels factors que s'han de tenir en compte:

- **Compatibilitat:** el material ha de realitzar la funció per la qual ha estat creat sense malmetre l'organisme.
- **Duració:** el contacte amb els teixits vius no ha de provocar reaccions que el desgastin i/o que puguin fer mal al pacient. També s'ha de tenir en compte la durada que el material ha de tenir (definitiu o provisional).
- **Concentració i composició:** quan un material es dissenya s'ha de preveure la quantitat de partícules que s'alliberaran pel desgast o degradació. La composició d'aquests l'acostuma a estudiar la química bioinorgànica.

A partir d'aquestes premisses s'han dissenyat diversos composts que es trasplanten amb la intenció de substituir o reparar teixit:

- **Composts polimèrics:** són xarxes d'hidrogen, carboni i oxigen. Es fabriquen de diverses formes, amb la capacitat de conformar teixits i fibres, i hi ha molta varietat. Tenen un caràcter temporal (biodegradabilitat) i pretenen substituir parcial o totalment teixits ossis (bioestabilitat). A més, solen ser biocompatibles tot i que tenen poca resistència i pateixen fatiga.
- **Composts metàl·lics:** són xarxes de Titani, Ferro, Cobalt, Tàntal, Plata, Or i Platí. El problema de la utilització de pròtesis compostes per algun d'aquests elements és que la concentració ha de ser moderada i que s'ha de buscar una resistència a la corrosió que s'aconsegueix amb materials molt cars. En tot cas, tenen una resistència elevada.
- **Composts ceràmics:** són els més recents ja que actualment s'investiga amb ceràmiques vives. Aquest tipus ofereix baixa reactivitat quan es tracta de ceràmiques inerts (les que són vives no són utilitzades per a la regeneració encara), bona osteointegració i biocompatibilitat. Per altra banda, són molt fràgils, no poden sotmetre's a prestacions mecàniques molt elevades.

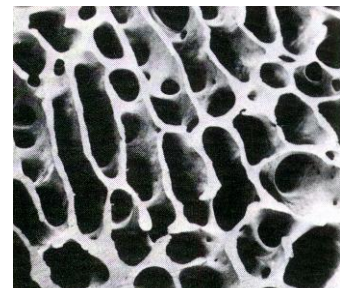
Amb qualsevol d'aquests tipus de composts es pretén substituir la part danyada *a priori* i, amb algun d'ells, la regeneració de l'os. Això es produeix amb les reaccions favorables que les ceràmiques bioactives duen a terme i alguns composts polimèrics. Ara s'està començant a treballar amb vidres, concretament vidres actius, que s'enllacen a l'os i amb ciments bioactius, que s'absorbeix i transforma en os.

Podem classificar els diferents materials segons la generació a la que pertanyen. Els composts metàl·lics els trobaríem en la primera generació de biomaterials ja que varen ser els primers a ser utilitzats. Seguidament apareixerien els composts ceràmics com a segona generació de biomaterials i finalment, els composts polimèrics, la tercera generació. Tot i que agrupem per generacions els materials de més antics a més nous, això no significa que no es faci recerca només en la tercera generació. [Més informació en l'apartat 1.2.4.]

Per a la cerca de materials que puguin substituir un teixit ossi a partir de cèl·lules es segueixen els pilars de la ITO:

1. Matriu tridimensional: l'objectiu que es té és imitar les condicions en que es regeneraria un os. Són dispositius que recolzen el creixement de les cèl·lules tenint en compte:

- a. Biocompatibilitat: la no toxicitat i la no resposta immunològica
- b. Porositat: ha de permetre la difusió de nutrients i l'expulsió de residus metabòlics.
- c. Mida del porus: entre 80 i 300 μm .
- d. Propietats de la superfície:
 - Topogràfiques: osteoconducció.
 - Químiques: adherir-se al material.
- e. Osteoinductivitat: cèl·lules mare i osteoprogenitores són reclutades al lloc de regeneració.
- f. Propietats mecàniques: lloc i forces mecàniques a les que es veu exposat.
- g. Biodegradables: anar-se gastant fins que al reparar la zona no quedi res.
- h. Material radiolúcid: així es pot diferenciar al fer radiografies.



Imatge 5. Matriu tridimensional dels ossos

2. Cèl·lules: s'utilitzen dos tipus:

- a. Cèl·lules mare: es necessiten unes característiques que a partir d'una cèl·lula mare es poden obtenir.
 - i. Embrionàries: es diferencien en qualsevol tipus de cèl·lula. Problemes ètics i d'extracció.
 - ii. Teixit adipós o medul·la òssia: fàcil extracció. Les més utilitzades per la ITO.
- b. Cèl·lules mare mesenquimàtiques: fenotip estable.

3. Factors de creixement

- a. Hibridació *in situ*: reacció en cadena de la polimerasa. Inducció a les cèl·lules del voltant.
- b. Proteïnes morfogèniques.
- c. Factor insulinoide de creixement.
- d. Factor transformant del creixement del tipus B.
- e. Creixement derivat de les plaquetes.
- f. Factor de creixement de fibroblasts.

Les estratègies que s'utilitzen són tenir en compte factors com el disseny de l'os, les xarxes vasculars, les cargues funcionals i l'estat del pacient. Tot i que es treballa per a cada cas de manera molt precisa, sempre hi ha la incertesa de si funcionarà o no allò que s'implanta i, per tant, s'ha d'investigar perquè no es pot saber la mecànica que actuarà sobre el implant en cada cas.

1.2.4. Polímers degradables

La traumatologia actual utilitza diversos tipus de materials que pertanyen a diferents blocs. Aquests blocs vénen determinats per les característiques que poden oferir, dins del cos, les pròtesis. Segons això trobem:

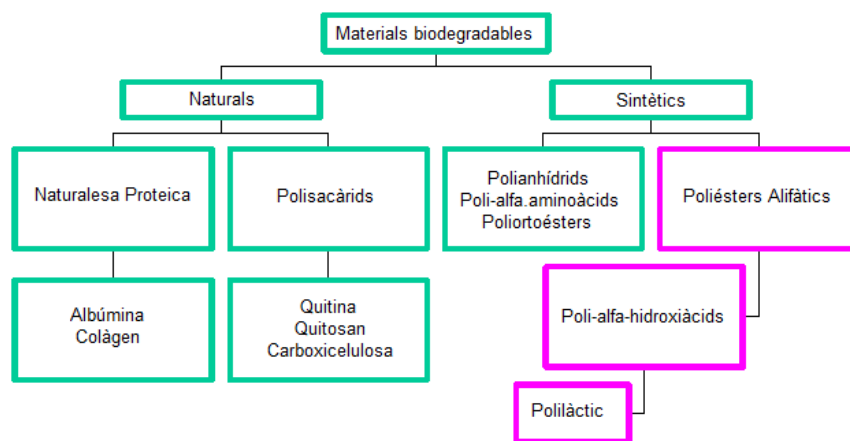
- 1^a generació: materials inerts o quasi inerts amb una mínima reactivitat química, ja que són molt pocs solubles dins del cos humà. Essencialment, la

Fonaments de la regeneració òssia

reacció fisiològica que es produeix passa al voltant de la pròtesi és la formació de teixit fibrós.

- 2^a generació: materials bioactius perquè reben una resposta immunològica específica que té com a resultat un enllaç material-teixit que, finalment, forma os. S'ha inclòs un gran nombre de materials en aquesta categoria com ceràmiques, vitroceràmiques i biovidres.
- 3^a generació: materials que combinen la capacitat bioactiva amb la biodegradabilitat. A més, al ser biocompatibles amb el cos ofereixen la possibilitat de la reabsorció no tòxica per l'organisme. En aquest grup solem trobar polímers biodegradables i materials ceràmics.

Dins de la 3^a generació, en la que ens centrarem al llarg del treball, hi ha diversos tipus de materials que es poden usar en la medicina regenerativa. D'aquests materials podem diferenciar els naturals (proteics o polisacàrids) i els sintètics, encara que els que més interès desperten són aquests últims. Dins d'aquesta família trobem que els més usats són el PLA (àcid polilàctic) i el PGA (àcid poliglicòlic), especialment el PLA, ja que resulta ser molt estable a llarg termini. També existeixen uns altres com la polidioxanona, el polítrimetilen-carbonat, ...



Imatge 6. Esquema dels tipus de materials

1.2.5. Àcid polilàctic (PLA)

Polímer biodegradable, derivat de l'àcid làctic, compost per C, H i O. S'utilitza en cirurgia ortopèdica i cirurgia oral i maxil·lofacial a base de cargols, claus i perns.

Les propietats més importants que el PLA ofereix a la ITO (enginyeria de teixit ossi) són la seva biodegradació i bioabsorbència. Amb això tenim la possibilitat de no intervenir dues vegades al pacient ja que, el PLA, al degradar-se, es converteix en àcid làctic, component que el cos pot metabolitzar. Un dels trets que no té i que resulta ser important per a la tercera generació de biomaterials és la bioactivitat. Per altre banda, el compost resisteix a la humitat, té propietats mecàniques mitjanes-baixes comparat amb un compost metàl·lic i té un punt de fusió d'entre 40-50°C, generalment.

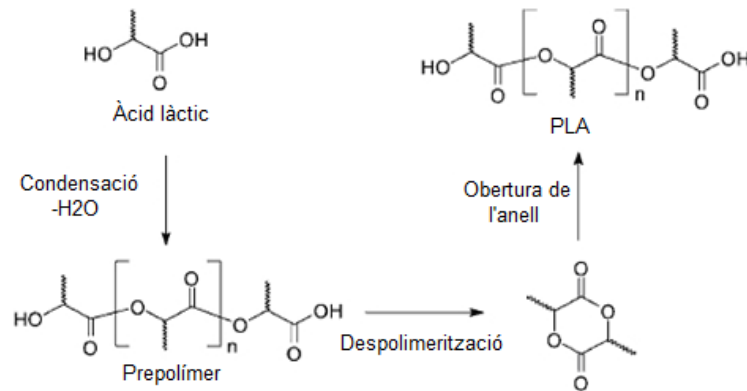
Hi ha dos tipus de PLA que es diferencia segons la manera en que s'ordenen els seus àtoms. Per una banda trobem la part amorfa (DL), similar a la distribució dels vidres (molt desordenada), i per l'altre, la part cristal·lina (L), semblant a l'estructura de les ceràmiques (estructura molt ordenada i perfecte). L'estructura en la que els seus àtoms es distribueixen afecta a la degradabilitat, i és que com més ordenada estigui l'estructura més difícil i lenta és la degradació. Tenint en compte aquest factor, a l'hora de fabricar un implant de PLA podrem dictaminar el temps de degradació amb la concentració de cada tipus de polímer. Com més part amorfa tingui la pròtesi més ràpida serà la degradació i, per contra, com més cristal·lina, més lenta.

