



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

**SISTEMES DE MONITORATGE PER A CULTIUS DE CÈL·LULES
ANIMALS ADHERENTS**

DESENVOLUPAMENT I APLICACIONS EM MODELS CEL·LULARS I TISSULARS

Programa de doctorat en Biotecnologia.
Departament d'Enginyeria Química.

ENRIC SARRÓ CASANOVAS

Bellaterra, juliol 2009

AGRAÏMENTS

Primer de tot, vull donar gràcies al Jordi Cairó i al Quico Gòdia, així com al Ramon Bragós, al ser ells qui m'han donat la oportunitat de realitzar la meva tesi al seu grup de treball i poder treballar dins un sector de la biotecnologia tant necessari i de tanta importància com el cultiu de cèl·lules animals i les seves aplicacions terapèutiques. Considero que he estat bastant afortunat amb tota la gent amb qui he hagut de treballar durant tots aquests anys en el grup de GECiT, tant els que ara no hi són (Martí, Crespo, Juli, Xavi, Sandra, Joan...) com els membres actuals del grup (Gálvez, Erni, Rosi (per a mi ets del grup), Arnau, Quim, Alba, Laura, Peris, Marta, Juan Pablo) amb una menció especial al Soley, amb qui he compartit la majoria de les meves hores al laboratori. A tots vosaltres, gràcies per suportar les meves frases sense final, el meu abús literari amb les paraules *així* i *això* (sort que després de tants anys ja se m'entén, oi?) i, sobretot, al meu humor (anava a posar anglès, però crec que és pitjor... ... és FRIKI). Espero que vosaltres us ho hagueu passat tant bé amb mi com jo amb vosaltres!!!

També vull agrair a tota la gent que ha fet que la meva estada al departament sigui millor, més interessant i, sobretot, més divertida... amb els que hem compartits moments molt especials com inundacions, estius, platges, esports varis, esmorzars o dinars... o simplement una bona estona junts, així com a tots els meus amics de Manresa (Àlex, Ladis, Oller, Llibre, Txell, double towers... tots), que he tingut més abandonats del que m'hagués agradat durant aquests anys que he estat aquí.

Aquests agraïments no estarien complerts, si no tingués un detall amb la meva família (pares, germana, avis, tiets, cosins, sogres i família... tots), els quals estimo molt i, més que deixar-ho escrit en un tros de paper, prefereixo poder anar-vos recordant en persona lo content que estic de formar part d'aquesta família, per tot el que han fet, el que fan i el que faran per mi.

Finalment, no només vull donar gràcies, sinó que dedicar-li aquest treball, a la meva ex-xicota, ex-promesa i actual dona, l'Anna, ja que queda clar que sense la seva influència en la meva vida tot hagués anat bastant diferent (i no em puc pas imaginar res millor que estar al seu costat).

Si veus que m'he descuidat de posar el teu nom en aquests agraïments, no creguis que no penso amb tu, però ja em coneixes... sóc un despistat...

pàgina deixada expressament en blanc

ÍNDIX

RESUM	1
INTRODUCCIÓ	5
1.1 El cultiu de cèl·lules animals	5
1.1.1 Evolució del cultiu in vitro de cèl·lules animals	5
1.1.2 Aplicacions del cultiu de cèl·lules animals	9
1.1.3 Importància del cultiu de cèl·lules animals	11
1.1.4 Característiques del cultiu cel·lular	12
1.1.4.1 Característiques físico-químiques	14
1.1.4.2 Característiques metabòliques	17
1.1.5 Línies cel·lulars	18
1.2 Monitoratge de cultius de cèl·lules animals adherents	23
1.2.1 Monitoratge de la concentració cel·lular	25
1.2.1.1 Cultius de cèl·lules animals en suspensió	27
1.2.1.2 Cultius de cèl·lules animals adherents	28
1.2.1.3 Espectroscòpia d'impedància	29
1.2.2 Monitoratge de l'activitat cel·lular	31
1.3 Enginyeria cel·lular i tissular: la regeneració de teixits	33
1.3.1 Aplicacions, estratègies i bases de l'enginyeria de teixits	35
1.3.1.1 Les cèl·lules	36
1.3.1.2 Estructures de suport o matrius	39
1.3.1.3 Els senyals químics i físics	42
1.4 Plantejament del present treball	43
OBJECTIUS	45
MESURA DE L'ACTIVITAT CEL·LULAR	49
3.1 Introducció a la mesura de la velocitat de consum d'oxigen (OUR)	49
3.2 La base de la mesura de la OUR	50
3.3 El sistema de cultiu cel·lular i monitoratge de l'oxigen dissolt	52
3.3.1 Reproductibilitat del creixement cel·lular	53
3.3.2 Sondes polarogràfiques per a la mesura de l'oxigen dissolt	58
3.4 Mesura de l'OUR en cultius de cèl·lules adherents	60

