

Biomaterials. Regeneració òssia

1. Introducció

Ja des de l'ESO pensava com seria el meu treball de recerca, però era massa aviat per prendre decisions. Així que vaig esperar fins a primer de Batxillerat per fer-me a la idea que havia de ser un treball enfocat al meu futur i, sobretot, que m'apassionés. En un primer cop, el meu objectiu era fer-ne un guiat per alguna Universitat o institució que pogués ensenyar-me la ciència del dia a dia. La meva tutora de llavors ens va mostrar una àmplia oferta de temes dirigits per la UPC. Pocs m'atreien, només un sobre genètica perquè és l'àmbit de la biologia que més m'agrada. Però aquest, ja l'havien fet al meu institut. Més tard, va sorgir la possibilitat de fer-lo al Parc Científic de Barcelona (PCB) i em vaig inscriure.

Quan la meva tutora del treball de l'INS Marina i jo vam anar a la reunió de presentació al Parc Científic, ens vam trobar que m'havien assignat un treball sobre regeneració òssia i biomaterials. La primera impressió que em va fer no va ser molt positiva, però a mesura que escoltava l'explicació del meu tutor, em va semblar interessantíssim.

Constava de dues parts: una teòrica, que l'havia de fer jo, i una experimental, que la podia realitzar al Parc Científic. El meu tutor va dir que era un tema tan actual, que ell i els investigadors del seu grup estaven treballant amb això al laboratori.

A causa de les múltiples malalties que afecten el teixit ossi i l'escassetat de donants, la transmissió d'infeccions o els resultats insuficients dels sistemes emprats fins ara ha fet que els científics hagin iniciat la recerca d'una nova tècnica amb biomaterials (enginyeria de teixits) per regenerar ossos.

Al mes de Juliol vaig començar a fer les pràctiques al PCB durant una setmana de 9 a 14h. El primer dia que vaig entrar al laboratori no parava de pensar que, en un futur, podria ser jo la que treballés allà (m'encantaria!). A part del treball de recerca, el que més volia era veure com treballen els científics, els instruments que empren, què fan...; ho volia saber tot sobre els investigadors, ja que és al que em vull dedicar. Un cop vaig haver acabat les pràctiques experimentals em vaig centrar a redactar el treball durant les vacances d'estiu.

2. L'os

L'os és un teixit viu format per substàncies orgàniques com ara proteïnes i per substàncies inorgàniques que representen la major part del pes del teixit ossi, entre un 60 i 70%, compost per minerals i aigua.

La fase orgànica està constituïda bàsicament per un component flexible, fibrós i tenaç, el col·lagen de tipus 1. I la fase inorgànica per un fosfat de calci conegut com hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, formada per làmines cristal·lines entre 2 i 5 mm d'espessor. Per tant, l'os és un material compost natural.

L'esquelet humà conté 206 ossos de diferent mida i estructura, cosa que significa un 18% de tota la massa del nostre cos.

2.1 Funcions del sistema esquelètic

Els ossos suposen una part molt important del cos per als éssers vius vertebrats perquè ens proporcionen mobilitat, suport i són una peça fonamental per al desenvolupament. Les principals funcions que exerceix el sistema esquelètic són les següents:

1. **Sosteniment.** L'esquelet ens permet mantenir una postura dreta i constant fent de suport als teixits tous i als músculs gràcies a la seva rigidesa que conforma la base del cos humà.
2. **Protecció.** Una de les funcions més importants és la protecció que confereix a tots els òrgans interns, com per exemple el crani al cervell, les vèrtebres a la medul·la espinal o la caixa toràcica al cor i als pulmons.

3. **Moviment.** A través dels senyals nerviosos rebuts pels músculs, aquests es contrauen i provoquen el moviment dels ossos que fan possible la locomoció humana.

4. **Emmagatzematge.** El cos humà té reserves de nutrients i energia pel seu propi funcionament, i una d'aquestes reserves és el teixit ossi. A la medul·la òssia groga s'emmagatzemen glúcids, concretament triglicèrids, que serveixen de provisió d'energia química.

5. **Producció de cèl·lules.** Les cèl·lules sanguínies com els glòbuls vermells, blancs i plaquetes, es fabriquen als ossos. La medul·la òssia vermella és l'encarregada de dur a terme aquesta funció per mitjà de l'hematopoesi (-*poesi*, formació, *hema-*, sang).

6. **Homeòstasi mineral.** A més d'emmagatzemar greixos, l'aparell esquelètic també fa reserves de calci i fòsfor, que són dos elements molt importants per a la seva consistència. Quan hi ha un desequilibri d'aquests minerals a la resta del cos, s'alliberen a la sang per mantenir un nivell regular. És el que s'anomena homeòstasi.

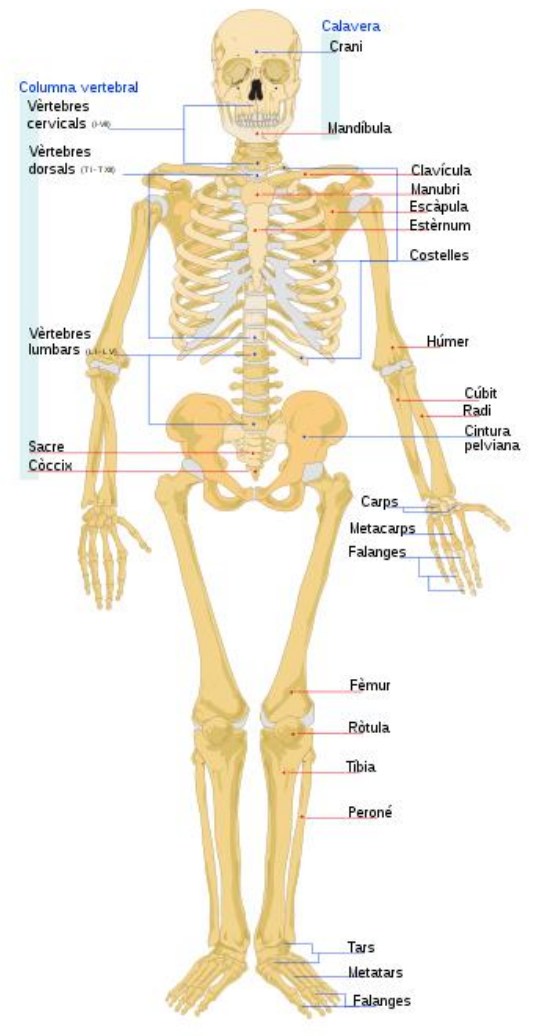


Fig.1 Esquelet humà.

2.2 Fisiologia de l'os

L'os es considera un òrgan complex per la seva composició que varia segons la classe d'os, però que s'organitza primordialment en tres parts diferenciades: la **diàfisi** és la peça central de l'os i la que més volum ocupa, les **epífisis** són les terminacions de l'os i les **metàfisis** uneixen aquestes dues parts en una estructura madura que conté el cartílag de creixement o epifisial per tal d'augmentar la mida longitudinal.

També localitzem el **cartílag articular** als extrems on entren en contacte un os amb un altre, ja que serveix per reduir la fricció i els impactes entre ells que s'ocasionen a l'hora de moure les articulacions.

El **periosti** és una membrana forta de teixit connectiu que se situa al voltant de l'os i que juga un paper molt important en l'increment de grossor, en la inserció de tendons i en la reparació de fractures.

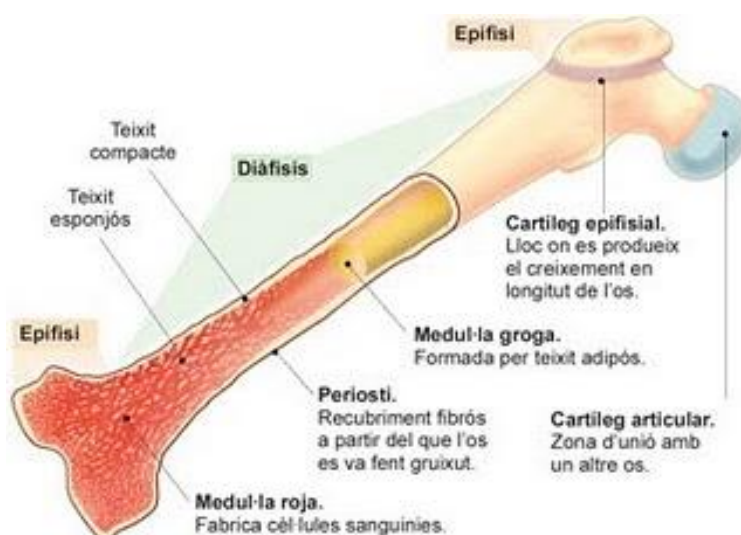


Fig.2 Dibuix de les parts d'un os.

La majoria del contingut ossi són cèl·lules i medul·les de diferents teixits, com l'adipós en el cas de la medul·la groga o el sanguini en el cas de la vermella. Hi trobem quatre modalitats de cèl·lules:

- **Cèl·lules osteogèniques.** Són les cèl·lules mare que encara no s'han diferenciat i que més tard es convertiran en osteoblasts. Es presenten a l'interior del periosti i als conductes que transporten vasos sanguinis.
- **Osteoblasts.** Són les responsables de crear teixit ossi mitjançant la secreció de col·lagen i matriu osteoide. Es caracteritzen per la posició del nucli a un dels costats del citoplasma. Quan madurin es transformaran en osteòcits.
- **Osteòcits.** Corresponen a les principals cèl·lules òssies rodejades per matriu que no fan la divisió cel·lular, com tampoc els osteoblasts, i que ajuden a nodrir l'os mantenint el seu metabolisme constant.
- **Osteoclasts.** Són les més grans de totes i tenen múltiples nuclis. Intervenien en la reabsorció del teixit ossi per procés d'alliberació d'enzims, des de la membrana plasmàtica constituïda per plecs, que destrueixen els minerals de la matriu. Per una altra banda, s'utilitzen per al tractament de malalties com l'osteoporosi.

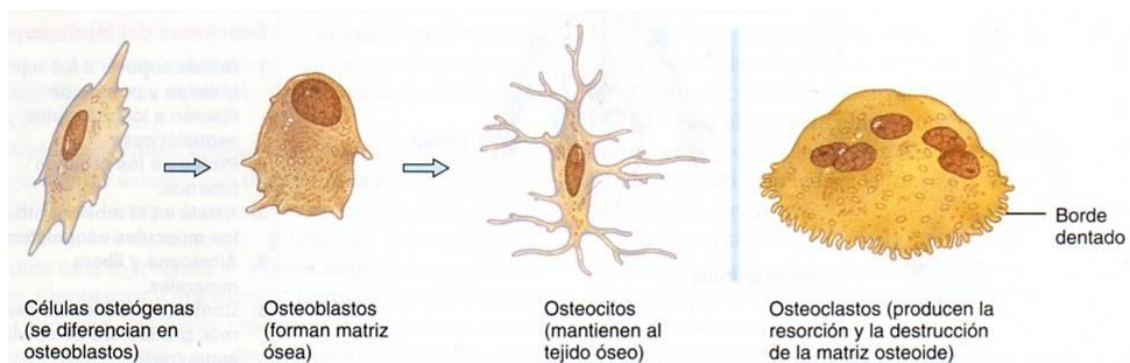


Fig.3 Seqüència de formació de les diferents cèl·lules òssies.

D'aquesta forma ens adonem que els ossos estan contínuament en renovació, es creen i es destrueixen. Tenen la capacitat d'alterar el seu estat estructural en relació amb les necessitats adquirides a partir de la pressió i demandes externes.

2.3 Tipus d'ossos

Els cos humà posseeix una ampla varietat d'estructura òssia quant a forma, mida, longevitat, que depèn de la seva localització a l'esquelet.