1.2.6. Polimerització de l'àcid làctic

L'obtenció d'aquest polímer consisteix en una primera síntesi d'àcid làctic i després una polimerització. Aquesta pot produir-se de dues maneres: en primer lloc pot ser per la condensació directa de l'àcid làctic (reacció d'equilibri) i, després, el mètode ROP (*ring-opening polymerization*). A causa de que el primer mètode ve condicionat per l'excessiva alliberació d'aigua en les últimes etapes i això limita el pes molecular, s'utilitza molt més el mètode ROP. Cargill Dow LLC ha desenvolupat un procés continu basat en el ROP, que consisteix en una policondensació de l'àcid làctic en un medi

Fonaments de la regeneració òssia

aquós de la que n'obtidrem un prepolímer de pes molecular baix. Després, el prepolímer es converteix en una mescla d'estereoisòmer³ de lactida mitjançant una catàlisi, permetent una ciclació selectiva. Es despolimeritza la mescla de lactida a partir d'una destil·lació al buit i, més tard, s'obre l'anell deixat el polilàctic format.

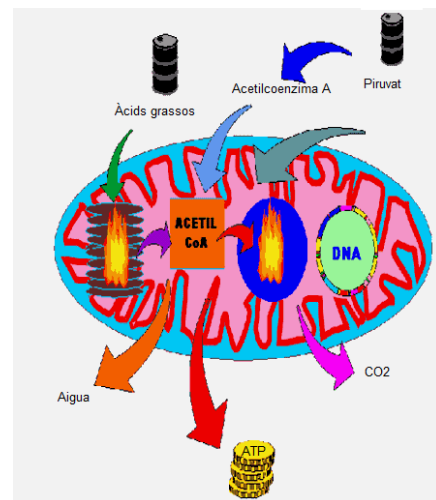


Imatge 7. Mètode de Cargill Dow LLC

1.2.7. Metabolisme del PLA

Una de les particularitats d'aquest material és que la seva degradació es produeix de dins a fora. Això passa perquè el PLA es degrada per hidròlisi, en contacte amb l'aigua es trenquen els enllaços donant lloc a àcid làctic. Aquest àcid làctic ajuda a que es vagin trencant els enllaços del seu voltant. Aquest tipus de degradació s'anomena en bloc.

Un cop tenim àcid làctic, aquest és metabolitzat pel cos a partir de l'enzim lactat hidrogenasa, que



Imatge 8. Cicle de Krebs

transformen el lactat en piruvat. Aquest pateix una descarboxilació oxidativa⁴ que produeix Acetil CoA. Aquesta molècula entra en el cicle del àcid cítric que es duu a terme a nivell mitocondrial (cicle de Krebs), del que se n'obté ATP, aigua i diòxid de carboni. Finalment, els residus poden ser eliminats per l'orina i la respiració.

³ Estereoisòmer: isòmer que té la mateixa seqüència d'àtoms units entre ells.

⁴ Descarboxilació oxidativa: reacció que elimina un grup carboxil i fora un grup acetil i allibera CO₂.

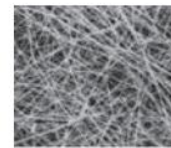
1.2.8. Mètodes de fabricació de scaffolds

Hi ha diversos mètodes que s'usen segons el resultat que vulguem obtenir. Els més utilitzats són:

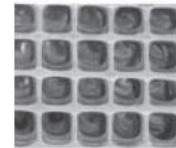
- *Solvent casting and particulate leaching*: dissolució d'un polímer en un solvent orgànic i addició de petites partícules insolubles en el dissolvent orgànic que permetin la porositat del *scaffold*. El procés consisteix a barrejar la dissolució de polímer i solvent orgànic amb una sal i col·locar-ho en motlles. Després d'esperar que el dissolvent s'evapori deixant el polímer i les partícules, introduïm els *scaffolds* en aigua destil·lada (dissolvent inorgànic) per poder eliminar la sal utilitzada deixant uns porus en el material.

Amb aquest mètode aconseguim una interconnectivitat entre porus sempre que tinguem la sal de diferents mesures (entre 80 – 300 μm).

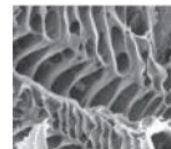
- *Electrospinning*: al estirar la solució de polímer i solvent a partir de camps elèctrics s'aconsegueix un teixit fibrós. El percentatge de interconnectivitat aconseguit és alt.



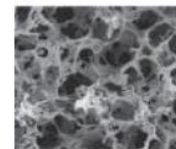
Electrospinning



Rapid prototyping



Phase separation



Solvent casting and particle leaching

- *Rapid prototyping*: a partir d'un disseny amb l'ordinador i un programari que fa lamines del disseny, una impressora 3D construeix l'estructura desitjada amb la dissolució de polímer.

Amb aquest mètode podem dissenyar el *scaffold* i, per tant, podem aconseguir la interconnectivitat i la mida del porus que vulguem.

- *Phase separation*: es prepara una dissolució de polímer amb un solvent de baix punt de fusió i se li afegeix un altre solvent com l'aigua. Es formen dues fases, una amb més i l'altra amb menys concentració de polímer. Fent el buit i refredant per sota del punt de fusió aconseguim una estructura bastant porosa en la qual es diferencia una zona més densa i una altra menys densa.

Imatge 9. Fibres que s'aconsegueixen segons el mètodes de fabricació de *scaffolds*

- *Fluid gassing*: semblant al SCPL, usem un gas en lloc d'una sal per tal d'obtenir els porus en el polímer. El seu major problema és que no aconseguim la interconnectivitat requerida.

1.2.9. Caracterització dels materials

Determinació d'estructures:

- Espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier (FTIR) i Raman: a partir de radiació electromagnètica es desprèn una energia provocada per la vibració dels enllaços químics i dels electrons que determina l'estructura química. Per la FTIR s'usa una làmpada de mercuri i pel Raman un làser.
- Difracció de rajos X: segons la difracció que un material cristal·lí presenti es podrà conèixer la seva composició química. Amb aquest mateix mètode també es pot determinar el grau de cristal·lització.
- Ressonància magnètica nuclear: a partir de canvis en l'estat d'espín del nucli d'un àtom es pot determinar l'estructura química, microestructura, ...

Determinació de pesos moleculars:

- Cromatografia de permeància de gels: el material diluït en un solvent circula a temperatura i velocitat constant a través d'una columna. Se separen les molècules més petites de les més grans, i és que les molècules més petites tenen més probabilitats de quedar retingudes als porus i fer un recorregut major, i les més grans, tindran menys espais pels quals podran passar, pel que travessaran la columna més ràpidament.

Determinació de propietats tèrmiques:

- TGA: seguir els canvis de la massa a partir de canvis tèrmics
- EGD i EGA: detecció i anàlisi dels gasos produïts per la seva descomposició

- Anàlisi Tèrmica Diferencial (ATD): comparació de la temperatura de la mostra amb un material inert que serà la referència mentre s'apliquen canvis de temperatura
- Calorimetria Diferencial d'Escombratge (DSC): comparació de la temperatura de la mostra amb or o alumini mentre s'apliquen canvis de temperatura
- Termodilatometria (TD): observació dels canvis dimensionals en funció de la temperatura

Determinació de la superfície de biomaterials:

- Mètodes espectroscòpics:
 - Vibracional: proporciona informació de l'estructura molecular, interacció entre molècules, orientació i conformació a partir de rajos infraroja. Es determina a partir de la transició vibracional que la superfície irradiarà.
 - Per a Anàlisi Química: s'indaga en la composició de superfícies solgudes a partir de la resposta a una irradiació de rajos X.
 - Electrònica Auger: s'investiga la morfologia superficial i composició en profunditat a partir d'un feix d'electrons que excita als de la superfície del material. Aquests són detectats i analitzats per així, determinar l'estructura.
 - De Masses d'Ions Secundaris: s'analitza la superfície de materials orgànics i inorgànics mitjançant un bombardeig d'ions i àtoms. Després d'això, es produeix una emissió de partícules secundàries per part del material que són detectades separant-les per massa/càrrega elèctrica.
- Mètodes Termodinàmics
 - Angle de contacte: a partir de la mesura de l'angle que forma la tangent d'una gota d'un líquid amb el sòlid, es determina la composició.

- Mètodes Microscòpics:
 - Microscopia Electrònica d'Escombratge: s'aconsegueixen imatges 3D de la superfície a partir d'un feix d'electrons que accelera les seves partícules sota el buit.
 - Microscopi d'Efecte Túnel: s'ofereix una imatge 3D de resolució atòmica a partir d'una sonda.
 - Microscopi de Força Atòmica: amb una punta s'aconsegueix una imatge topogràfica a partir del núvol electrònic de repulsió que quedarà entre el material i la punta.

Determinació d'interaccions biològiques:

- Ressonància de plasmó: s'aconsegueixen anàlisi a temps real de tot el que pot interaccionar en la superfície, la velocitat d'absorció,... També es poden visualitzar els canvis superficials.

Determinació de la porositat:

- Picnometria de mercuri: consisteix a submergir l'esponja en mercuri. Coneixent la densitat i la massa d'aquest, calculem el volum i, després, introduïm la mostra. El volum desplaçat serà el mateix que el de la mostra. Llavors, amb l'equació $\rho_{aparent} = \frac{M_{mostra}}{V_{Hg}}$ trobarem la densitat aparent que usarem en una altra equació en la qual trobarem el percentatge de porus ($\%P = \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_{Hg}}\right) * 100$). També es pot utilitzar la formula $P = \frac{V_{andami} - V_{despla\ çat}}{V_{Hg + andami} - V_{despla\ çat}}$.
- SEM: a partir de programes informàtics es determinarà la mesura i la porositat del *scaffold* a partir d'imatges 3D.

1.2.10. Mètodes d'esterilització de polímers degradables

Per esterilitzar materials biodegradables s'usen tècniques que mantenen una temperatura inferior a la T_g ⁵. Existeixen diversos:

- Òxid d'etilè: s'exposa el material al gas EtO i aquest actua en superfícies, principalment. El seu major problema és que el gas resulta ser inflamable, tòxic i reactiu. Per això, després de l'esterilització, s'ha de passar-se a un estat de quarantena.
- Irradiació de rajos gamma: amb els rajos gamma podem penetrar en la matèria. Per aquest motiu podem deixar el material totalment estèril.