Segons el nivell de maduresa es pot diferenciar entre ossos fibril·lars i ossos laminars. Els fibril·lars són els primers que es formen en l'ésser humà, és a dir, es troben en nadons i embrions, als calls formats quan s'esdevé una fractura i a la metàfisi del ossos en creixement. S'anomenen així per la seva composició de grans fibres de col·lagen situades de forma desorientada que li confereix isotropia respecte les propietats mecàniques. Els laminars apareixen un mes després del naixement a partir de la remodelació dels fibril·lars i, per tant, són més madurs. Es diferencien quant a la distribució de les fibres de col·làgena perquè aquí estan organitzades i orientades uniformement. Com a conseqüència adquireix la propietat anisotròpica de variar el seu comportament mecànic segons l'orientació de la força que s'hi apliqui.

Segons l'estructura macroscòpica de l'os, es pot classificar en:

- Compacte o cortical. És una capa exterior sòlida que envolta el teixit ossi i li dona les característiques de resistència i suport pròpies de l'os. Està compost per osteones, o també anomenat sistema d'Havers, que ajuden al material en la seva propietat mecànica formant unes làmines paral·leles fortes en la diàfisi, per exemple, on principalment es detecta la part compacta de l'os.

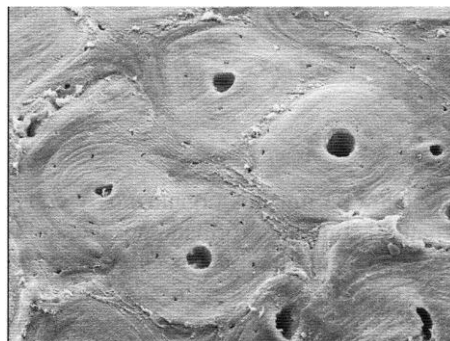


Fig.4 Fotografia feta pel microscopi electrònic de l'interior d'un os compacte.

- Esponjós o trabecular. Al contrari que l'os compacte, aquest presenta un aspecte esponjós, com bé diu el seu nom, a causa de la porositat que ocupa entre un 50 i un 90% de la seva estructura. Al seu interior es poden observar làmines anomenades trabècules que es disposen irregularment, però ben orientades en aquells llocs de tensió per no fracturar-se. Són lleugeres i, per tant, redueix el pes de l'os i facilita el seu moviment, com també protegeixen la medul·la òssia vermella que resideix entre trabècules. Aquest tipus d'os predomina als teixits d'ossos curts, plans i als extrems dels llargs (epífisis), com ara a les vèrtebres.

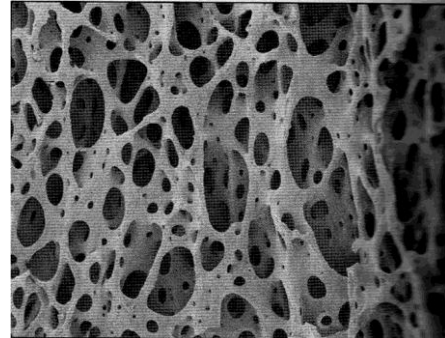


Fig.5 Visió microscòpica de l'interior d'un os esponjós.

Segons la seva forma externa podem trobar tres tipus diferents d'os: ossos llargs com el fèmur, la tíbia, el peroné, el cúbit i el radi; ossos curts com les falanges, els metacarps, el còccix; i ossos plans com l'omòplat o el crani.

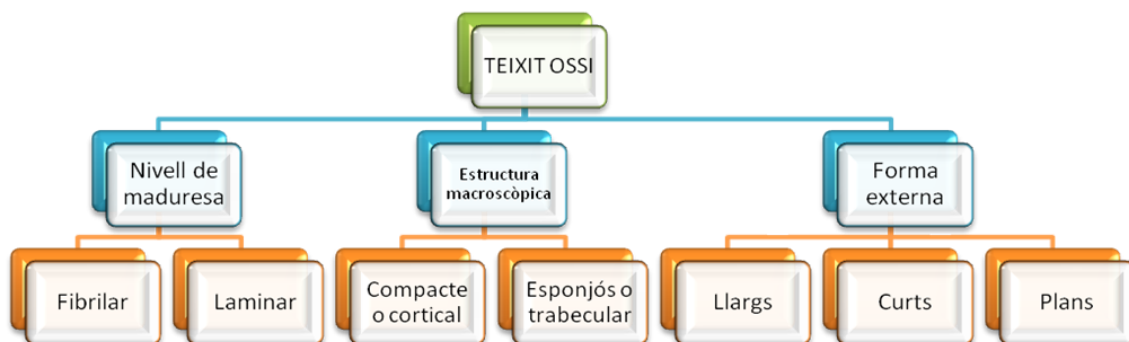


Fig.6 Esquema dels diferents tipus d'os.

2.4 Propietats de l'os

El teixit ossi compleix moltes propietats degut a la seva composició dividida en les fases orgànica i inorgànica. La primera li aporta consistència, solidesa i duresa, en canvi, la segona contribueix a la flexibilitat i a la capacitat amortidora.

Una d'aquestes propietats és la **viscoelasticitat**, és a dir, la resposta mecànica de comportament que dóna l'os a mesura que pateix diferents graus de deformació. Si la taxa de càrrega augmenta, també augmenta la seva rigidesa i es torna més resistent: tot i que si suporta una càrrega massa forta no la podrà tolerar, es tornarà més fràgil i donarà lloc a una fractura o traumatisme ossi.

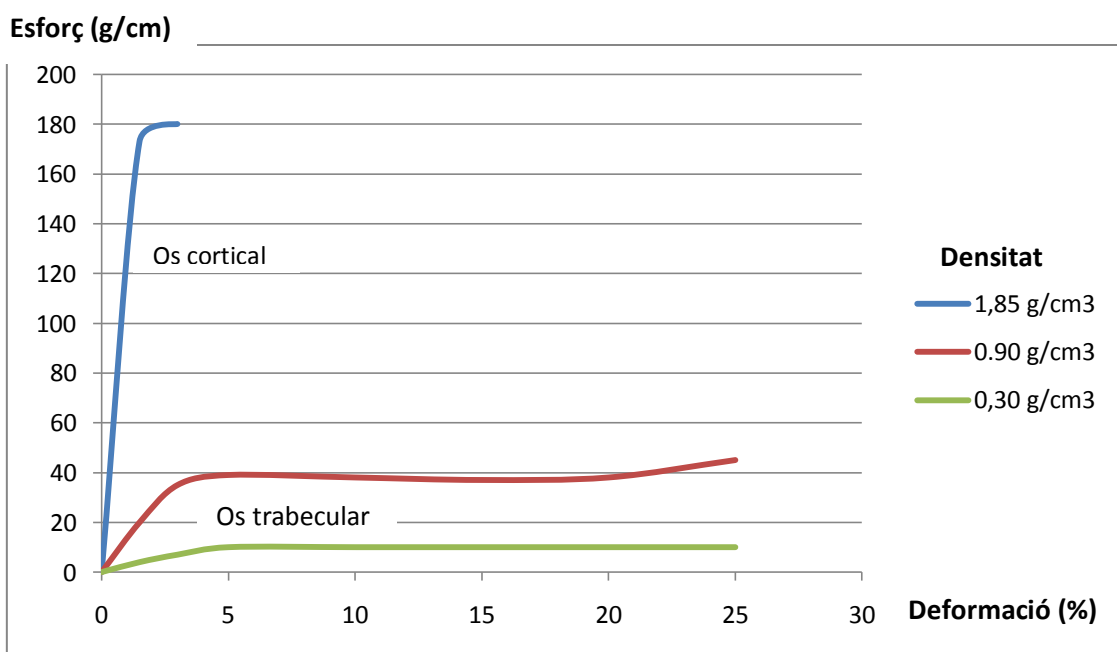


Fig.7 Gràfic de curvatura esforç-deformació per a ossos cortical i trabeculars.

Tot i això la propietat més rellevant és la **mecànica**, ja que el sistema ossi té el càrrec de suportar forces externes i, en conjunt, tot el nostre organisme. Llavors, el material del qual està constituït ha de ser dúctil,

tenaç, elàstic, resistent, i totes aquestes propietats s'aconsegueixen amb la unió de la part orgànica i inorgànica, trabecular i cortical de l'os.

Normalment el teixit ossi és més resistent a la compressió que no pas a la tensió. Per exemple, els ossos corticals contra la tensió poden resistir 130 MPa i a la compressió 190 MPa.

Una altra propietat és la **facultat d'incrementar massa òssia amb l'esforç**, anomenada remodelació o també llei de Wolf. Per això, quan les persones ens fem grans i deixem de fer activitats que requereixen un mínim d'esforç sofrim pèrdua d'os. Així que es recomana fer exercici amb moderació, per tal de no patir aquest tipus de malalties ni tampoc fractures causades per fatiga.

3. Regeneració òssia

Centenars de milions de persones en tot el món presenten malalties relacionades amb el sistema esquelètic, dels quals la gran majoria superen els 50 anys. Aquestes persones són més propenses a patir traumatismes ossis, problemes articulars i d'esquena, malalties com l'osteoporosi i múltiples lesions causades, per exemple, per accidents de trànsit.

L'**osteoporosi** és un cas abundant en la societat d'avui dia. Es tracta de la pèrdua de gran part dels minerals que componen l'os, com ara el calci, i en conseqüència, la disminució de la seva densitat. Això provoca un desequilibri en la remodelació òssia i un major risc a patir fractures.

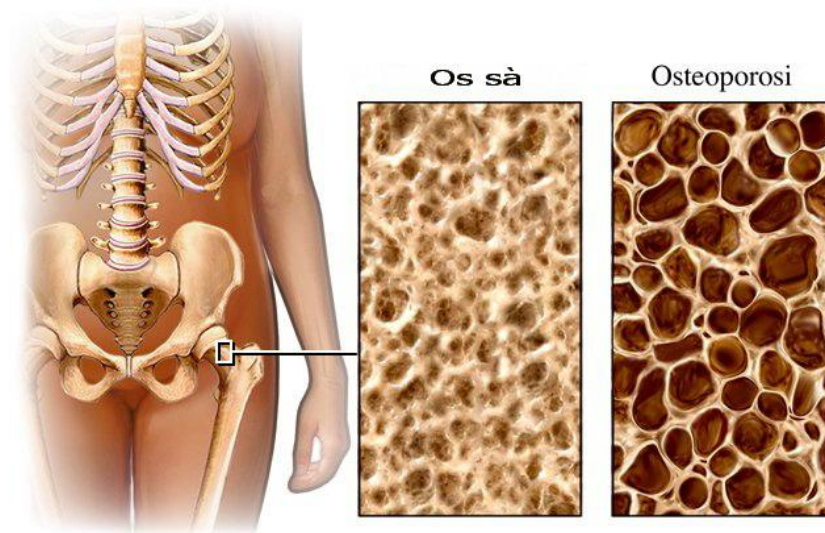


Fig.8 Comparació entre l'estructura interna d'un os sa i un amb osteoporosi. En aquest últim es pot observar major porositat i menor massa òssia per la pèrdua de minerals.

L'augment de la població de majors de 60 anys ha provocat una gran demanda en el sector mèdic quant a sistemes de reparació del teixit ossi. Per aquesta raó, els científics estan investigant en nous mètodes basats en biomaterials i enginyeria de teixits (IT).

3.1 Mètodes de reparació òssia

El mateix cos humà té la capacitat de reparar teixit ossi en cas de trencament. Però per tal que es dugui bé a terme, cal dispositius de fixació per sostenir l'os fracturat i prevenir malformacions. Les teràpies convencionals utilitzades fins ara han sigut els empelts i aparells de subjecció. Els inconvenients d'aquestes tècniques induïdes han esdevingut un avenç cap a una nova ciència, l'enginyeria de teixits, que té com a objectiu millorar les condicions de regeneració òssia.

3.1.1 Mecanismes biològics

Quan s'esdevé una fractura òssia, el propi cos posa en marxa un procés biològic per reparar-la. Podem classificar-ho en quatre etapes:

En primer lloc, es produeix un hematoma a conseqüència del trencament de les venes i artèries que travessen l'os, és a dir, un coàgul de sang que perdura uns quants dies o, fins i tot, un parell de setmanes. Les cèl·lules pròximes destruïdes queden eliminades per neutròfils i macròfags com altres teixits morts.

Seguidament, els fibroblasts del periosti comencen a fabricar fibres de col·lagen i les seves cèl·lules fibrocartílag. El lloc de la fractura que abans era un coàgul, ara és un call fibrocartilaginós que roman durant 3 setmanes.

Més tard, les cèl·lules que es converteixen en osteoblasts sintetitzen matriu extracel·lular mitjançant trabècules d'os esponjós. Llavors el call fibrocartilaginós es consolida i forma un call ossi que es manté aproximadament 3 o 4 mesos.

Per últim, els osteoclasts s'encarreguen d'expulsar els fragments morts i l'os esponjós es torna os compacte. Aquest període s'anomena remodelació òssia i finalitza amb una completa regeneració de la fractura.

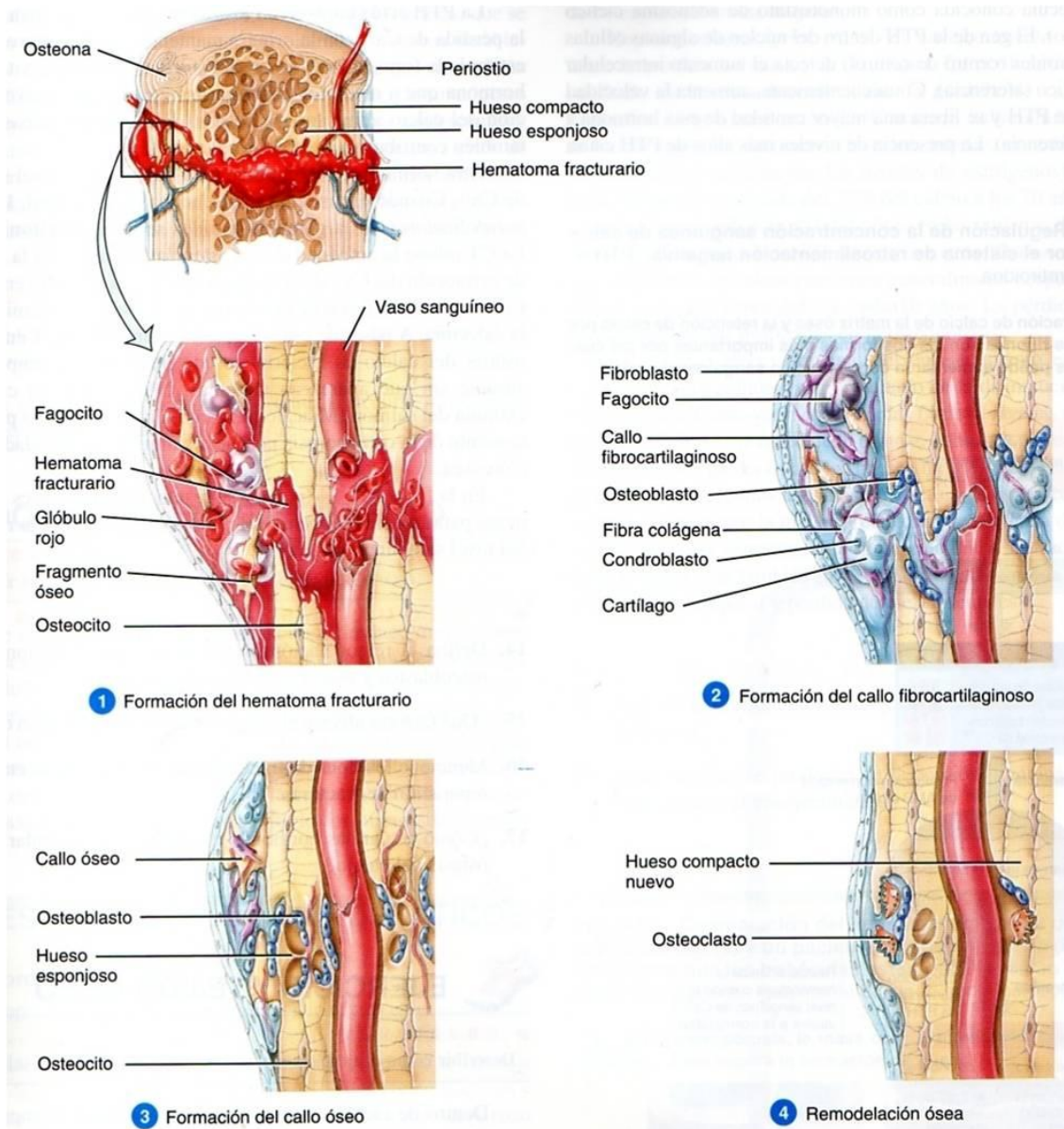


Fig.9 Procés de reparació biològica del teixit ossi a partir de la formació del call.

3.1.2 Tècniques induïdes

Si bé el nostre organisme acudeix instintivament a un mètode de reparació òssia, els avenços mèdics i quirúrgics aporten altres tractaments que pretenen recuperar la fisiologia original i les màximes funcions del teixit ossi.

Autoempelts: es tracta de trasplantar un fragment de teixit del cos d'una persona al lloc on li fa falta. D'aquesta manera no reacciona immunològicament perquè són cèl·lules del mateix individu, encara que sí pot presentar infeccions i es considera un procés costós i lent. Té propietats osteogèniques, ja que a partir de l'empelt es formarà nou os. Per aquestes raons és el mètode més adequat i més emprat en els últims anys.

Al·loempelts: són insercions on intervenen dos individus de la mateixa espècie. Per exemple, els humans utilitzem els teixits dels cadàvers per fer-los servir en persones que necessiten trasplantaments ossis. Per contra, s'hi pot desenvolupar rebuig immune entre pacient i donant malgrat els tractaments químics -com ara el rentat en àcid- als quals són sotmesos per evitar aquest tipus de problemes.

Xenoempelts: en aquest cas, en comptes de ser un trasplantament entre individus de la mateixa espècie, es realitza entre dues espècies diferents. Hi ha grans problemes a causa de transmissions de malalties infeccioses, però en el cas de teixit boví, s'ha trobat moltes semblances quant a porositat que permeten que sigui compatible.

Així com s'apliquen empelts per a reparar ossos, ja siguin lesions, pèrdues, o traumatismes, també s'utilitzen altres procediments en situacions de fractures.

Existeixen dos sistemes de fixació òssia: amb dispositius externs i amb dispositius interns. El primer es basa en claus o cargols units a barres metàl·liques que queden inserides a l'os fracturat, per tal d'aconseguir una consolidació entre totes dues parts. També es fa ús d'un suport vertical extern que serveix per alinear els eixos i per a regular el grau de fixació a mesura que passa el temps. Malgrat el risc d'infeccions degut a les incisions dins el teixit cutani i muscular, sembla un mètode bastant eficaç. L'altre sistema, l'interior, s'empra més sovint perquè no es tan propens a les infeccions i perquè proporciona gran subjecció afavorint les propietats mecàniques. El dispositiu està format per una placa amb

diversos forats on es col·len els cargols i de les quals hi ha varietat de dissenys segons el requeriments que presenti la fractura, o bé claus situats a la medul·la dels ossos llargs.

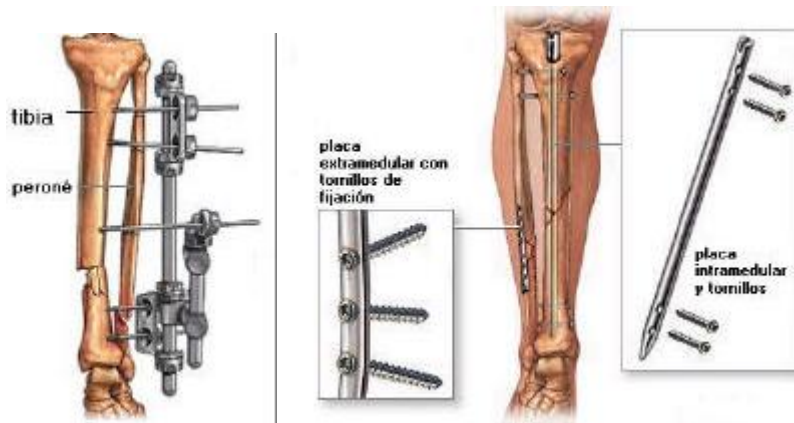


Fig.10 Dispositius de fixació externa i interna respectivament.

3.2 Enginyeria de teixits

L'enginyeria de teixits va començar fa 10 anys amb la necessitat de restaurar i reparar estructures biològiques, tant funcionalment com fisiològicament, com a conseqüència de les limitacions de les tècniques convencionals ja conegudes. Consisteix en la construcció artificial d'una matriu tridimensional semblant a una bastida, feta de biomaterials i amb una certa porositat perquè així les cèl·lules pròpies del teixit puguin colonitzar la nova combinació. De tal manera, no dóna lloc a cap reuig immunològic ja que la informació genètica, l'ADN, és de la mateixa persona. A més,

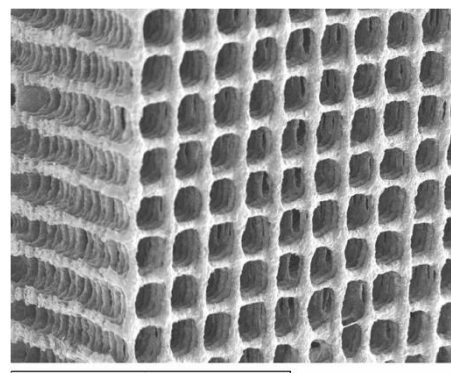


Fig.11 Fotografia feta des del microscopi electrònic de l'estructura tridimensional amb forma de bastida.

aquestes cèl·lules també fabricaran la pertinent matriu extracel·lular de material orgànic, en el cas de teixit ossi, i proliferaran en una determinada arquitectura elaborada específicament.

Aquest procés es pot dur a terme de diferents maneres, tant *in vivo* com *in vitro*, amb diferents biomaterials: ceràmiques, polímers, vidres, per tal d'estudiar la millor forma de substituir la part danyada del teixit.

Amb el nou mecanisme, s'esperen avenços biomèdics que combatin intervencions doloroses i elevades de preu com els autoempelts, la col·laboració de donants als al·loempelts i el risc de transmissió de malalties infeccioses als xenoempelts.

4. Biomaterials

Els biomaterials són aquelles substàncies com ara polímers, metalls, ceràmiques que s'utilitzen en medicina per entrar en contacte amb l'organisme viu i combatre malalties. Per tant, han de respondre a un seguit de condicions per reaccionar favorablement a l'interior d'un individu.

1. **Biocompatibilitat.** Primer de tot, el material ha de ser acceptat per l'organisme i no ser tòxic. D'aquesta manera no podran reaccionar negativament, sinó que treballaran conjuntament per dur a terme una determinada funció favorable.

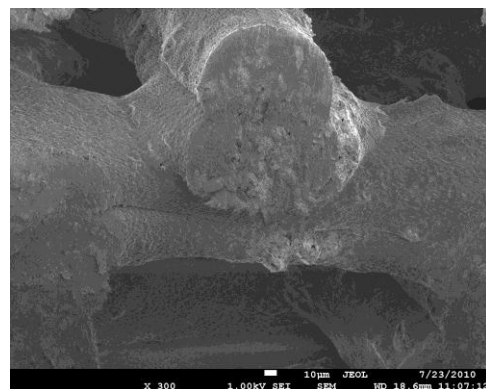


Fig. 12 Imatge obtinguda pel microscopi electrònic on s'observa l'interior de la bastida feta de biomaterials. (Autor/a: Laia)

2. **Porositat.** És un dels requisits més importants, ja que les cèl·lules originadores de matriu han de tenir un espai per poder proliferar dins del biomaterial. La mida dels porus ha de ser l'adequada segons la mesura de les cèl·lules, entre 200 i 900 μm . També són essencials perquè la sang junt amb els nutrients pugui alimentar el teixit.