1.2.11. Vidre G5 (P_2O_5 - CaO - Na_2O - TiO_2)

El vidre G5 és un fosfat compost per diversos òxids: òxid de fòsfor (V) (44,5%), òxid de calci (44,5%) , òxid de sodi (6%) i òxid de titani (5%). S'anomena així per el 5% de TiO_2 que conté i perquè és un vidre (G de *glass*). La cadena d'aquests té forma tetraèdrica. A cadascun d'aquests òxids li correspon una funció:

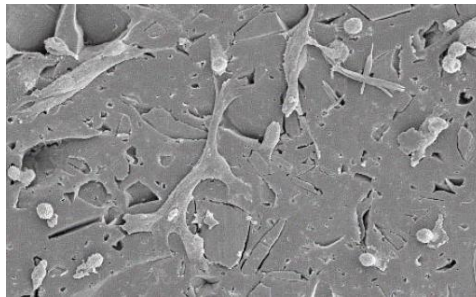
- Òxid de fòsfor (V): és la base de la cadena. El trobem com un dels components bàsics d'un os.
- Òxid de calci: forma part de la base de la cadena. És un component bàsic en els ossos. Atrau a les cèl·lules quan s'allibera Ca^{2+} perquè aquestes tenen receptors de calci.
- Òxid de sodi: acaba la cadena
- Òxid de titani: uneix cadenes del vidre entre elles gràcies a la seva petita mida (és reticular) i als seus 4 possibles enllaços. Permet que el material sigui més resistent i també controlar la degradació (al mantenir la cadena més unida triga més).

⁵ T_g : Temperatura de transició vítria: temperatura a la que les cadenes de polímers i vidres es mobilitzen. Pot indicar si el component està molt o poc reticulat.

El conjunt, en especial el P_2O_5 i el CaO , fan que el G5 sigui molt similar a la fase mineral de l'os. I és que la composició bàsica de la fase mineral és hidroxiapatita (fosfat de calci cristal·lí).

Aquest vidre, a més de resultar un bon conductor de cèl·lules gràcies a l'òxid de calci que conté i a les seves propietat hidròfiles, resulta permetre la creació de vasos sanguinis.

Una de les qualitats que té a favor aquest vidre és que és biodegradable i bioactiu. La degradació del G5 és per hidròlisi i de l'exterior cap a l'interior. Se separen els seus ions i, tant el Ca^{2+} com P^{3-} i Na^+ són assimilats pel cos, i és que ja en conté i per tant, no resulta ser tòxic. En quant al Ti^{4+} , encara no se sap exactament com es degrada ni en quina proporció seria massa tòxic.



Imatge 10. Cèl·lules adherides a un compost de PLA i G5 (són les que estan allargades)

2. Experimentació amb *scaffolds*

Partint de dues mostres de materials diferents (una amb PLA i una amb PLA i G5), tenim l'objectiu de comparar l'adhesió i proliferació de cèl·lules de càncer d'os en ells.

2.1. Primera part: construcció dels *scaffolds*

2.1.1. Introducció

L'enginyeria de teixits treballa utilitzant materials diversos i cèl·lules com a teràpia de regeneració de teixits malmesos. En els darrers anys, s'ha apostat per la utilització de materials biodegradables que el cos pot absorbir amb l'objectiu de poder realitzar una sola intervenció per part del metge, especialment en el camp de la regeneració de teixit ossi.

Es poden utilitzar dos tipus de materials per a la regeneració: naturals (com polisacàrids i proteïcs) i sintètics. Tot i això, els que més interès desperten a l'enginyeria de teixits són els sintètics, concretament, materials com el PLA (àcid polilàctic) i PGA (àcid poliglicòlic).

En la nostra pràctica utilitzarem el PLA, material usat en aplicacions maxil·lofacials i orals fonamentalment. Actualment, ja s'implanta en pacients gràcies a les magnífiques propietats que té, i és que al estar fet de cadenes d'àcid làctic, el propi cos pot metabolitzar-lo, per tant, és totalment biocompatible. A més, ofereix bones propietats mecàniques al nivell que s'utilitza i se'l pot tractar amb moltes tècniques diferents per adaptar-lo a la utilitat que se li vulgui donar amb la seva implantació.

Tot i que el PLA ofereix característiques molt bones, se pot afegir components que permeten que les cèl·lules proliferin més ràpid i s'adhereixen molt millor. Un bon exemple d'aquest material afegit és el vidre d'aparença lilosa G5 que, mòlt a partícules menors a 80µm i barrejades amb PLA al 70%, ofereix millors propietats mecàniques. Al ser hidròfil, aconsegueix una resposta cel·lular o adhesió més ràpida.

A l'hora de triar una tècnica, un dels factors més importants a tenir en compte és la mida del porus que volem aconseguir, la interconnectivitat d'aquests i la forma en la que necessitem l'implant (planxa, cub,...). En el nostre petit estudi utilitzarem una de les tècniques més senzilles i efectives, *Solvent*



Imatge 11. *Scaffolds* de PLA

casting and particulate leaching [explicada més endavant]. Aquesta tècnica permet que els porus estiguin interconnectats, controlar la mida d'aquests i també, la forma en la qual es presentarà l'implant. A més, resulta ser una tècnica molt econòmica pels pocs recursos utilitzats. El resultat, un *scaffold* per a la proliferació de les cèl·lules, es presentarà en forma de petits cilindres de 1cm d'alçada i 0,5cm de diàmetre en el nostre estudi.

2.1.2. Material

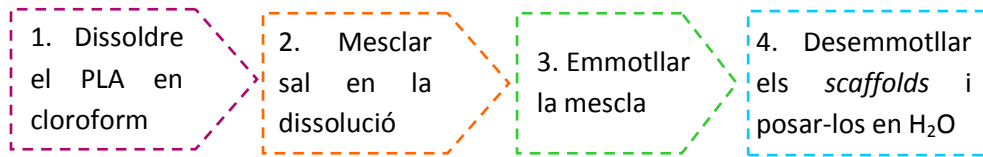
Per a construir els nostres petits *scaffolds* de PLA (95/5)⁶ utilitzarem una dissolució al 5% en pes/volum de PLA en cloroform. Després hi afegirem un 94% en massa de NaCl (sal comuna). Els valors que haurem d'agafar partint de 2g de PLA seràn 40ml de cloroform i 33,3 de sal.

Per a construir els *scaffolds* barrejats amb el vidre G5 utilitzarem els mateixos percentatges i valors i hi afegirem la mateixa massa de PLA (en el nostre cas 2g). El vidre ha hagut d'estar mòlt en grans menors de 40 µm.

A nivell instrumental necessitarem un morter, dos tamisos de 80 µm i 300 µm, motlles de formes cilíndriques amb les mides 1cm d'alçada x 0,5 cm de diàmetre, vareta per desemmotllar d'acer, campana de gasos, vas de precipitats i vareta de vidre. A més, caldrà una balança per tal de poder pesar tots els materials que necessitem.

⁶ 95/5: 95% de PLA cristal·lí (L) i 5% d'amorf (DL)

2.1.3. Mètodes utilitzats



El mètode utilitzat durant l'estudi, com ja s'ha esmentat anteriorment, va ser el *Solvent casting and particulate leaching*.

Aquesta tècnica consisteix en dissoldre un polímer, el PLA, en un solvent orgànic, cloroform. Després s'hi afegeixen partícules insolubles en el solvent orgànic que definiran la forma dels porus, la sal. Un cop s'obté la mescla homogènia dels tres components, s'emmotlla en la forma desitjada. Es



Imatge 12. Barreja de PLA, cloroform i sal en els motlles

deixa en una campana de gasos durant un mínim de 48h per tal de que el solvent orgànic s'evapori deixant el polímer amb les partícules en els motlles. Desemmotllem els *scaffolds* i els col·loquem en un vas de precipitats ple d'un solvent inorgànic, com l'aigua destil·lada, per tal de poder eliminar les partícules dissolent-les en aquest. Després de canviar l'aigua amb freqüència durant 24h (en intervals de 30min, 1h, 2h, 4h,...), els deixem assecar durant 24h en paper absorbent.

Amb aquesta tècnica aconseguirem una gran interconnectivitat si la mida dels porus no resulta ser uniforme. Tenint en compte que la mida ideal per a la proliferació de cèl·lules és entre 80 – 300 μm , moldrem sal i la farem passar per dos tamisos. El inferior deixarà passar partícules d'un màxim de 80 μm i el superior d'un mínim de 300 μm . D'aquesta manera, obtindrem sal amb mides diferents.

Per aquells *scaffolds* que continguin vidre G5 el procés seguirà els mateixos passos però afegint-hi la pols de vidre juntament amb la sal. Prèviament haurem mòlt el vidre a partícules més petites de 80 μm .

2.2. Segona part: inserció de cèl·lules per a la comparació de la bioconductivitat dels dos tipus de scaffolds

2.2.1. Introducció

Per poder comprovar si realment el vidre G5 barrejat amb PLA fa que les cèl·lules s'adaptin millor en el material i per tant, proliferin i s'adhereixin millor, realitzarem un cultiu de cèl·lules cancerígenes (*Osteosarcoma SAOS2*⁷).

Per a fer-ho, varem col·locar les cèl·lules directament en contacte amb el material després de diversos banys que el preparaven per aquestes.

2.2.2. Material

Els materials utilitzats per al cultiu de cèl·lules són: placa de 48 foradets, pipetes mil·limètriques, pipetes, pinces, provetes, plaques de cultiu de poliestirè, vas de precipitats (només per anar canviant la punta de la pipeta), criotubs, puntes de pipeta de plàstic, paper de plata.

Els reactius que creen el medi són: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco), sodium pyruvate 100mM (100X) (Gibco), antibiòtics (penicil·lina i estreptomina), sèrum fetal (proteïnes) i fungicida.

Els reactius utilitzats per desadherir les cèl·lules són: Tripsina-EDTA (*ethylene-dinitrilo tetraacetic acid*, Sigma) i PBS(solució salina).

Els reactius emprats per a la tinció de cèl·lules són: paraformaldehido, tinció *life and death* i PVS.

El reactiu usat per a l'esterilització de material i mostres de materials és etanol

⁷ Osteosarcoma SAOS2: línia de cèl·lules cancerígenes immortals i preosteoblàstiques

2.2.3. Preparació del material: esterilització i preparació

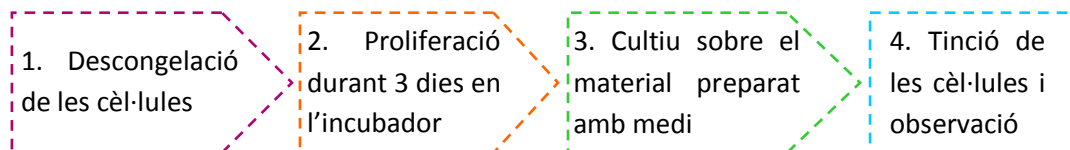
Abans de començar a treballar amb reactius tallarem els *scaffolds* en tres parts per tal de que sigui més ràpida l'esterilització i preparació de l'assaig. Només utilitzarem 3 discs de cada tipus (3 de PLA i 3 de PLA amb G5).