3. **Solubilitat.** El biomaterial, ja sigui obtingut naturalment com sintèticament, no ha de ser soluble o molt poc en el cos humà.

4. **Bioactivitat.** Un altre requisit important és que ha de ser bioactiu. Significa que el teixit atrau les cèl·lules i forma enllaços amb el nou os restablert pels osteoblasts.

5. **Propietats topogràfiques.** Característiques com la rugositat han de romandre igual com si es tractés del teixit inicial. El biomaterial es localitzarà en un medi aquàtic i les cèl·lules estan compostes bàsicament per líquids, de manera que la superfície no ha de ser hidròfoba i tampoc completament plana, sinó que ha de tenir una certa rugositat perquè les cèl·lules es puguin adherir.

6. **Propietats mecàniques.** També cal que respongui a les mateixes propietats de l'os, com és l'exemple de la resistència a càrregues. Mentre dura la regeneració òssia, el biomaterial ha de suportar forces externes.

7. **Biodegradabilitat.** Un cop s'ha generat l'estructura òssia, el biomaterial no ha de persistir dins la persona. A mesura que es va formant l'os, la substància es degrada gràcies que els elements segregats poden ser absorbits, eliminats o metabolitzats pel propi organisme.

4.1 Polímers

Els polímers, com per exemple els plàstics, són molt útils en biomedicina a causa de la seva facilitat de manipulació i aplicació en éssers vius. Les seves propietats químiques, físiques i mecàniques són semblants a les dels teixits corporals i es poden fabricar específicament per a implants.

En general, els polímers es poden utilitzar en farmacologia, per la dosificació i alliberació dels medicaments i, en cirurgia i traumatologia, per implants ortopèdics, membranes protectores, reparació òssia i subjecció de lligaments.

Hi ha dos tipus de polímers: els naturals i els sintètics. Els naturals poden ser proteïnes i polisacàrids, en canvi els sintètics són els polièsters, polianhídrids, policarbonats, etc. S'obtenen fàcilment i es formulen segons si són bioestables, quan es substitueix un teixit per complet, o biodegradables quan es tracta d'una consolidació a temps limitat. En el primer cas, trobem entre altres, el polietilè (PE), propilè (PP) i polimetilmetacrilat (PMM). Per altra banda, els biodegradables són l'àcid poliglicòlic (PGA) i l'àcid polilàctic (PLA), amb el qual es farà l'estructura tridimensional per l'enginyeria de teixit.

4.1.1 Àcid polilàctic (PLA)

L'àcid polilàctic és un polímer termoplàstic, amorf o semicristal·lí. Això vol dir que no té una forma concreta, sinó que podem modificar-la aplicant calor per obtenir major plasticitat o solidesa amb l'aplicació de fred. És un material biodegradable en 12 o 16 mesos, inodor, poc inflamable, hidròfob, clar i brillant.

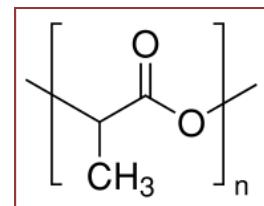


Fig. 13 Fórmula de la cadena d'àcid polilàctic.

És un derivat de l'àcid làctic que s'obté mitjançant un procés de fermentació de midó, bàsicament de glucosa, sacarosa i dextrosa, que produeix aquest i que després de ser sintetitzat amb policondensació es forma en àcid polilàctic.

Però aquest polièster és baix en pes molecular, i com que es poden modificar les propietats dels materials variant la seva composició química,

primer l'àcid làctic es transforma en un dièster cíclic anomenat *lactide*, i seguidament s'obre l'anell cíclic per polimerització donant lloc a l'àcid polilàctic amb pes molecular molt més alt.

La **crystal·linitat** és una característica significativa de l'àcid polilàctic: es fonamenta en l'ordenació dels àtoms en la seva estructura, en certs punts originen cadenes plegades i en altres queden desorientats donant lloc a una propietat semicristal·lina.

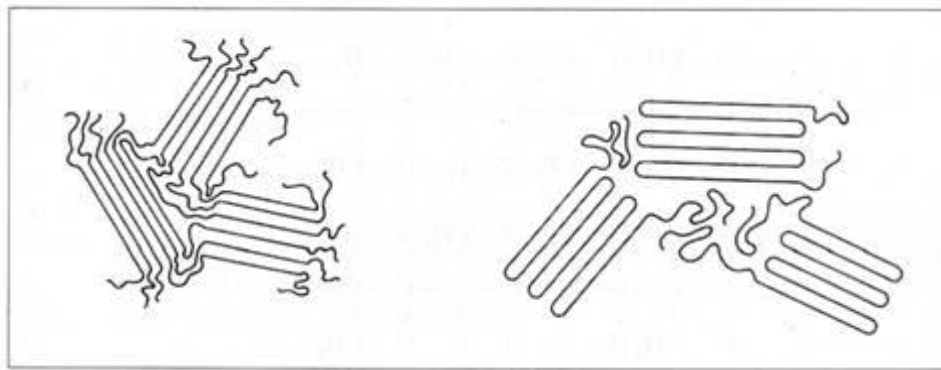


Fig. 14 Estructura de les cadenes plegades que proporcionen cristal·linitat al polímer.

L'altre tret important és la **isomeria òptica**, un efecte geomètric que es produeix quan els monòmers que constitueixen el polímer presenten un doble enllaç i la resta d'àtoms es disposen en ramificacions simètriques a tots dos costats de la molècula. En conseqüència, s'hi observen quatre maneres diferents de formular el PLA.

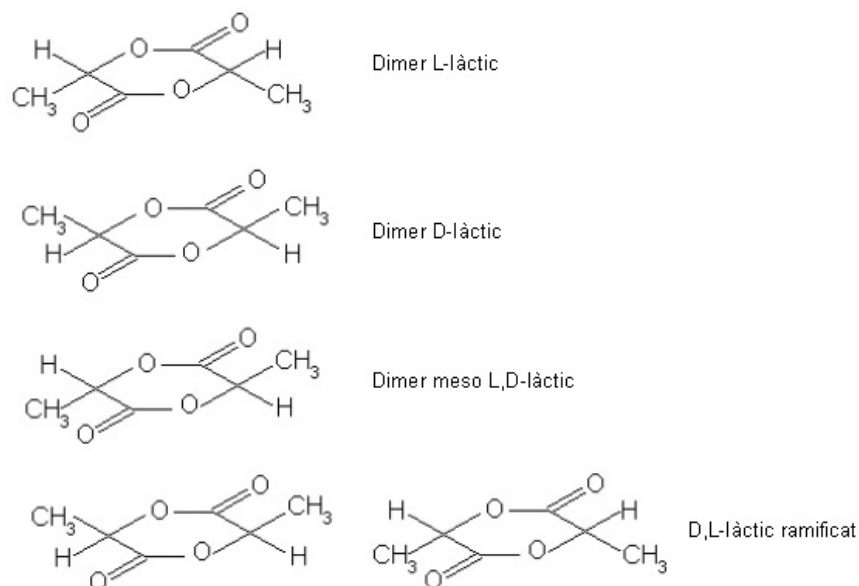


Fig. 15 Fórmules químiques del isomerisme òptic d'àcid polilàctic.

4.1.2 Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol és un oligòmer (compost polimèric format per menys de deu molècules), en estat líquid que s'obté per mitjà de la polimerització d'òxid d'etilè. És soluble en aigua i té una baixa temperatura de transició a cristall, de -75 a -65°C que li lliura la facultat de plastificant.

Es troba en abundància a la indústria i el comerç amb el nom de Carbowax perquè s'utilitza, entre altres coses, en cosmètica i preparació de fàrmacs. Hi ha un ampli marge de diferents pesos moleculars que proporcionen el nom del propi polièter, des de 300 a 10⁶ g/mol.

En la regeneració òssia s'empra com a reductor de la temperatura de transició del PLA i com a material hidròfil que ajuda a no repel·lir les molècules d'aigua com ho fa l'àcid polilàctic. Aporta aquestes dues propietats al material que es farà servir per fabricar l'estructura

tridimensional. A més, la seva baixa inflamabilitat i no toxicitat fa que sigui un material biodegradable apte per a la reparació de teixit ossi.

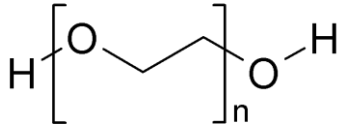


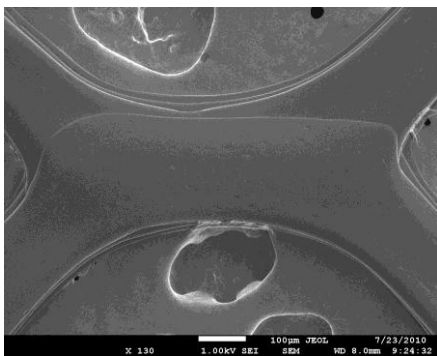
Fig. 16 Fórmula química del polietilenglicol.

4.2 Bioceràmiques

Les bioceràmiques són uns dels materials més apropiats per a l'enginyeria de teixits, encara que no ho sembli per la seva fragilitat o el caràcter inert. Però gràcies a aquest caràcter és biocompatible amb el cos humà i no reacciona severament.

Estan compostes per elements metàl·lics i no metàl·lics per mitjà d'enllaços iònics, com per exemple l'òxid d'alumini (Al_2O_3). Són especialment bioactives i aïllants de l'electricitat i la temperatura, a causa de la manca d'electrons conductors. Per aquesta raó s'empren per recobrir els implants o pròtesis metàl·liques.

El millor avantatge de la bioceràmica és la semblant estructura quant a fracció mineral, com ara la hidroxiapatita, del teixit ossi.



Elements com el silici, fòsfor, alumini, carboni, oxigen, titani, calci i zirconi són els principals components de les bioceràmiques junt amb els bioïdres, vitroceràmiques, sulfats i fosfats de calci.

Fig. 18 Imatge del microscopi electrònic a 130 augments de la bastida. (Autor/a: Laia)

4.2.1 Fosfat de calci

Ja que la hidroxiapatita és un fosfat de calci, aquest tipus de compostos són molt útils per a la regeneració òssia. El calci i el fòsfor mostren una òptima relació amb el cos humà i s'obtenen múltiples combinacions entre fosfats de calci en investigació mèdica des de fa 30 anys.

Influeixen molts factors en el comportament d'aquest material; el pH, la humitat, la temperatura, la solubilitat. La fase estable de la hidroxiapatita es troba als 37° C i amb un pH $\geq 4,2$, i per sota dels paràmetres pot deshidratar-se. Si la relació entre Ca i P és petita, el pH disminueix i la solubilitat augmenta, i a la inversa.

Quant a les propietats mecàniques del fosfat de calci, depenen del volum dels porus, que oscil·len entre 1 i 100 μm de diàmetre. Tant la tensió com la compressió són resistents per tal material mitjançant els microporus i els macroporus. Implants de bioceràmica i, concretament fosfat de calci, aplicats en clínica, solen ser petits com ara els dentals o recobriments de materials metàl·lics per evitar la seva corrosió.

4.3 Biovidres

De la mateixa família de les bioceràmiques, apareixen els biovidres, unes estructures amorfes perquè els àtoms estan irregularment disposats en l'espai. Una particularitat és el canvi d'estat quan passa de sòlid a líquid gradualment i no a una temperatura exacta.