Sempre que es treballa amb cèl·lules s'ha d'esterilitzar tot allò que tindrà contacte amb elles, per això els *scaffolds* han de ser preparats. Es fa un bany amb etanol dues vegades per tal d'eliminar tota impuresa que pugui resultar tòxica a les cèl·lules.

Llavors, per facilitar l'adhesió de les cèl·lules als *scaffolds* se'ls deixa submergits en un bany en un pouet de la placa de cultiu ple de medi idoni durant 12-24h (a 27°C i 5% CO₂) per tal de que el material quedi impregnat de proteïnes.

Per tal de que sigui més higiènic es pot canviar de pouet el *scaffold* quan s'hagi acabat l'esterilització i es disposi a passar a la preparació.

2.2.4. Mètode utilitzat



2.2.4.1. Preparació de les cèl·lules per al cultiu

Abans de cultivar les cèl·lules en el material s'han de preparar, ja que les trobarem sempre congelades en nitrogen líquid i amb la seva activitat aturada amb DMSO.

El primer que haurem de fer és descongelar les cèl·lules posant-les en un bany d'aigua a 37°C. A més, haurem de posar una proveta de medi a la mateixa temperatura ja que, quan les cèl·lules estiguin a punt d'arribar als 37°C, haurem de canviar-les; les passarem del criotub on estaven a la proveta amb medi.

El DMSO és un component que resulta ser tòxic per a les cèl·lules, és per això que haurem d'anar canviant el medi abundantment per tal d'eliminar-lo durant les primeres 24h. Després ja podrem procedir a canviar-lo una vegada al dia durant tres dies. Passat aquest temps, les cèl·lules s'hauran reproduït suficient com per cultivar.

Per a desenganxar-les utilitzarem Tripsina que aplicarem directament a la placa de cultiu i que deixarem actuar durant 5 minuts sota condicions d'incubació (27°C i 5% CO₂). Aquest reactiu tallarà les proteïnes que feien que les cèl·lules estiguessin adherides. Passats aquests 5 minuts, afegirem a la placa una bona quantitat de medi. El medi conté un sèrum que aturarà l'acció de la Tripsina.

Amb tot aquest procés les cèl·lules quedaran flotant en el medi i la tripsina i, per tal d'eliminar la tripsina, posarem tot el contingut de la placa de cultiu en una proveta que centrifugarem. Quedarà un *pellet*⁸ enganxat al fons d'aquesta, per tant, no haurem de patir quan aboquem el líquid sobrant. Llavors afegirem medi i desenganxarem les cèl·lules del fons.

En la proveta tindrem milions de cèl·lules i per a cultivar una mostra tan petita de *scaffold* no caldran més de 3000. Per això les contarem amb un instrument anomenat Neubauer Improved⁹ al que li posarem 20µL de medi i cèl·lules. Nosaltres tindrem 4300000 cèl·lules.



Imatge 13. Cèl·lules en el *Neubauer Improved* [Annex nº 1]

⁸ *Pellet*: acumulació de matèria

⁹ *Neubauer Improved* (funcionament): ens trobarem un quadre amb quatre quadrats de 4x4 quadradets. Contarem en diagonal les cèl·lules dels quatre extrems i farem la mitjana. Llavors amb la fórmula $\left[\frac{\text{cèl·lules}}{\text{ml}}\right] = \text{mitjana de cèl·lules} * 10^4$ i multiplicant-ho per el volum (ml totals de medi i cèl·lules) sabrem la quantitat de cèl·lules que tenim.

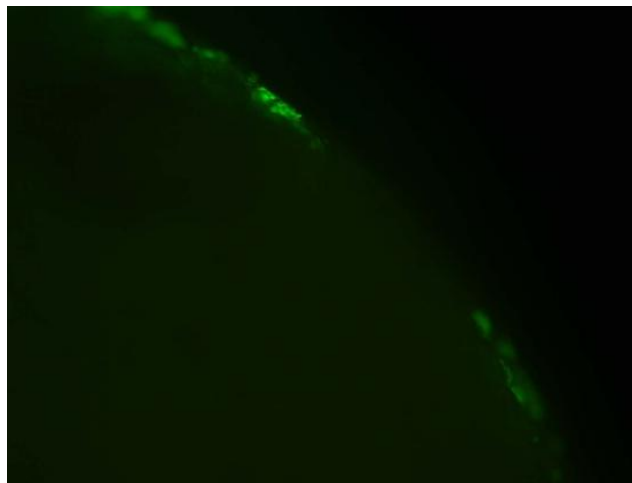
2.2.4.2. Cultiu de cèl·lules sobre el material

Calculant el volum que correspon 3000 cèl·lules (1,4 µl) cultivarem sobre el material que prèviament havíem preparat amb el medi. Cal dir que abans haurem retirat tot el medi dels *scaffolds* deixant-los només amb les proteïnes que tinguessin adherides. Primer posarem el volum calculat de 3000 cèl·lules i medi i després hi afegirem el màxim de medi que hi càpiga en el pouet. Deixarem que les cèl·lules s'adhereixin en l'incubador durant 24h.

2.2.4.3. Tinció de les cèl·lules per al microscopi de fluorescència

La preparació de les cèl·lules i per a la visualització en el microscopi de fluorescència no caldrà que tingui lloc en la càmera estèril.

El primer que haurem de fer és retirar el medi i eliminar les cèl·lules mortes. Per fer-ho realitzarem dues esbandides amb PVS, un buffer¹⁰ salí. Llavors hi afegirem paraformaldehido durant uns minuts. Aquest fixarà les cèl·lules, farà que no es moguin i es quedin quietes. Després d'això tornarem a fer una esbandida amb PVS per retirar el paraformaldehido. Hi posarem la tinció *life and death* que marcarà les cèl·lules de color verd (les vives) i tornarem a fer una esbandida per eliminar el tint. Com que aquesta tinció es fotosensible, taparem la placa de cultiu amb paper de plata.

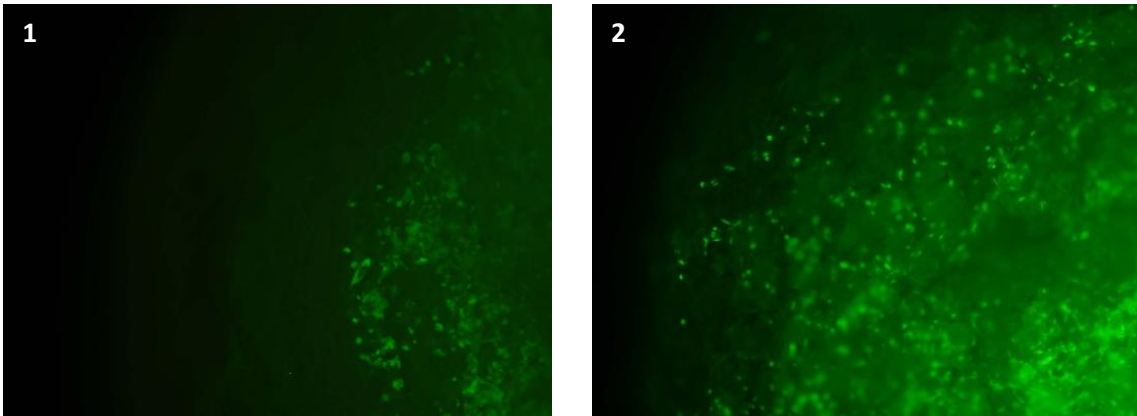


Imatge 14. Cèl·lules tenyides de verd (Visió microscòpica)

¹⁰ Buffer: paraula anglesa que significa dissolució amortidora. També se l'anomena dissolució tampó i està formada per un àcid dèbil i una de les seves sals, o per una base dèbil i una de les seves sals.

2.3. Resultats

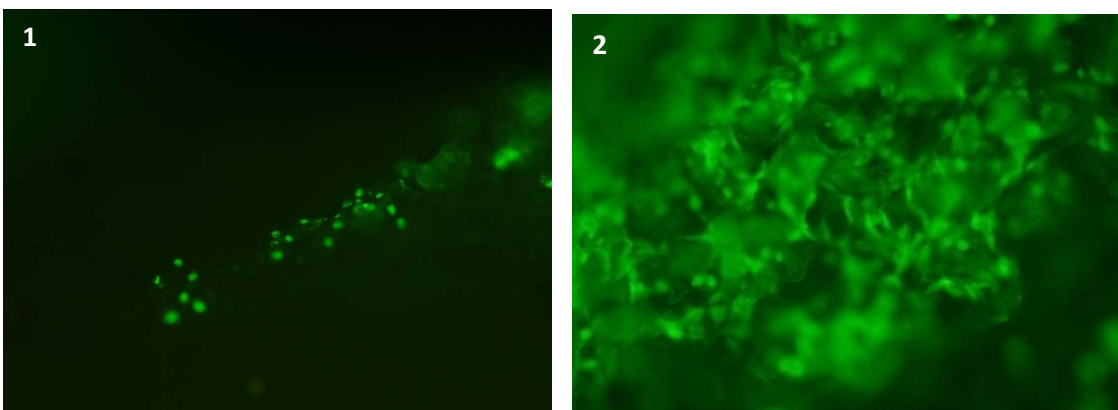
Només podem extreure resultats de la segona part i és que és l'única en la que posem a prova el material. Després de cultivar cèl·lules de *Osteosarcoma* SAOS2 en tres discs de PLA i tres de PLA i G5 hem arribat a la conclusió que, havent passat un dia en l'incubador, les cèl·lules s'han adherit i han colonitzat molt més en les mostres de PLA amb G5.



Imatge 15. Comparació de la colonització d'un disc de PLA (1) i un de PLA i vidre G5 (2) amb un cultiu cel·lular.

En quant a la colonització, en els discs de PLA, a la part que quedava per sota, no ha arribat cap cèl·lula però en els de PLA i G5 podem diferenciar-ne alguna.

D'altra banda, al parlar de l'adhesió de les cèl·lules, veiem clarament, en presència de G5 les cèl·lules s'allarguen per tal d'entrar en contacte amb el vidre, mentre que quan no troben aquests fragments, les cèl·lules es queden rodones.



Imatge 16. Comparació de l'adhesió d'un disc de PLA (1) i un amb PLA i vidre G5 (2) amb un cultiu cel·lular.

2.4. Conclusió

En relació a la utilització del mètode *Solvent casting and particulate leaching* en lloc d'un altre podem concloure que al usar materials barats es poden construir molts *scaffolds*. D'altra banda, hem de dir que no per ser un mètode senzill els resultats són pitjors; amb aquest podem aconseguir la porositat i l'interconnectivitat òptima.

Un altre aspecte a destacar és que, després d'observar l'adhesió de les cèl·lules en els dos materials construïts, hem pogut comprovar que quan hi ha factors per fer el *scaffold* bioactiu, en el nostre cas el vidre G5, les cèl·lules proliferen i s'adhereixen molt més que quan el material només compta amb la impregnació de medi (en totes dues mostres s'ha fet passar el disc per una fase bany en el medi).

El PLA és un material que a priori sembla tenir molts avantatges ja que les cèl·lules poden utilitzar-lo com a matriu provisional on reconstruir os i, un cop fet aquest procés, es metabolitzarà el material sense provocar cap infecció (entra al cicle de Krebs). Per el moment no se sap com es metabolitza el G5, i és per això que està en fase d'investigació i descoberta a l'IBEC.

3. El PLA fora dels laboratoris

Després de realitzar diverses entrevistes a tres metges i una investigadora podem explicar l'actual aplicació del material, avantatges i inconvenients del material a la pràctica, el seu futur, ...

3.1. La sortida dels laboratoris dels descobriments

Hi ha un llarg procés per a que un avenç fet en un laboratori passi a usar-se amb normalitat fora d'aquest.

En primer lloc, al descobrir un material (per centrar-nos en un cas, tot i que qualsevol fàrmac funciona així) s'han de realitzar assajos de caracterització *in vitro* per a poder estudiar les característiques del descobriment. Més tard, s'han de fer proves amb ratolins, conills i, quan es necessita una certa semblança amb el cos humà, porcs pel seu sistema immunitari, que resulta ser similar al nostre. Aquestes proves, que són *in vivo*, se solen fer fora dels laboratoris on s'investiga i es realitzen en altres que treballen com una empresa de testatge. Un cop fet això, l'investigador o el laboratori que ha descobert el material voldrà patentar el producte. Per tal que es pugui fer, s'ha de tenir en compte que no es pot haver publicat res abans. Aprovada la patent, s'ha d'anar a buscar capital, empreses que vulguin invertir en el nou producte per tal d'aconseguir que es pugui aplicar en persones. Si no s'aconsegueixen inversors el procés que ve a continuació resulta especialment difícil de portar a terme per l'alt cost que comporta. S'haurà de contractar un especialista, un agent de regulacions per a dispositius mèdics que s'ocupi de tramitar tots els papers i demostrar que allò que es vol comercialitzar compleix la ISO (institució internacional d'estandardització), normativa europea que contempla si el producte compta amb les característiques necessàries per ser usat en humans. Tindrà diverses fases: una de preclínica (s'experimentarà en animals grans) i una de clínica



International
Organization for
Standardization

Imatge 17. Logotip ISO (International Organization for Standardization)

(provar en voluntaris humans que poden treure beneficis del nou material). Un cop assolit tot el procés, el producte obtindrà el marcat CE que garantirà la seva qualitat.

3.2. Utilització de l'àcid polilàctic en la traumatologia actual

En la medicina actual, hi ha moltes zones en les que s'apliquen materials biodegradables sintètics com el PLA, la hidroxiapatita sintètica, gelatines, vitroceràmiques, PCL, ... Trobem que s'implanta en cirurgia maxil·lofacial, oral i ortopèdica en forma de claus, cargols i perns. Segons les entrevistes fetes, els llocs on s'implanta més el PLA per tal de formar nou os o unir el tendó amb l'os és en extremitats inferiors, és a dir, en el genoll (sota el lligament creuat) i en fractures de turmell. També s'està començant a utilitzar en cirurgia de columna vertebral. Per altra banda, s'utilitzen materials biodegradables (que tenen com a base el niló) per tal de tancar-los després d'una intervenció, per les sutures de nivell subcutani. Tot i això, encara s'utilitzen metalls ja que, quan es tracta de grans fractures en extremitats superiors i inferiors, el PLA i altres composts polimèrics no tenen suficient resistència.

3.3. Les mesures d'esterilització a l'hora d'implantar una pròtesi

Tot el material ve esterilitzat de fàbrica i empaquetat amb doble i triple seguretat segons la normativa del ministeri de sanitat. Quan aquest arriba al hospital el material i es passa a intervenir una persona se segueix un procés. Primer, el malalt porta roba no estèril en la zona bruta, que seria la habitació i els passadissos del hospital. Després, el pacient i els metges es canvia en una zona semibruta (entre el quiròfan i passadís. Finalment, passen a la zona de seguretat, que entendríem com el quiròfan. Ja dins d'aquest últim, es pinta la pell de la zona on s'ha d'intervenir amb iode (el màxim possible). Per últim, s'aïlla la regió a obrir mitjançant les talles, que són uns draps de color verd estèrils, i s'inicia la intervenció amb tot el material nou i estèril.

Cada vegada més, s'està introduint en els quiròfans el fluxe laminar, que són uns corrents d'aire creuat que deixen la pols al terra.

3.4. Avantatges i inconvenients del PLA

A priori sembla que el PLA no dona problemes ja que al degradar-se entra en el metabolisme de l'àcid làctic (cicle de Krebs en forma de Acetil CoA). Però, a la pràctica s'ha vist que no sempre és així: concretament un 20% dels casos d'implantació de PLA acaba tenint com a resultat una infecció. Això pot passar perquè no s'acaba de degradar bé el polímer o bé, perquè al ser un material molt porós, en el moment de ser col·locat en el cos, els bacteris poden amagar-se en algun racó. Tot i això, en els casos en els que va bé, alguns avantatge evidents que els materials de primera generació no ofereixen (metàl·lics) són l'estalvi d'una segona cirurgia per retirar el implant i la ràpida generació d'os, i és que quan trobem un clau, cargol o pern d'acer (per exemple), al retirar-lo, queda un forat que s'anirà omplint lentament.

3.5. El preu del PLA, un avantatge?

El fet de ser un material que s'està investigant actualment en molts laboratoris fa que resulti car, no tant pel cost del propi material, sinó per la investigació i les proves que comporta el fet de fer un avenç considerable. Malgrat això, el fet de on haver-se de retirar la pròtesi, fa que a la llarga resulti més barat. Cal dir que, segons l'experiència dels metges, en el sistema de salut públic s'utilitzen només quan és molt necessari .

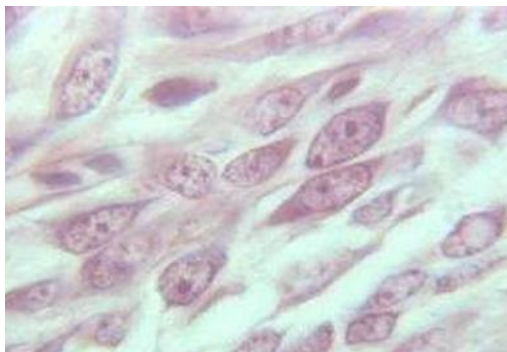
3.6. Nous camps d'investigació del polilàctic

En el camp de la regeneració de teixits hi ha moltíssim camps oberts. Per esmentar-ne alguns en què s'utilitza del polímer PLA, trobem que s'està intentant ampliar el camp on aplicar el polímer a pell, tendó, columna vertebral, ... També s'està investigant la seva utilització a partir de nanopartícules fetes d'aquest material que, en degradar-se, alliberen la substància que tenen la funció de transportar; i en el camp de la neurologia, s'estudia per aplicar-lo en neurones per tal de unir-les i, fins i tot, intentar regenerar teixit cerebral.

D'altra banda, en la regeneració de teixits a partir de materials de la primera generació, els no bioactius ni reabsorbibles, trobem que s'estan començant a fer implants de tàntal. Aquest resulta resistir molt bé la corrosió, ser molt dur i tenir un punt de fusió molt alt. Per aquestes característiques, s'han elaborat implants en els que es crea una certa porositat (tipus el que es fa en el PLA) i, d'aquesta manera, les cèl·lules poden interactuar amb el material i utilitzar-lo com a matriu.

3.7. Visions de futur dels transplants

La medicina de regeneració de teixits avança de manera frenètica però segons sembla, després de veure les diferents respostes dels professionals entrevistats, hi ha moltes direccions que comparteixen un sol punt, l'osteoinductivitat. Al llarg d'aquest treball s'ha realitzat l'experimentació d'un polímer que per si sol no atrau a les cèl·lules, per tant no és osteoconductor, però que, al combinar-lo amb un vidre que tenia presència de Ca^+ , les cèl·lules hi acudien. Probablement, en un futur immediat trobarem implants que induiran a la formació de nou teixit ossi natural però, atrevint-nos a especular una mica, el gran "boom" en la investigació de teràpies de regeneració de qualsevol teixit a partir de cèl·lules mare pot, algun dia, focalitzar-se en la regeneració òssia. De fet, alguns laboratoris ja ho estan fent en disc vertebral i cartílag articular però, segons les investigacions, no es pot afirmar que els resultats siguin homogenis, especialment on s'estan invertint més esforços, en la regeneració de cap de fèmur, lloc de difícil regeneració òssia.



Imatge 18. Cèl·lules osteoprogenitores

4. Conclusions

Després de molts mesos de treball, podem afirmar amb completa seguretat que la utilització de materials biodegradables ha estat un gran avenç en el camp de la traumatologia, ja que evita una segona intervenció al evitar el rebuig per part del pacient, teòricament. Seguint aquesta línia, també cal destacar que la teoria no es compleix en tots els casos i és que, a vegades, hi ha persones que acaben tenint grans inflamacions en la pròtesi perquè no es degraden correctament i s'acumula l'àcid làctic. També pot venir donat per l'adhesió d'algun microorganisme en el moment de la intervenció.

Tot i que a priori pot semblar que els materials biodegradables podrien funcionar de manera autònoma, eliminant aquells materials que no són bioactius ni bioabsorbibles, a la pràctica, de moment, no pot ser així. Tenint en compte que aquests composts generalment tenen propietats mecàniques baixes, és difícil trobar una reparació òssia formada únicament per aquests. Se sol combinar amb plaques metàl·liques que els sostinguin.

Contràriament, partint de la base que un dels materials biodegradables més usats en aplicacions traumatològiques és el PLA i, després de l'experiència al IBEC, on vaig entrar en contacte amb el vidre G5 (compost que afavoreix la proliferació i adhesió de cèl·lules) i el PLA, podem afirmar que per tal que el *scaffold* sigui bioactiu (camp que desperta molt interès de cara al futur) ha de comptar amb factors com el G5. Seguint aquesta línia, es pot deduir de forma lògica que la recuperació del pacient seria molt més ràpida amb factors que ajudin a la bioactivitat ja que, al proliferar més ràpid, les cèl·lules començarien a degradar la matriu artificial per crear la natural.