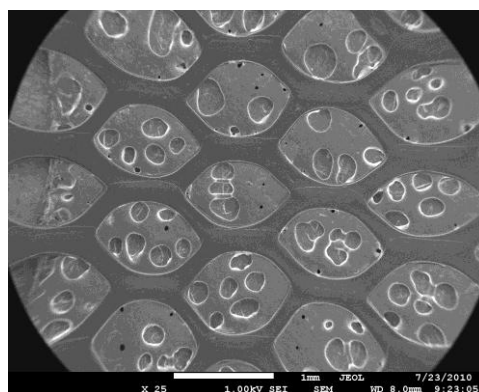


Fig. 19 Fotografia feta pel microscopi electrònic, on apreciem uns coàguls de fosfat de calci a la base que permet l'adhesió de l'estructura tridimensional. (Autor/a: Laia)

Els biovidres es divideixen en dues categories segons els components, de base òxid de silici SiO_2 , o bé de base fosfat P_2O_5 . Els primers representen ser bastant bioactius però es degraden lentament, en canvi els vidres de fosfat són reabsorbibles a gran velocitat. Afortunadament, la composició química dels materials es pot modificar depenent dels resultats que es volen obtenir per a cada aplicació biomèdica, ja que cadascuna requereix unes propietats específiques.

4.3.1 G5

El biovidre que es farà servir per a la fabricació del material és un compost de matèria primera anomenat G5, format per un 44,5% molar de CaO , un 44,5% en P_2O_5 , el 6% de Na_2O i el 5 % restant en TiO_2 .

L'aplicació d'aquest biovidre facilita la rugositat del material car que les cèl·lules òssies han de poder situar-se a la superfície de la bastida i no relliscar, com també en el cas de les molècules aquoses. Però la propietat més important que li aporta a l'estructura tridimensional és la bioactivitat o capacitat per atreure les cèl·lules un cop estigui implantat al cos humà.

El procediment pel qual s'adquireix el G5 s'exposa al següent apartat.

PART EXPERIMENTAL

5. Elaboració del material

Els biomaterials que han estat presentats es faran servir per a la confecció de l'estructura tridimensional formant part del material polimèric. A continuació s'explica com es prepara la solució entre l'àcid polilàctic, el polietilenglicol i el biovidre G5.

5.1 Obtenció del reactiu G5

Per fabricar el G5 es necessiten els compostos CaCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ i TiO_2 com a matèria primera. Per a un mol de biovidre es requereixen 102.377g. de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 44.900g. de CaCO_3 , 6.3588g. de Na_2CO_3 i 3.9939g. de TiO_2 .

Primer de tot es duu a terme la calcinació del carbonat de calci, CaCO_3 , que separa l'òxid de calci, CaO , del diòxid de carboni CO_2 . L'alliberació d'aquest gas pot influir negativament si es tractés de la reacció de tots els compostos. Per aquesta raó és un procés que es fa a part i prèviament de la fusió completa.

El següent gràfic marca la curvatura d'escalfament del CaO_3 perquè arribi a calcinar-se i unes hores més tard el refredament quan la reacció sigui finalitzada.

Temperatura (°C)

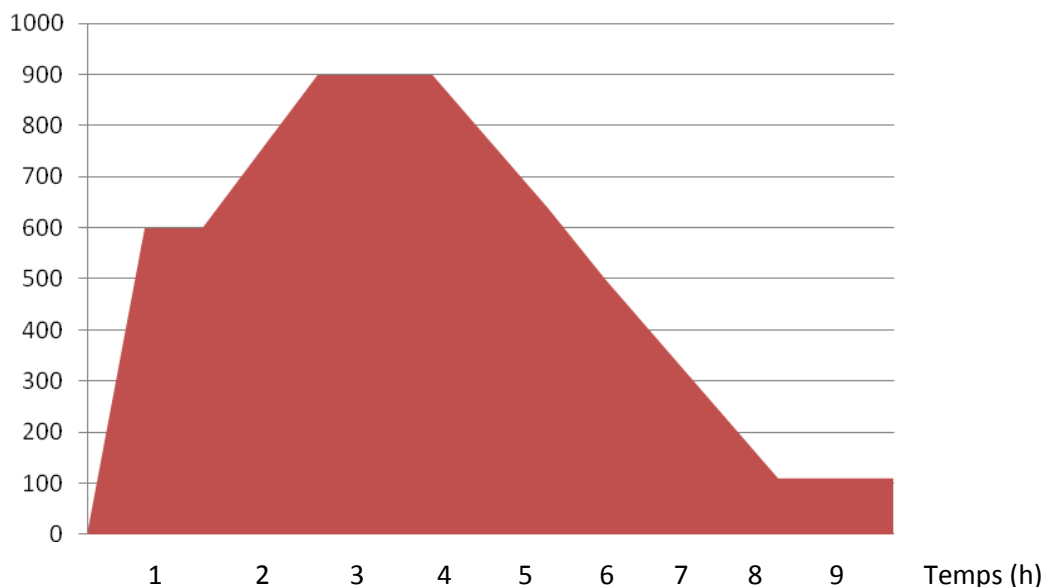
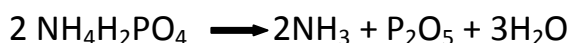


Fig. 20 Gràfic temperatura-temps de la calcinació del carbonat de calci.

El pròxim pas és fondre la mescla de tots els components en un gresol de platí, ja que aquest element és capaç de suportar temperatures majors a 1750°C sense arribar al punt de fusió. La màxima temperatura a assolir serà de 1350°C quan hagin transcorregut 15 hores aproximadament. Llavors es mantindrà a la mateixa temperatura durant 8 hores més per tal d'aconseguir homogeneïtat en la massa vítria, i un cop finalitzat el temps, es refredarà en una placa d'acer inoxidable escalfada a 480°C. Per seguretat, calen guants especials, ulleres, pinces i protecció per al cos i la cara a l'hora de treure el gresol amb el vidre líquid del primer forn i abocar-lo en l'altre recipient que es col·locarà al segon forn. Aquí és on es formarà el vidre sòlid a 533°C durant 30 minuts.

En tot aquest procés hi ha hagut diverses reaccions de la matèria primera, com ara l'alliberació de CO₂ per part de Na₂CO₃ que queda en òxid de sodi, la deshidratació de les sals hidratades, transformacions cristal·lines i la reacció de NH₄H₂PO₄ que es resumeix d'aquesta manera:



L'última fase per realitzar el biovidre G5 és moldre la placa transparent que hem obtingut en un molí de boles que podem observar en la Fig. 22 i, les partícules extretes que encara no són suficientment petites com per dissoldre-les en els materials de PLA i PEG, es polvoritzen en un morter d'àgata i en una làmina de filtre de 40µm.



Fig. 21 Morter d'àgata



Fig. 22 Molí de boles

5.2 Preparació de la solució

L'objectiu d'aquest procés és preparar una solució al 5% de concentració en massa en cloroform, és a dir, cada 100mL de dissolvent (CHCl_3), 5 grams de solut (PLA/PEG).

5.2.1 Material

- Vas de precipitats de 100 mL
- Proveta de 50 mL
- Balança electrònica
- Agitadora
- Embut
- Comptagotes
- Espàtula
- Paper d'alumini



Fig. 23 Agitadora (Autor/a: Laia)

5.2.2 Reactius

- Cloroform (CHCl_3)
- Àcid polilàctic (PLA)
- Polietilenglicol (PEG)
- Biovidre (G5)

5.2.3 Normes de seguretat

- Posar-se guants
- Utilitzar bata
- Quan apliquem el cloroform haurà de ser dins d'una campana per tal que els gasos marxïn i no els inhalem

5.2.4 Càlculs i procediment

Per a 50 mil·lilitres de CHCl_3 , necessitem 2,5 grams de solut, és a dir, una mescla entre àcid polilàctic i polietilenglicol en proporció 95/5 respectivament. Així calculem quina és la quantitat de cada reactiu per separat:

$$2,5\text{g PLA/PEG} \cdot \frac{95\text{g PLA}}{100\text{g PLA/PEG}} = 2,375\text{g PLA}$$

$$2,5\text{g PLA/PEG} \cdot \frac{5\text{g PEG}}{100\text{g PLA/PEG}} = 0,125\text{g PEG}$$

L'àcid polilàctic ja comercialitzat i conservat en un congelador a -25°C , s'ha de mantenir a temperatura ambient durant uns 30 minuts abans de fer-lo servir per a la preparació del material.

Pesem en una balança electrònica els 2,375g de PLA amb l'ajut d'una espàtula i els dipositem en un vas de precipitats. Afegim tres gotes aproximadament de PEG per mitjà d'un comptagotes, fins a arribar als 2,5g que ha de mesurar el solut.

El següent pas és agregar el cloroform a la mescla perquè aquesta es dissolgui bé, ja que el CHCl_3 s'evaporarà amb el pas del temps i en el cas que romangués en petites quantitats, a l'hora de fabricar la bastida, s'escalfa a 40°C on acaba d'evaporar-se.

En aquest procediment s'empra l'embut i la proveta en una campana extractora de gasos per mesurar els 50mL de cloroform. Els aboquem al vas de precipitats que conté el solut i deixem el material ja format en una agitadora perquè s'homogeneïtzi la mescla tapant-ho amb paper d'alumini.

6. Fabricació de l'estructura

Un cop hem obtingut la solució desitjada, només queda dissenyar i elaborar la bastida per mitjà de la maquinària de prototipat ràpid. En aquest apartat s'explica el funcionament del dispositiu, com projectar l'esbós que posteriorment serà la bastida, si es tracta d'una forma rectangular, quadrada, triangular, i com es processa l'estructura en 3D.

6.1 Màquina de prototipat ràpid

La màquina de prototipat ràpid (PR) permet crear estructures tridimensionals tal i com les dissenyem, garantint les necessitats de geometria, interconnectivitat, mida de la porositat, grossor i altres distintius analítics que requereixen les bastides de biomaterial i que amb màquines convencionals no es poden dur a terme.

El seu nom esdevé gràcies a la velocitat de fabricació de la bastida, o també anomenada *scaffold* en anglès, en menys d'un dia, fet que anteriorment no era possible.



Fig. 24 Màquina de prototipat ràpid.

Aquesta nova tècnica consisteix en la segregació i disposició del material polimèric a partir d'una xeringa, que el va situant capa a capa repetidament i amb gran precisió sobre un portaobjectes.

Està formada per dos parts principalment; el motor on es troba tot el mecanisme tecnològic i l'ordinador junt a una petita pantalla de la càmera instal·lada a l'extrem de la xeringa. Dins el motor hi podem distingir tres tipus de bombes al cos central de la màquina:

- **Bomba de desplaçament:** es tracta d'un pistó situat a l'interior de la xeringa per tal que el biomaterial del dipòsit estigui comprimit i llisqui, a més d'indicar el recorregut que ha de seguir l'agulla per on es desprèn la solució.

- **Bomba de pressió:** per mitjà d'aquest conducte se subministra l'aire de pressió suficient perquè la xeringa a la qual està connectada dipositi la solució del material preparat en forma del disseny geomètric desitjat.
- **Bomba intel·ligent:** és la bomba més important perquè controla els paràmetres de la xeringa com són la pressió, l'obertura de la vàlvula, les direccions de desplaçament i l'alçada.

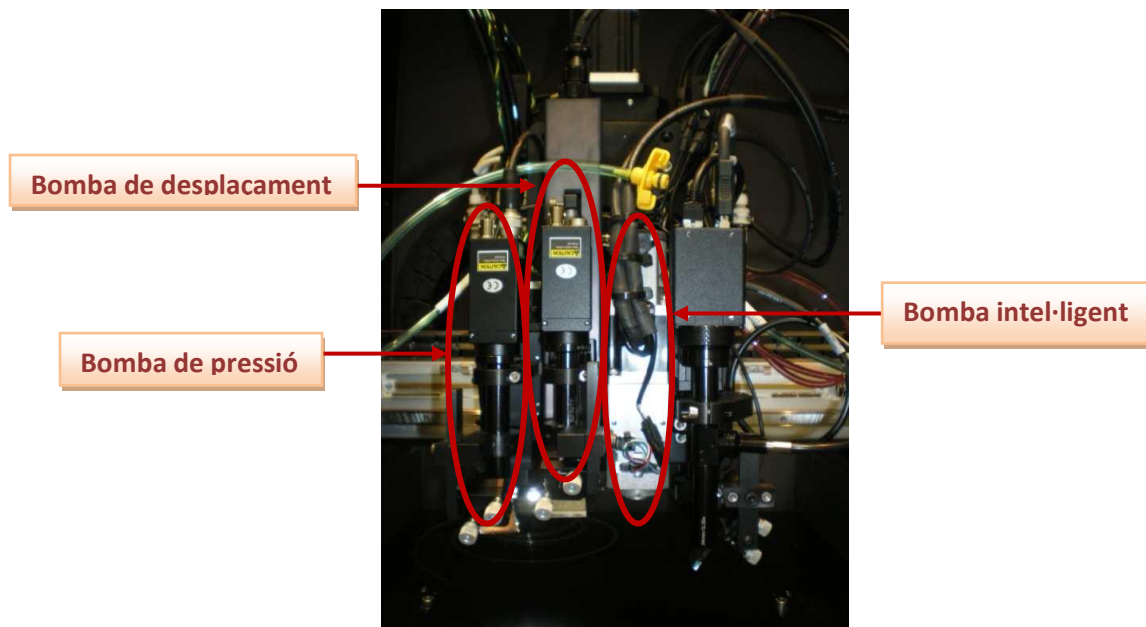


Fig. 25 Mecanisme de la màquina PR amb la senyalització de les tres bombes.

6.2 Elaboració de la bastida

Abans de començar a formar l'estructura en tres dimensions, cal que es faci un disseny a l'ordinador del PR en 2D amb totes les coordenades oportunes per tal que el programa especialitzat CAD envii la informació a la màquina d'aquesta manera:

Code explanations:

```
speed = 8
pressure = 30
move 5 5 move 0 3
move 18 0 move -18 0
move 0 3 move 0 3
move -18 0 move 18 0
move 0 3 move 0 3
move 18 0 move 0 0 0.1
```

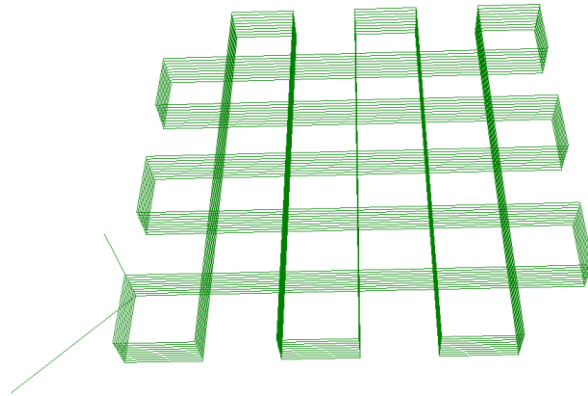


Fig. 26 Imatge obtinguda pel programa informàtic *CAD tool*, de la creació del disseny de la bastida.

Amb aquestes dades s'expressen els mil·límetres que ha de recórrer l'agulla de la xeringa que conté el material de PLA/PEG en cadascuna de les direccions per anar imprimint la bastida. La velocitat a la qual ha de moure's s'indica amb la paraula "speed", provinent de l'anglès, que es mesura en mm/s i la pressió, "pressure", en unitat de PSI (1 PSI=0,068atm. o 6894,75Pa). La primera columna numèrica representa l'eix x en direcció de dreta a esquerra, la segona l'eix y en direcció de dalt a baix i la tercera l'eix z per poder pujar de capa.

Un cop acabat l'esbós s'ha de comprovar i configurar els paràmetres de control de la màquina PR, com ara la pressió, la velocitat, la posició, la temperatura, etc. Aquesta última ha d'indicar entre 40 i 45°C perquè la solució sigui prou líquida com per a fluir per l'agulla de 200µm de diàmetre. Malgrat aquesta mida, el filament polimèric quedarà reduït en 70µm a causa de l'evaporació del cloroform.

Mentre que el material es va escalfant, connectem el cable d'aire comprimit a la bomba de pressió i col·loquem un portaobjectes a la base superficial per sota de la xeringa amb subjecció de cinta adhesiva.

La velocitat marcarà 2mm/s i la pressió serà de 58 PSI, encara que a mesura que es va creant la bastida, es regularà per la raó d'acumulació de material als extrems de l'estructura on l'agulla puja de capa i modifica la seva direcció desprenent més quantitat de solució que en altres sectors. Per exemple, en la segona capa la pressió disminuirà 7 PSI i en la tercera 3 PSI més.

L'últim pas és posar en marxa la màquina perquè comenci a imprimir la bastida i anar observant la seva confecció que funcionarà tal i com mostra la Fig. 27.

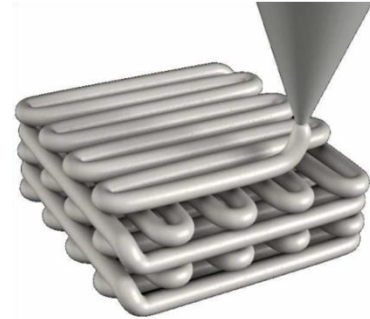


Fig. 27 Dibuix del procediment seguit per la màquina de prototipat ràpid per formar l'estructura en 3D.

En conclusió, nosaltres tenim la capacitat d'escollir les mesures de la porositat, el gruix, l'alçada, la concentració i, en general, la geometria i disseny que ha de tenir l'estructura tridimensional que serà implantada a l'ésser humà per a regenerar teixit ossi.

7. Caracterització del material

Ja hem fabricat la bastida en tres dimensions amb els biomaterials corresponents, ara només falta estudiar les propietats que presenta. Es pot fer per mitjà de moltes tècniques, però nosaltres l'estudiarem per interferometria i microscopia electrònica. D'aquesta manera obtindrem imatges que ens proporcionaran mides superficials i fotografies a gran resolució des de les perspectives que desitgem.

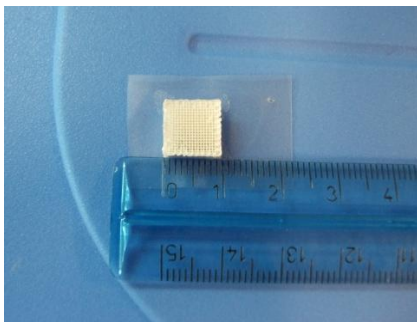


Fig. 28 Fotografia a mida real de la bastida creada per biomaterials.

7.1 Interferometria

Aquesta tècnica s'utilitza per determinar la topografia de la superfície tridimensional, és a dir, en mesura la rugositat, la porositat, les distàncies entre desnivells i les seves amplades. L'interferòmetre és la màquina encarregada de captar les imatges d'aquest tipus de caracterització, per mitjà d'un feix de llum blanca d'alta resolució, que analitza els punts de màxima rugositat i els escaneja.



Fig. 29 Interferòmetre: màquina que estudia la rugositat dels materials, situada al Parc Científic de Barcelona.

Per l'estudi es necessiten diferents mostres del material que anteriorment hem preparat, per exemple, una amb biovidre G5 i una altra sense, i també, tres mostres més amb diverses concentracions de PLA i PEG. Nosaltres farem servir fragments de material compost per 95/5 de PLA/PEG respectivament, per PLA/PEG/G5 i una només per PLA.

Un cop estiguin adherides amb cinta adhesiva de doble cara als seus porta-objectes, ens disposem a buscar les imatges amb més rugositat en l'interferòmetre òptic.

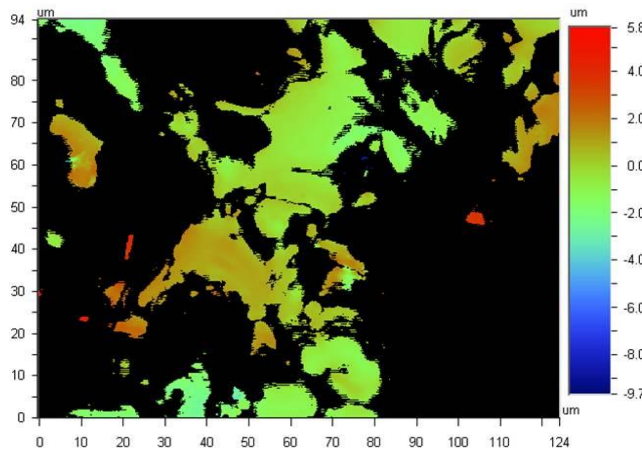
El primer pas és col·locar la mostra a la platina i ajustar-ne la llum. Ara cerquem la zona que conté més desnivells i rugositat, fixant-nos en les interferències que apareixen a la pantalla de l'ordinador connectat. L'aparell funciona com un microscopi òptic, té cargols macromètric i micromètric que serveixen per enfocar les parts on ens movem. Quan tinguem el punt on hi ha major interferència, guardem la imatge. Per últim, obtenim la fotografia en 3D de la mateixa zona, gràcies a un programa especial que ens permet mesurar els múltiples paràmetres entre els quals hi ha:

- **Rugositat mitjana (S_a):** és l'àrea compresa entre la rugositat i la línia mitjana dels pics o desnivells.
- **Altura dels punts més elevats (S_z):** es calculen les alçades dels cinc punts més alts de la zona i les cinc valls més baixes i es fa la mitjana.
- **Asimetria (S_{sk}):** mesura l'asimetria de les desviacions superficials a partir d'un pla mig, que ens fa saber la distribució de les altures.

A continuació us mostro els resultats obtinguts de la interferometria.

En les dues primeres fotografies trobem la mostra de PLA/PEG/G5 a uns 50 augments que presenta grans desnivells (cims de 5 μm d'alçada) i amb gran extensió en tota l'àrea a causa de la presència del biovidre que li confereix molta rugositat.

Amplitude	
Sa	852.99 nm
Sq	1.07 um
Sz	6.25 um
Ssk	0.11
Sku	4.94
Setup Parameters	
Size	736 X 480
Spacing	168.96 nm
Processed Options	
Terms	Tilt
Filtering	None



Title:

Note:

Fig. 30 PLA/PEG/G5. Tan sols trobem desnivells en certs punts perquè és on hi ha aglomeracions de biovidre G5.

3-Dimensional Interactive Display

Date: 07/22/2010
Time: 12:01:21

Surface Stats:

Ra: 853.46 nm

Rq: 1.07 um

Rt: 15.51 um

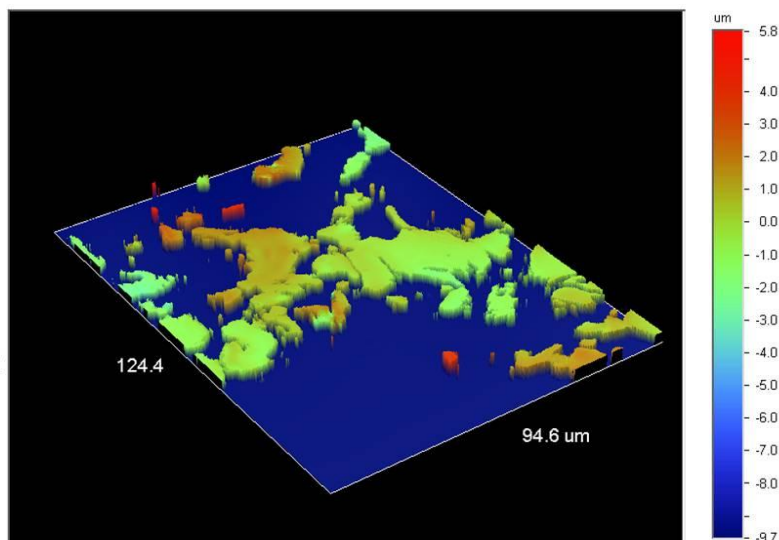
Measurement Info:

Magnification: 49.72

Measurement Mode: VSI

Sampling: 168.96 nm

Array Size: 736 X 480

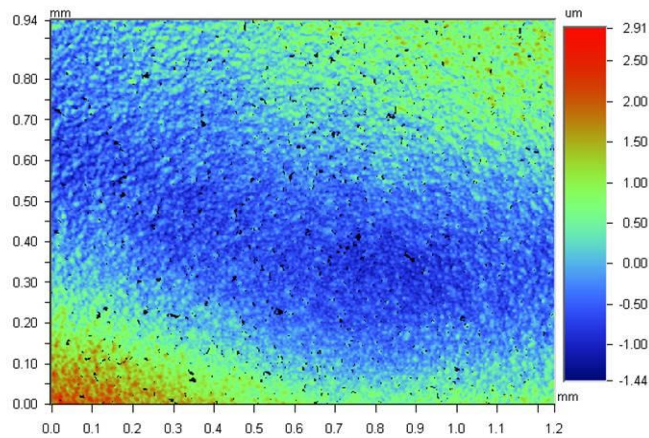


Title:

Note:

Fig. 31 3D PLA/PEG/G5. Observem que la majoria de desnivells estan de color vermell o taronja perquè són d'elevada altura. Aquesta mostra conté gran rugositat, que facilitarà l'adhesió de molècules aquoses i cèl·lules òssies.