A partir de les diferents entrevistes també he pogut respondre preguntes i, en la meua opinió, la que té més importància per aquest treball és el futur de la traumatologia en general. El projecte desenvolupat aquests mesos, en un primer moment, semblava un solució molt futurista, però veient que ja s'està utilitzant de manera força habitual en consultes, passa a ser un concepte molt actual. En suma, el futur d'aquesta branca de la medicina i en general, de totes, queda enfocada més cap a la generació d'òrgans i teixits *in vitro* i a través de les famoses cèl·lules mare. L'explicació d'això és que, si les

Conclusions

cèl·lules són del propi pacient, la probabilitat de rebuig del implant queda reduïda a un nombre molt petit.

Després de realitzar la petita estada al laboratori on he vist com es treballa professionalment en aquestes grans organitzacions, també puc concloure algunes coses. El cost que la investigació té és altíssim ja que la tecnologia que s'utilitza sovint és molt recent. A més, com que es requereix molta precisió, el material que s'usa moltes vegades només té un sol ús. Tot i això, crec que tothom hauria de considerar que la inversió que es faci en la investigació tindrà beneficis segurs ja sigui per part de tot aquells que se'n pugui beneficiar (en el cas del PLA amb la combinació del G5, les persones que han patit un càncer d'os, per exemple) com per les empreses que les comercialitzin.

En síntesi, la regeneració òssia és un camp en el qual encara queda moltíssima feina per fer per tal de millorar les pròtesis i, així, evitar les infeccions. D'altra banda, això només podrà produir-se si hi ha constants injeccions de diners en els laboratoris que, al cap i a la fi són els que fan que, especialment en el camp de la medicina, la població tingui una qualitat i esperança de vida més alta.

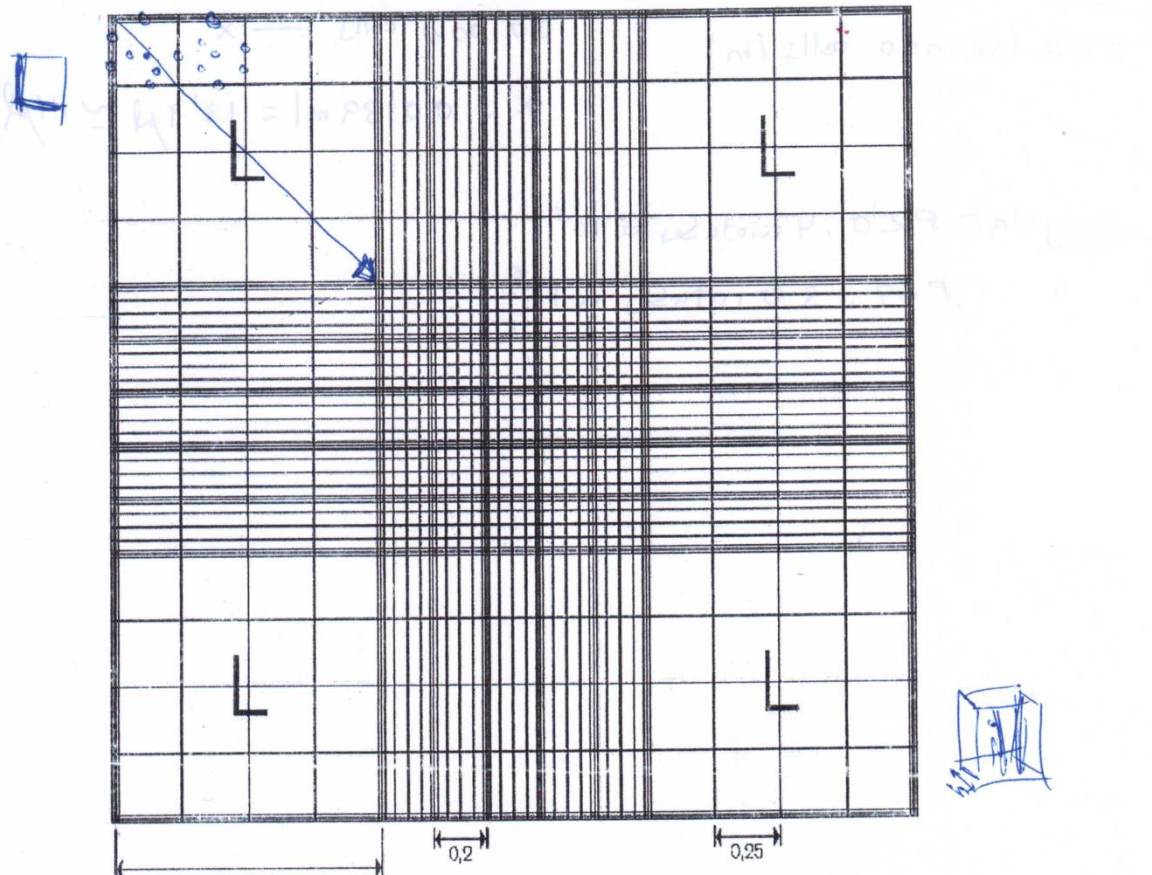
5. Bibliografia

- Catalina Estrada, Ana Cristina Paz Luis Ernesto López. Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 5 p. 93-100. Junio 2006 – Maig i Juny de 2013
- Charles-Harris, M., Koch, M., Navarro, M., Lacroix, D., Engel, E. & Planell, J. (2008). A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19, 1503-1513. – Primera quinzena de Juliol de 2013
- Gustavo A. Abraham y Teresita R. Cuadrado. Métodos de Caracterización de Biomateriales. Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA) (UNMdPCONICET), J. B. Justo 4302, B7608FDQ Mar del Plata, Argentina. – Maig i Juny de 2013
- María Vallet Rregí. Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos. Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. – Maig i Juny de 2013
- Melba Navarro. Tesis doctoral (Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea). Abril 2005. – Juliol i Setembre de 2013
- Navarro, M. & Planell, J. A. (2011). Scaffolds for Bone Regeneration. European Musculoskeletal Reviews, 6(4), 1-5. – Primera quinzena de Juliol de 2013
- Serra, T., Planell, J. A. & Navarro, M. (2013). High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. Acta Biomaterialia, 9, 5521-5530. – Primera quinzena de Juliol de 2013
- Vila, O. F., Bagó, J. R., Navarro, M., Alieva, M., Aguilar, E., Engel, E., Planell, J. A., Rubio, N. & Blanco, J. (2012). Calcium phosphate glass improves angiogenesis capacity of poly(lactic acid) scaffolds and stimulates differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells to the endothelial lineage. J Biomed Mater Res A, epub ahead of print. – Setembre i Octubre de 2013

Bibliografia

- <http://blogs.iec.cat/scq/wp-content/uploads/sites/23/2012/06/TREC.pdf> – Maig de 2013
- <http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/co28959.html> – Maig de 2013
- <http://mural.uv.es/monavi/disco/segundo/histologia/Tema15.pdf> – Juny de 2013
- <http://reumatologiaclinica.org/es/mecanismos-interaccion-osteoblasto-osteoclasto/articulo/90027100/> – Maig de 2013
- <http://tejidoconectivo.galeon.com/productos1027186.html> – Maig de 2013
- http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros_biodegradables.htm – Setembre de 2013
- <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso08-09/pla/Pag%20web/metodo%20ROP.html> – Novembre de 2013
- http://www.encolombia.com/medicina/revistas-medicas/avances-med/vol-129/medicina1299_fracturas10 – Maig de 2013
- <http://www.grupo9.blogspot.com.es/2009/09/osteoblastos-y-osteoclastos.html> – Juny de 2013
- http://www.masalto.com/template_buscador.phtml?consecutivo=2277 – Desembre de 2013
- <http://www.slideshare.net/alycyalopez/mineralizacin-de-huesos-y-dientes> – Novembre de 2013
- <http://www.slideshare.net/tonigordillo/classificaci-ossos> – Novembre de 2013

Annex 1: Neubauer Improved (imatge gràfica i càlcul de la quantitat de cèl·lules cultivades realitzat al IBEC)



$$\begin{aligned}
 & 49 \times 4 = 196 \\
 & 56 \times 4 = 224 \\
 & 64 \times 4 = 256 \\
 & 46 \times 4 = 184 \\
 & \bar{x} = \frac{860}{4} = 215
 \end{aligned}$$

P20

$$C(\text{cells/ml}) = \bar{x} \times 10^4 = 2.150.000 \text{ cells/ml}$$

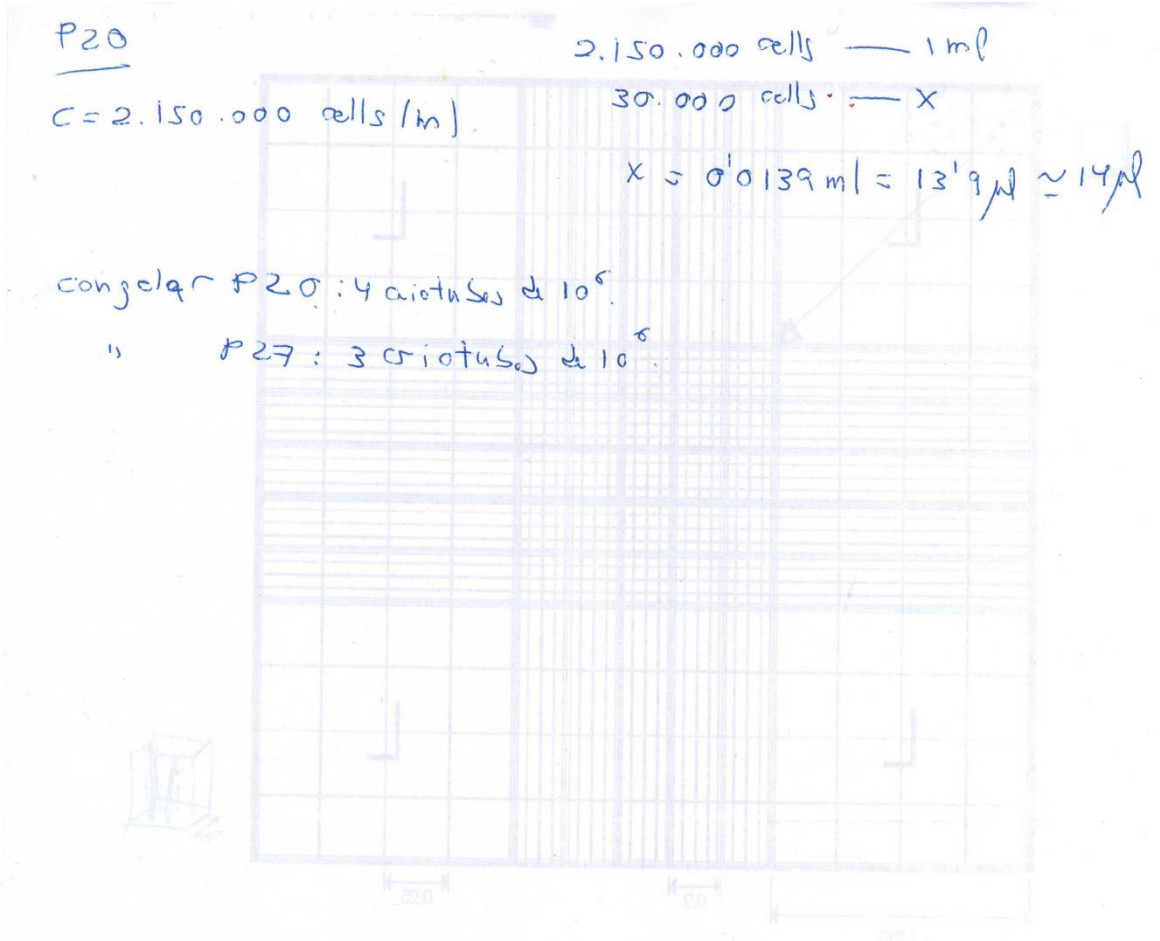
$$V_T = 2 \text{ ml} \quad n\text{-total} = 4.300.000 \text{ cells}$$