Amplitude	
Sa	463.41 nm
Sq	574.36 nm
Sz	2.67 um
Ssk	0.73
Sku	3.38
Setup Parameters	
Size	736 X 480
Spacing	1.69 um
Processed Options	
Terms	Tilt
Filtering	None



Title:
Note:

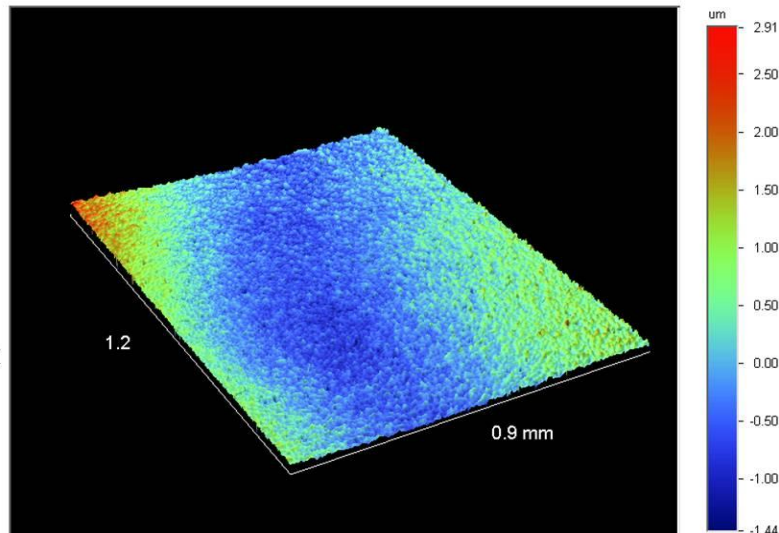
Fig. 32 PLA. Com que aquest exemplar només conté àcid polilàctic no és gaire rugós. Ho podem justificar per la presència de gran zones blaves a la imatge, que indica poca alçada dels desnivells.

Surface Stats:

Ra: 463.46 nm
Rq: 573.87 nm
Rt: 4.35 um

Measurement Info:

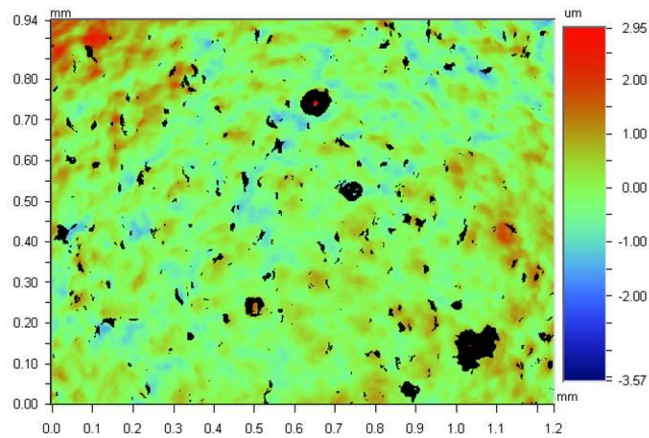
Magnification: 4.97
Measurement Mode: VSI
Sampling: 1.69 um
Array Size: 736 X 480



Title:
Note:

Fig. 33 3D PLA. En la imatge en 3D constatem que es tracta d'una superfície quasi plana en tota la seva àrea.

Amplitude	
Sa	367.68 nm
Sq	475.36 nm
Sz	3.62 um
Ssk	0.60
Sku	4.31
Setup Parameters	
Size	736 X 480
Spacing	1.69 um
Processed Options	
Terms	Tilt
Filtering	None



Title:

Note:

Fig. 34 PLA/PEG 95/5. En aquesta mostra apreciem gran rugositat distribuïda uniformement, que arriba fins els 3 µm en algunes zones.

Surface Stats:

Ra: 367.29 nm

Rq: 474.77 nm

Rt: 6.52 um

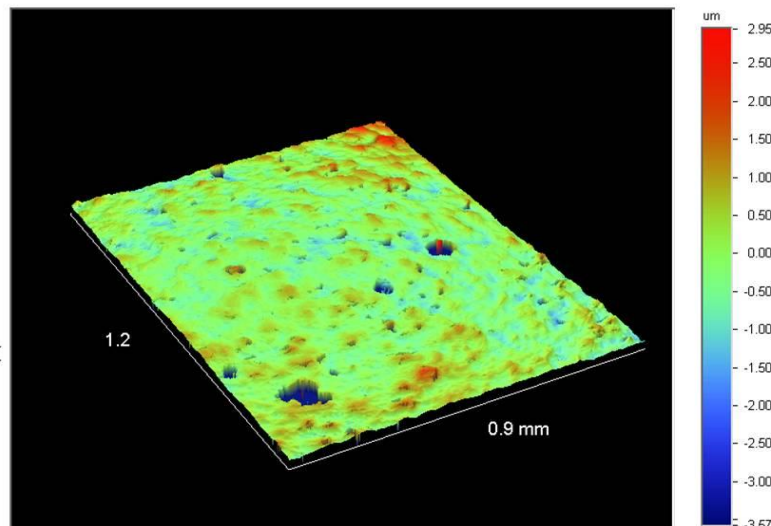
Measurement Info:

Magnification: 4.97

Measurement Mode: VSI

Sampling: 1.69 um

Array Size: 736 X 480



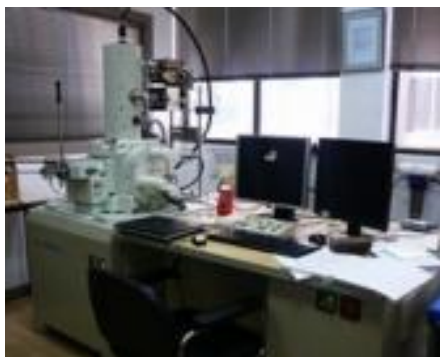
Title:

Note:

Fig. 35 3D PLA/PEG 95/5. Ho omparem amb les dues mostres anteriors i deduïm que l'absència de G5 redueix molt l'alçada dels punts màxims, encara que amb el polietilenglicol s'obté una mica de rugositat al llarg de tota la seva extensió.

7.2 Microscopi electrònic

El microscopi electrònic ens permet desenvolupar una tècnica de rastreig, en anglès anomenat *scanning electron microscopy* (SEM), que ens fa accedir a l'observació en gran resolució i qualitat de microestructures tant



orgàniques com inorgàniques. A partir d'una càmera que es troba a l'interior de la màquina, s'obtenen imatges en 3D a diferents escales i des de diferents perspectives que analitzen la morfologia, el control de possibles deterioraments, la composició i més identifications de la superfície de materials nanomètrics.

Fig. 36 Microscopi electrònic amb dispositius informàtics de la Universitat Politècnica de Catalunya, Facultat d'Enginyeria de biomaterials.

Es basa en un feix d'electrons que impacten contra la mostra que es vol caracteritzar refractant i convertint-se en electrons secundaris i raigs X. Els primers estudien la morfologia externa i els segons la composició química de materials com ara polímers, ceràmiques, metalls, etc. Malgrat que l'espècimen ha de ser conductor de l'electricitat, aquest pot ser recobert per una capa d'or o carbó que li proporciona la conductivitat perquè es produeixi càrrega elèctrica i els electrons puguin focalitzar les imatges.

S'emeten des d'un canó electrònic que té la capacitat mòbil per a "rastrear" qualsevol àrea de l'estructura des del qual prolunga un filament de tungstè que s'escalfa. Gràcies a un sistema de buit que afavoreix al desplaçament dels electrons i a l'esterilització, les tres o quatre lents electromagnètiques poden captar les seqüències microscòpiques.

A continuació s'ofereixen els resultats de les imatges obtingudes pel microscopi electrònic de rastreig del *scaffold*. Podem observar i comparar les clares diferències entre la composició de material polimèric format per vidre G5 o per PLA i PEG únicament.

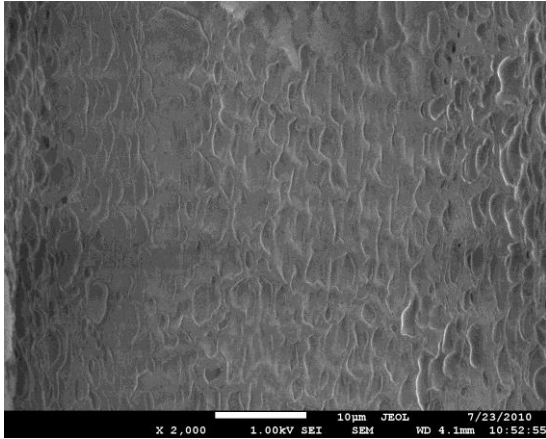


Fig. 37 PLA/PEG 2.000X

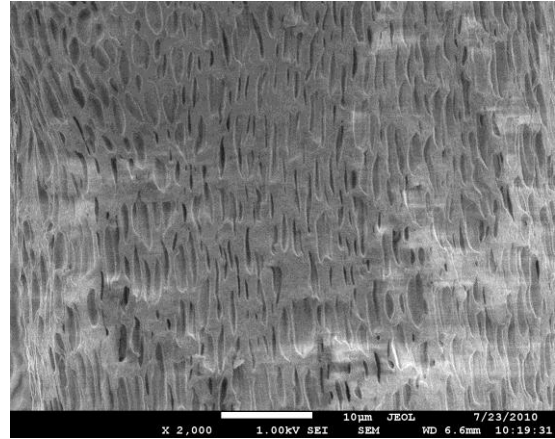


Fig. 38 PLA/PEG/G5 2.000X

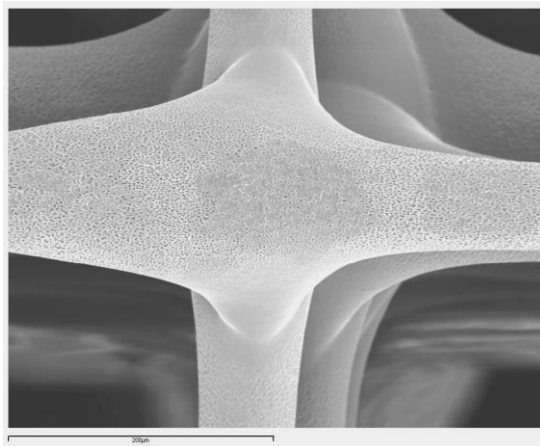


Fig. 39 PLA/PEG 300X

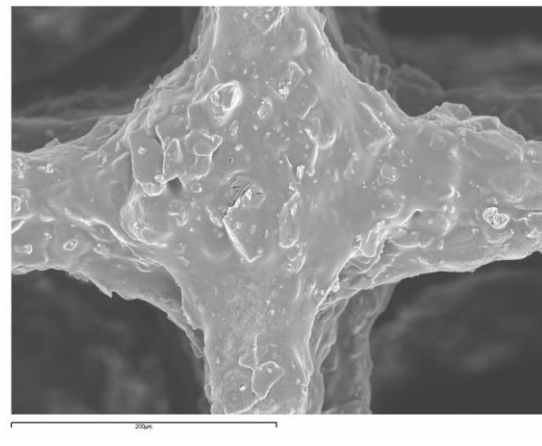


Fig. 40 PLA/PEG/G5 300X

A les primeres fotografies, es pot apreciar més detalladament l'interior o composició del material fabricat. En canvi, a les Fig. 39 i 40, com que hem reduït el nombre d'augments (de 2.000 a 300), es veu la creu formada per la superposició dels eixos quan utilitzàvem la màquina de prototipat ràpid.

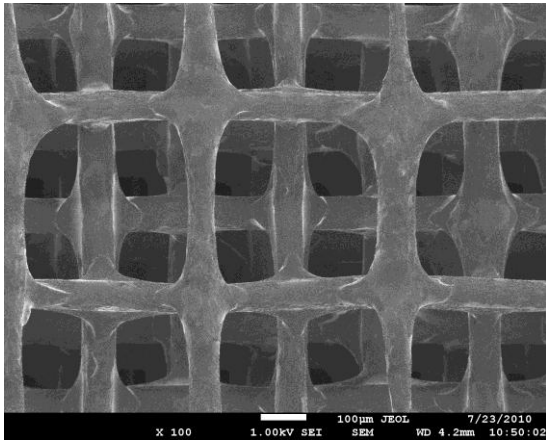


Fig. 41 PLA/PEG 100X

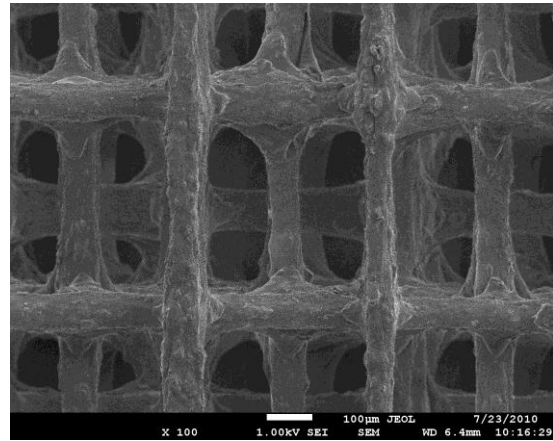


Fig. 42 PLA/PEG/G5 100X

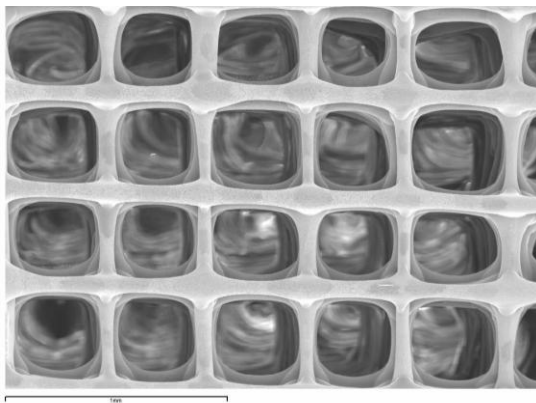


Fig. 43 PLA/PEG 95/5 50X

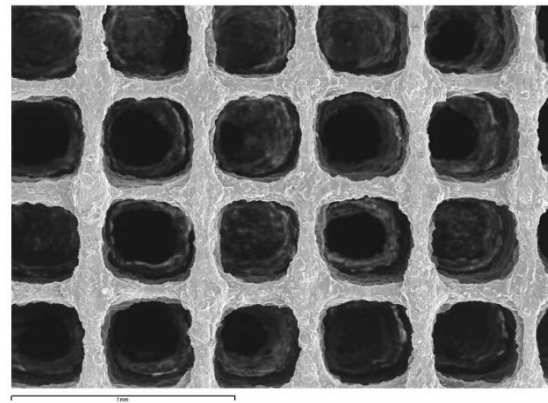


Fig. 44 PLA/PEG/G5 95/5 50X

En aquestes altres, observem des de 100 i 50 augments dos tipus de geometria diferents, on també es demostra que el biovidre aporta consistència i rugositat a la bastida a causa de la seva cristal·linitat.

Seguidament, us mostro una de les coses més interessants que han passat durant la investigació d'aquest treball. El professor i jo vam descobrir una mica per casualitat, "serendípi", una altra manera de presentar la bastida. El fet es va produir sol a partir que nosaltres, en comptes de deixar la mostra en una base de fosfat de calci, la deixéssim en absència d'aquest. Llavors al dia següent vam trobar que s'havia doblegat formant un cilindre.

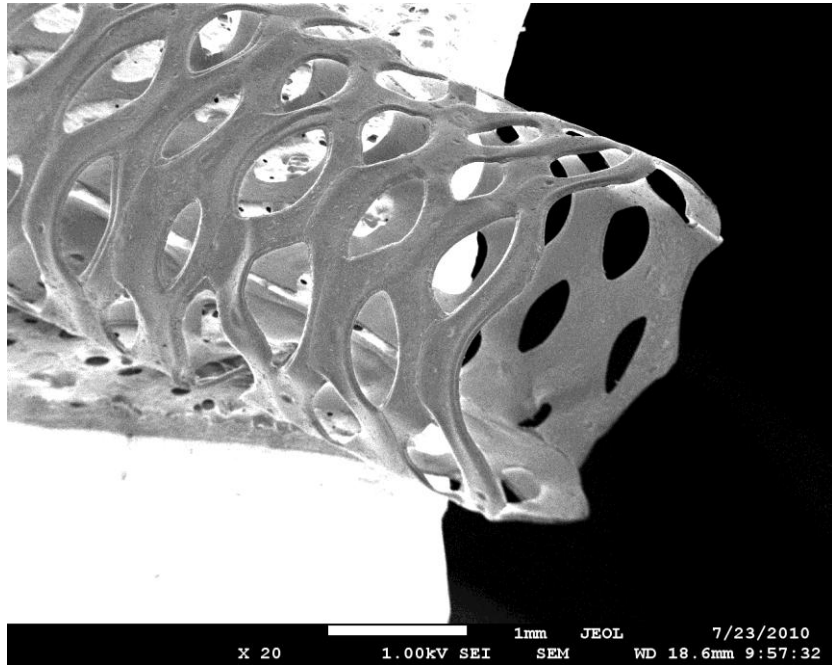


Fig. 45 PLA/PEG/G5 20X

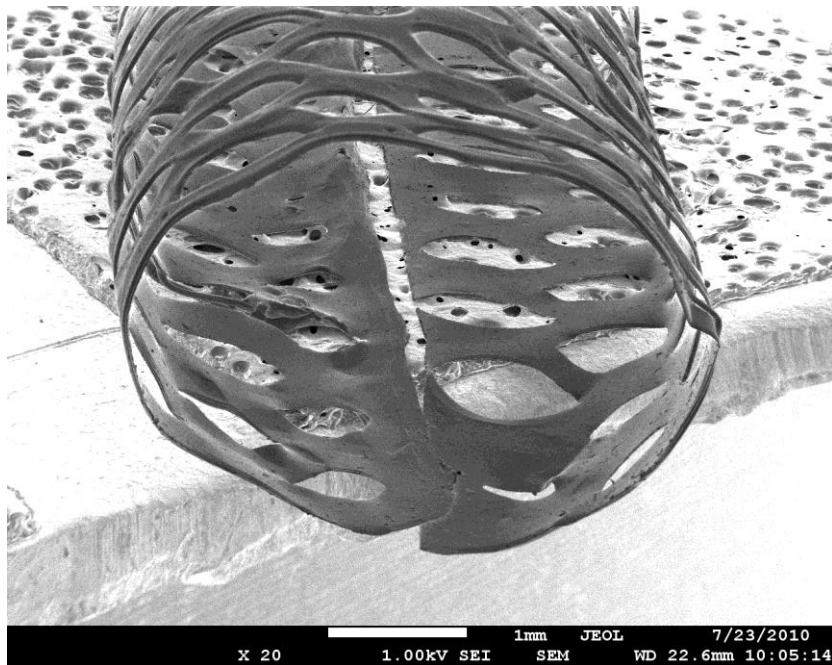


Fig. 46 PLA/PEG/G5 20X

8. Conclusió

Com que la regeneració òssia amb biomaterials està encara amb els seus primers passos de la investigació, no s'ha pogut donar resultats ni conclusions gaire exactes. Segons els científics que estan actualment treballant amb això, esperen aplicar-ho a animals d'aquí a dos anys i, si tot va bé, posteriorment a persones.

La meva opinió és que aquest nou tractament té moltes possibilitats de ser eficaç en un futur i beneficiar a un ampli nombre de malalts; és un gran avenç per la biomedicina i la nanociència.

Per a mi, ha sigut tot un plaer treballar amb professionals i aprendre moltíssim. No pensava que seria tant interessant aquest tema, però m'ho he passat molt bé fent tot això. No només és una experiència acadèmica, sinó també personal. Sempre dic que tota la informació apresada és útil, m'entusiasma molt l'aprehensió cada cop de més aspectes. He après tant, que no podria esmentar-ho tot; treballar en equip, descobrir com és la vida dels científics, posar-me en la pell de persones que pateixen aquest tipus de malalties, redactar un treball tan complex, entendre les inquietuds, tenir cura de les mostres amb minucioses mesures, fer pràctiques experimentals i manipular instruments com una veritable científica, sentir l'alegria d'un nou descobriment... Cada cop em convenço més que el meu futur és la investigació científica.

9. Bibliografia

9.1 Llibres

DRAKE, Richard L., VOGL, Wayne i MITCHELL, Adam W. M. *Anatomy for students*. Editorial: Gray. Madrid (2007)

BHAT, Sujata V. *Biomaterials*. Editorial: Springer Netherlands. New Delhi (2002)

TSIARAS, Alexander. *El cuerpo humano*. Editorial: Paidotribo. Badalona (2010)

Gaete, W. *Materia y materiales*. UAB, Institut de Ciències de l'Educació (2001)

SMITH, William F. i HASHEMI Javad. *Foundations of materials science and engineering*. 4a ed. McGraw-Hill. México (2004)

9.2 Pàgines web

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/bonediseases.html>

http://www.pcb.ub.cat/homePCB/docs/pdf/activitats/Recerca%20en%20Directe/fira2010/Poster_IBEC.pdf

<http://kidshealth.org/parent/general/bodybasics/bonesmusclesjoints.html>

<http://www.nature.com/mt/journal/v15/n9/full/6300218a.html>

http://www.musc.edu/bioengineering/regenerative/html/bone_regeneration.html

<http://www.sciencedaily.com/releases/2007/03/070330100820.htm>

10. Agraïments

Abans de concloure amb aquesta experiència, m'agradaria agrair a unes persones molt importants, tot el treball que han fet per mi, l'ajuda que m'han ofert i la disponibilitat que sempre han mostrat.

En primer lloc, voldria donar les gràcies als meus tutors del treball de recerca, per tot l'aprenentatge, ajuda i confiança que han dipositat en mi. Han estat al meu costat en tot moment per si necessitava qualsevol cosa i m'han resolt aquells dubtes que rondaven pel meu cap. Us agraeixo la vostra gran col·laboració i ajuda que ha fet possible aquest treball de recerca. Tot el que preguntava i demanava, em responíeu amb gran entusiasme, gràcies per la vostra simpatia i amabilitat.

En segon lloc, a les professores de Biologia per preocupar-se en un primer moment del tema del meu treball de recerca i intentar orientar-me. Gràcies per buscar les millors ofertes de les Universitats que em podien agradar. Encara que no hàgiu participat en aquest treball, us agraeixo molt el vostre interès.

I, per últim, a les institucions del Parc Científic de Barcelona, la Universitat de Barcelona i la Universitat Politècnica de Catalunya per posar a la meva disposició laboratoris, maquinària i professionals com en Tiziano. PCB, gràcies per donar-me l'oportunitat de treballar amb vosaltres i acceptar-me al Programa de Recerca a Secundària.

Moltes gràcies a tots!