$$\begin{aligned}
 & 47 \times 4 = 188 \\
 & 38 \times 4 = 152 \\
 & 37 \times 4 = 148 \\
 & 41 \times 4 = 164 \\
 & \bar{x} = \frac{652}{4} = 163
 \end{aligned}$$

P27

$$C(\text{cells/ml}) = 163 \times 10^4 = 1.630.000 \text{ cells/ml}$$

$$V_T = 2 \text{ ml} \quad n\text{-total} = 3.260.000 \text{ cells}$$



Handwritten calculations and notes:

$0'01 \times X = \dots$

$N_{total} = \dots$

$3'55 = P \times P_2$

$2'25 = P \times P_2$

$4'21 = P \times P_2$

$2'15 = \dots$

$3'81 = P \times P_2$

$3'21 = P \times P_2$

$3'41 = P \times P_2$

$P \times P = 1'21$

$3'25 = X$

Additional scribbles and calculations are visible throughout the bottom section of the page.

Annex 2: Entrevistes

1. Melba Navarro (Llicenciada en Enginyeria Química especialitzada en enginyeria de biomaterials)

Melba Navarro és una investigadora *Senior* de nacionalitat veneçolana especialitzada en l'enginyeria de biomaterials que està treballant a l'IBEC. Va fer la seva tesis doctoral amb la universitat Politècnica de Barcelona sobre el PLA i els vidres que podrien ajudar a la proliferació de cèl·lules en el material i, a més, ha publicat diversos articles relacionats amb el mateix camp.



Imatge 19. Investigadora Melba Navarro i jo.

Ella ha estat la guia de la part pràctica d'aquest treball de recerca.

Pregunta: Els biomaterials estan avançant de manera frenètica en el camp de l'enginyeria de biomaterials. Quins creus que són els avantatges que ens ofereixen respecte als materials (com les plaques metàl·liques) utilitzats fins fa poc?

Melba Navarro: Les plaques metàl·liques també són considerades biomaterials, però són materials de la primera generació: materials no-degradables i inerts. Avui en dia estem en la tercera generació de biomaterials: materials biodegradables i bioactius, és a dir, que activen activitats cel·lulars específiques a nivell molecular.

Les plaques metàl·liques seguiran utilitzant-se millorant-li en disseny, etc però al mateix temps, sorgiran nous biomaterials, sobretot per la part de la regeneració de teixits més que en la de fixació (com les plaques i claus metàl·lics).

P: Tenen algun inconvenient?

M: Els nous materials estan en ple desenvolupament. L'inconvenient que podrien tenir és que siguin citotòxics o que els productes de la degradació no siguin expulsats i/o tolerats pel cos, que la velocitat de degradació sigui molt ràpida o molt lenta, que no

estimuli l'activitat cel·lular esperada, ... Cal dir que s'està treballant en això per tal de millorar totes aquestes possibles propietats adverses (respecte el resultat esperat).

P: En quins casos es decideix utilitzar un biomaterial en comptes de composts metàl·lics o ceràmiques?

M: Algunes ceràmiques i materials són també biomaterials, no només ho són els polímers. Si l'aplicació no requereix suportar altes carregues mecàniques, llavors el polímer pot ser usat. Els metalls seran utilitzats sempre i quan es necessiti restablir la funció de l'os on se suporten altes carregues.

Els andamis polimèrics s'apliquen quan es busca regenerar teixit i que després el material de suport desaparegui.

P: En aquest treball ens hem centrat en el PLA (polímer biodegradable derivat de l'àcid làctic) i amb una combinació de PLA i G5. Creus que és el millor biomaterial que tenim actualment? Perquè?

M: No, no considero que sigui el millor material que tenim actualment, encara que tot depèn de l'aplicació final. El PLA és un dels pocs polímers biodegradables acceptat per la FDA (Food and Drug Administration) de US i per això està en el mercat.

Ceràmiques com la hidroxiapatita, fosfat tricàlcic-beta, alúmina, ... s'uneixen a la formació d'os. L'alúmina s'utilitza en l'acetàbul de les pròtesis de maluc i, la hidroxiapatita i el fosfat tricàlcic-beta, en grànuls o ciments que emplen petites cavitats òssies.

P: Creus que en un futur es podrien arribar a utilitzar només biomaterials per a regenerar teixits?

M: Si, la idea és crear biomaterials capaços de instruir a les cèl·lules i teixits danyats a la regeneració.

P: En quant temps creus que podríem trobar metges que implantessin de manera corrent biomaterials?

M: Ja existeixen alguns biomaterials en el mercat i hi ha centres on ja s'implanten.

P: El cost que haurien d'afrontar els pacients que necessitessin una placa, clau, ... d'algun biomaterial (polímer o scaffold polimèric) seria major o menor al que actualment té?

M: No crec que sigui superior al que avui en dia ja es cobra, de fet, al usar dispositius biodegradables, moltes vegades es pot estalviar en la segona cirurgia, que seria la d'eliminar la placa metàl·lica o canviar-la, perquè es degrada.

P: Quin procés s'ha de seguir per tal de que un material surti del laboratori i s'utilitzi en hospitals?

M: Ha de complir una sèrie de regulacions i passar per assajos preclínic i clínic que garanteixin la seva eficàcia i, sobretot, la seguretat del pacient.

P: Amb quines dificultats us trobeu per arribar a l'aplicació dels biomaterials en pacients?

M: La major complicació és l'alt cost dels estudis preclínic i clínic

P: S'han fet assajos en humans amb PLA o altres biomaterials? Si la resposta és que sí, a quins resultats s'ha arribat?

M: Sí, el PLA ja està en el mercat en forma de sutures, petits claus i cargols per petites fractures d'os. Fins i tot, hi ha dispositius per a problemes de columna vertebral.

2. Doctora Montserrat Mitjans

La Dra. Mitjans ha treballat en la unitat de reconstrucció de la Vall d'Hebrón, en l'hospital clínic de Barcelona i, actualment, està al servei de cirurgia ortopèdica i traumatologia de l'hospital de Granollers. Està especialitzada en temes d'artrosi que poden afectar a articulacions grans com són el maluc i el genoll. Ella fa el procés de substitució en processos de degeneració avançada (substitució de l'articulació per un implant artificial metàl·lic) i també en la intervenció en infeccions d'implants.

Pregunta: A què et dediques?

Dra. Mitjans: A la traumatologia, concretament al tema de protètic. Utilitzo implants de metalls com el tità i també amb composts com poliuretans, polietilens i polimetacrilat.

P: En quina part òssia estàs especialitzada?

Dra.: Faig articulacions, bàsicament de les extremitats inferiors com pròtesis de maluc i de genoll tot i que també faig cirurgia estètica òssia

P: Treballes o has treballat amb PLA o materials biodegradables i biocompatibles com els que actualment s'estan estudiant?

Dra.: Jo directament no però altres companys del servei en el que treballo sí, concretament, amb cargols que són biodegradables, especialment en les aplàsies de creuats els genolls. Jo aquesta línia no la faig dins del servei de traumatologia directament. Tot i que, pensant-ho bé, les sutures també es poden considerar reabsorbibles i jo en faig sempre que obrim un pacient. Al tancar-lo, utilitzem sutures que a la llarga s'absorbeixen però no les apliquen en pell, sinó a nivell subcutani, d'afàsies o de tendons.

P: De quin material són?

Dra.: No ho se exactament però crec que són de niló combinat amb alguna cosa.

P: Creus que és més útil que siguin així, és a dir, que al llarg del temps es vagin reabsorbint o no, que, com la placa de titani, no sigui bioabsorbible?

Dra.: Són interessants aquests materials biocompatibles i és que, per exemple, moltes vegades, en fractures, s'implanten cargolets que actualment no són reabsorbibles i poden molestar. Llavors s'ha de fer una segona cirurgia per retirar-los i amb aquests biomaterials, es podria evitar, amb una sola cirurgia n'hi hauria prou.

P: Veus algun inconvenient als bioabsorbibles?

Dra.: Moltes vegades són radiotransparents i llavors és difícil de veure la seva col·locació quan es vol comprovar si interfereix en algun lloc. Després, un altre problema seria problema és que si el implant s'infecta durant el procés, és més difícil de retirar perquè pot ser que ja estigui en procés de reabsorció. Tot i això, és un inconvenient sempre salvable, és a dir, no molt rellevant o greu.

P: Creus que els biomaterials que es degraden són el futur de la traumatologia o sempre quedaran altres materials no absorbibles?

Dra.: No, jo crec més amb els materials osteoconductors o osteoinductors per la capacitat de regenerar, no de reabsorbir. El futur el veig més en aquest sentit, de recrear teixit ossi en comptes de disposar de *stock* per implantar-lo, és a dir, en materials que pugin induir o encaminar a la formació d'aquests. Crec que aquest és un bon camp en el que seria interessant investigar.

3. Doctor Lluís Ximeno

El Dr. Ximeno, llicenciat per la UAB, treballa com a cap de traumatologia a l'hospital de Sant Jordi, a l'hospital de Sant Celoni com a cap d'unitat de cirurgia de peu i turmell i fa classes a Sant Pau (UAB) de tècnica ortopèdica. Amb l'equip de Sant Celoni han guanyat el premi "Mejores ideas" atorgat per Diario Medico per la seva aportació a la medicina al crear la tècnica MAASH (mètode nou per la implantació de la pròtesis de maluc). També ha estat metge de guerra al Txat i ha continuat formant-se a Oxford i USA.

Pregunta: Al laboratori on jo he estat, tenen oberta una línia d'investigació d'un vidre nou que atrau les cèl·lules i fa que el compost sigui bioactiu combinat amb el PLA. Què utilitzes tu actualment?

Dr. Ximeno: Jo el que faig servir són hidroxiapetitas perquè donava problemes. Per exemple, a una senyora l'he hagut d'operar tres vegades per treure-li restes perquè no es degradava del tot. Pot ser que sigui perquè nosaltres el fem servir "tacos" a l'hora

d'enganxar tendons amb un os (el del aquil·les amb el calcani) a partir de fer passar el fil per aquest taco que va clavat dins de l'os.

P: Llavors, per a què utilitzes l'àcid polilàctic?

Dr.: Per aguantar tendons contra l'os (per fer pressió). Abans el que es feia era fer un forat a l'os, posar el tendó a dins i, en aquest foradet, a partir d'un tros d'os que trèiem d'una altre part (com la cresta o la tibia) fèiem com un taco de paret per aguantar el tendó dins del forat. Com que el nostre os de seguida es desfà, el polilàctic en teoria va millor perquè triga un temps en fer-ho.

P: Seguint el teu argument, per tu té més inconvenients el polilàctic que, per exemple, una placa de titani?

Dr.: Bé, són diferents. Normalment quan treballes amb polilàctic ho fas per aplicacions dins del os. Tot i això, el que a vegades fem és posar tendó-os-polilàctic-placa per aguantar el polilàctic dins amb el tendó i/o per protegir el tendó del metall

Tot i això, en realitat, els compostos sintètics no sempre van bé del tot. En un 80% dels casos va bé però hi ha un 20% que no. El que dona menys complicacions és l'os de la pròpia persona. Malgrat això, no vol dir que no sigui efectiu. Per fer unions d'os amb os jo havia utilitzat aquests taquets de polilàctic o de hidroxiapatita i llavors l'os es fica per entremig i quan es desfà queda os.

P: Tu creus que els compostos polimèrics, en un futur, podran ser els únics que s'utilitzin o sempre hi haurà el recurs d'utilitzar plaques metàl·liques?

Dr.: Són útils tots dos. Si que hi han cargols de polilàctic que van bé perquè desapareguin però a vegades necessitem un cargol que es quedi allà. Encara que tots dos són útils, crec que tot això es deixarà de fer servir. Les cèl·lules mare són el futur de les teràpies òssies. Si ara ja estan copiant cors, en deu anys es copiaran genolls.

P: El cost dels composts polimèrics per la persona que se li implanta és més alt o més baix que el de una placa metàl·lica?

Dr.: La veritat és que no ho se. Nosaltres ens preocupem bastant poc dels costos tot i que sé que ens n'hauríem de preocupar més. Per altre banda, jo crec que el cost és per l'estil perquè, de fet, tot això és negoci.

P: Per aquest motiu, utilitzes més materials metàl·lics que polilàctics?

Dr.: No, per qüestió de preu jo no uso un més que l'altre. El preu a l'hora d'implantar és indiferent.

P: I sense tenir en compte el preu?

Dr.: Més metall, perquè el ferro aguanta més. Nosaltres posem els cargols perquè aguantin mentre l'os es cura. El que pretenem és que, després, aquests ferros es puguin treure i per a que quedi l'os bo. L'objectiu és que si un os triga entre 6 i 9 setmanes en soldar el cargol ha de fer la feina del os durant aquestes setmanes. Amb un polilàctic tens les teves dubtes a l'hora de col·locar-lo perquè pot començar a degradar-se o trencar-se.

P: En els metàl·lics també es comença a crear os?

No, els treus i queda un forat que després tapes. Ara s'estan fent uns materials que són mig buits per dintre perquè tenen com uns porus.

P: I en aquests ja es crea os?

Dr.: Si, de fet no es poden treure. Hi ha un metall que és el tàntal que és molt porós i l'os entra per dins. Una de las pròtesis que porta el rei és de tàntal però no és necessari per una pròtesi, és una "pijada". Per una pròtesi no fa falta el tàntal però pel fèmur, per exemple, si vols regenerar el seu cap, es fa un forat amb una broca i un trepant i, llavors, per tal de no debilitar-lo li poses una barreta de tàntal .

P: Per acabar, hi ha més infeccions o possibilitats d'infecció amb un compost polimèric que amb un metall?

Dr.: Igual però tot depèn de la porositat. Quan ho és més, la probabilitat de que un microorganisme s'hi quedi en el moment de passar-lo de la taula estèril al organisme humà creix perquè pot tocar pell o l'embolcall que el protegeix. També pot ser que, a les pinces en iode, s'hi quedi algun microbi i prengui contacte amb el implant. Si no és porós, com el nostre organisme té sistemes de defensa, el matarà. Però, si és porós, s'amagarà en els porus. Avui per avui, jo no tinc coneixement de cap estudi que digui si metall o si polilàctic és més fàcil d'infectar.

P: Pots explicar-me el procés esterilització que vosaltres feu?

Dr.: Tot ja ve esterilitzat de fàbrica i empaquetat en doble i triple seguretat, tot segons la normativa del ministeri de sanitat. El que si fem és el protocol habitual en les intervencions que és el següent: primer el malalt quan entra a quiròfan i tota la roba que porta és estèril (hi ha una zona bruta, que seria l'habitació i els passadissos del hospital, una zona semibruta, que seria on es canvien els pacients i els metges amb una roba que no s'ha utilitzat mai pel carrer, una altra zona semibruta, que seria entre el quiròfan i la zona on ens canviem i, finalment, la zona de seguretat, que entendríem com a quiròfan); després, dins del quiròfan, es pinta la pell de la zona on hem d'intervenir amb iode el màxim possible (una extremitat sencera si cal); llavors s'aïlla mitjançant les talles, que són aquests draps de color verd estèrils. Avui en dia s'està introduint dins dels quiròfans el flux laminar, que són corrents d'aire creuades que diuen que en teoria fan quedar la pols al terra.

4. Doctor Albert Pérez

El Dr. Pérez, llicenciat per la UB al campus de Bellvitge on es va especialitzar en traumatologia, treballa en el sistema públic, al mateix hospital de Bellvitge, i també a l'Hospital Mútua de Terrassa. Ha fet estades dins del país en diversos hospitals tractant especialment les extremitats inferiors.

P: Quins biomaterials coneixes o has utilitzat?

Dr. Pérez: El que fem servir més és l'àcid polilàctic, que és un material que es fa servir molt en cargols, agulles i algun altre objecte instrumental per fer osteosíntesi tant per os amb os com per os amb tendó o músculs.

P: En quines parts del cos implanteu més sovint l'àcid polilàctic?

Dr.: Jo treballo molt en genoll i peu, el que serien les extremitats inferiors. Allà s'utilitza bastant en genoll i també a la part anterior del peu.

P: Us dona algun problema de infecció l'àcid polilàctic?

Dr.: Aquest és un tema bastant discutit i és que, tot i que té una gran avantatge, la reabsorció relativament ràpida (encara que a vegades triga bastant), i això t'evita treure'l després, a vegades costa de reabsorbir-se i alguns materials, tot i que no tenen la tendència a fer reaccions en el cos, per això són biocompatibles, poden donar algun problema de inflamació. També cal dir que no és l'habitual

P: Fas servir plaques de acer o de metalls?

Dr.: Si, aquests molt més, i és que són molt més econòmics que els materials biodegradables perquè, aquests, comporten un estudi biomecànic molt precís i, per tant, se'ls ha d'invertir molt. Per aquet motiu, utilitzem ferros, acer inoxidable, titani o altres aliatges.

P: Quin creus que serà els futur de la traumatologia, cap als biodegradables, cap als metàl·lics o cap un altre cosa?

Dr.: El futur no serà cap dels actuals perquè crec es crearà alguna cosa que el mateix organisme podrà sintetitzar, però clar, això és molt futurista. Mentrestant, com a mínim durant unes dècades més, encara funcionarem amb un o altre. Cal destacar que hi ha hagut un "boom" durant uns anys dels biodegradables però continuem fent servir molt materials de tipus metàl·lic.

P: Fas servir algun altre material que no sigui el polilàctic?

Dr.: Jo en concret no però sé que hi han altres substàncies que són biodegradables en l'organisme.

P: En quines aplicacions saps que es puguin fer servir biodegradables dintre de la medicina?

Dr.: Bé, el que es fa servir més és en el genoll, en les aplàsies de lligament (sota el lligament creuat) perquè s'han de fer uns túnels dintre del os i l'avantatge que ofereixen és que ja quedaren enclastat amb el PLA. Si s'utilitzessin materials metàl·lics i s'haguessin de treure seria un problema molt gran, per tant, amb els polimèrics t'ho estalvies. Cada vegada s'utilitza més, sobretot en fractures de turmell en les que es necessita una certa elasticitat i, els acers i titanis, són molt rígids i no et permet moure un turmell. Per tant, per aconseguir una estabilitat intermèdia es combinen polilàctics amb altres sistemes, com per exemple tensors i fils que permeten, dins de l'estabilitat, mobilitat que els metàl·lics no et permeten.

P: Si haguessis d'escollir a l'hora de reparar un os, utilitzaries el polilàctic?

Dr.: En les fractures, avui en dia, el sistema que més es fa servir és la utilització de metàl·lics (claus i plaques principalment). I és que, en fractures grans d'extremitats superiors i inferiors, no es fan servir polilàctics. El polilàctic es fa servir molt en la part del traumatòleg que no es la trauma de fractures sinó, en l'ortopèdia, és a dir, reconstrucció de lligaments, tendons,... Jo crec que, ara per ara, encara falta molt perquè es pugui substituir per reabsorbibles en grans fractures.

P: Apostes per les cèl·lules mare en el camp de la traumatologia?

Dr.: El futur és aquest. Les cèl·lules mare i tot aquest tema de biotecnologia crec que és el que s'utilitzarà en cicatrització de teixits. El que no tinc tant clar és si això contribuirà a que es pugin trobar sistemes únicament d'utilització de cèl·lules mare per la síntesis i subjecció del os i tendó. Em sembla que durant molt de temps continuarem fent servir metall i materials reabsorbibles.

P: Resulta més econòmic o més car la utilització de bioabsorbibles?

Dr.: Els reabsorbibles són més difícils d'utilitzar en el sistema públic de salut però si en el moment trobem necessària la seva utilització perquè el cost-benefici és important els apliquem.