3.5	Idoneïtat del sistema de mesura de la OUR.....	65
3.6	Problemàtiques de la mesura polarogràfica.....	66
3.7	Bases de la mesura òptica d'oxigen.....	72
3.8	Desenvolupament de la mesura òptica d'oxigen.....	74
3.8.1	Tipus de fluoròfors	75
3.8.2	Mesures d'intensitat en fluorímetres comercials.....	77
3.8.3	Elecció del mètode de detecció.....	84
3.8.4	Mesures de variació de fase en l'equip de mesura	86
3.8.5	Tipus de matrius i protocols de fabricació	91
3.8.6	Estabilitat de la membrana d'etil cel·lulosa en fibra de vidre amb adhesió mitjançant film autoadhesiu i sylgard.....	96
3.8.7	Adhesió de les membranes mitjançant silicones.....	98
3.8.8	Càlcul del rang de concentracions d'oxigen dissolt.....	102
3.8.9	Determinació de la toxicitat de la membrana d'etil cel·lulosa adherida mitjançant la silicona sylgard.....	103
3.9	Seguiment de l'activitat en cultius de cèl·lules animals	104
3.10	La mesura de l'activitat cel·lular	107
MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR: ESPECTROSCÒPIA D'IMPEDÀNCIA		109
4.1.	Introducció a la bioimpedància.....	109
4.2	La membrana cel·lular.....	110
4.3	La bioimpedància	112
4.4	La mesura d'impedància	115
4.4.1	Equip de mesura de la impedància	115
4.4.2	Evolució dels elèctrodes cap a microelèctrodes.....	117
4.4.3	Sistemes de mesura i modelitzacions	118
4.4.4	Configuracions dels microelèctrodes a 2 i 4 fils	121
4.4.5	Influència de les pistes mare.....	125
4.5	Selecció de l'estimador de concentració cel·lular	129
4.6	Optimització de la mesura.....	132
4.6.1	Estabilitat de la mesura	134
4.6.2	Fiabilitat de la mesura	137
4.7	Efectes del sistema de cultiu sobre la mesura d'impedància	139
4.7.1	Efecte de l'agitació del medi de cultiu	139
4.7.2	Efecte del volum de medi de cultiu.....	141

4.8	Caracterització biològica dels microelèctrodes	143
4.8.1	Biocompatibilitat del muntatge de mesura.....	143
4.8.2	Caracterització del creixement sobre els IMEs	149
4.9	Monitoratge de cultius cel·lulars.....	151
4.9.1	Sensibilitat de la mesura d'impedància	152
4.9.2	Seguiment de cultius cel·lulars.....	157
4.9.3	Calibratge de l'estimador de concentració	163
4.9.4	Determinació de paràmetres cel·lulars.....	164
4.10	Monitoratge de la morfologia cel·lular	166
4.11	La mesura de la concentració cel·lular.....	177
	APLICACIONS EN CULTIUS CEL·LULARS.....	179
5.1	Caracterització del creixement cel·lular.....	179
5.1.1	Mesures fora de línia.....	180
5.1.2	Monitoratge de la OUR.....	183
5.1.3	Introducció al monitoratge del pH.....	184
5.1.4	Seguiment òptic del pH	189
5.1.5	Monitoratge del pH.....	192
5.2	Caracterització d'efectes citotòxics en cultius	200
5.2.1	Determinació de les concentracions de neomicina de treball.....	200
5.2.2	Mesures fora de línia.....	202
5.2.3	Monitoratge del pH.....	204
5.3	Caracterització creixement sobre microsuports	208
5.3.1	Mesures fora de línia.....	210
5.3.2	Monitoratge del pH.....	212
5.4	Anàlisi de la mesura de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules vero	217
	APLICACIONS EN TERÀPIES TISSULARS.....	219
6.1	Problemàtica terapèutica.....	219
6.1.1	Font cel·lular	220
6.1.2	Estímul físics i químics	221
6.1.3	Entorn tridimensional: polímers.....	222
6.2	Enginyeria tissular per a la regeneració condrocitària.....	222
6.2.1	Expansió de la font cel·lular	224
6.2.2	Estímul químics: medi de diferenciació	231
6.2.2.1	Mesura de la concentració cel·lular i estudi metabòlic	232

6.2.2.2	Estudi genètic i morfològic	236
6.2.3	Entorn tridimensional: polímers	243
6.2.3.1	Mesura de la concentració cel·lular i estudi metabòlic	248
6.2.3.2	Estudi genètic i morfològic	254
6.3	Enginyeria tissular per a la regeneració cardíaca	261
6.3.1	Expansió de la font cel·lular	262
6.3.2	Estímul químic: medi de diferenciació	270
6.3.2.1	Mesura de la concentració cel·lular i estudi metabòlic	271
6.3.2.2	Estudi genètic i morfològic	274
6.3.3	Entorn tridimensional: polímers	280
6.3.3.1	Mesura de la concentració cel·lular i estudi metabòlic	283
6.3.3.2	Estudi genètic i morfològic	287
6.4	Anàlisi del sistema de monitoratge en línia en cultius tissulars	294
	CONCLUSIONS	297
	MATERIALS I MÈTODES	301
8.1	Línies cel·lulars	301
8.1.1	Cèl·lules vero	301
8.1.2	Cèl·lules mare mesenquimals d'ovella	302
8.1.3	Cèl·lules mare mesenquimals humanes	302
8.1.4	Hibridoma	302
8.2	Manteniment de les línies cel·lulars	302
8.2.1	Congelació	303
8.2.2	Descongelació	304
8.2.3	Manteniment de les línies cel·lulars en cultiu	305
8.2.3.1	Desadheriment de cultius de cèl·lules animals adherents	306
8.2.4	Control de l'esterilitat dels cultius cel·lulars	306
8.3	Medis de cultiu	307
8.3.1	Medi base pel cultiu de cèl·lules vero	307
8.3.2	Medi base pel cultiu de cèl·lules mesenquimals d'ovella	308
8.3.3	Medi base pel cultiu de cèl·lules mesenquimals humanes	308
8.3.4	El sèrum, suplement de medis de cultiu per cèl·lules animals	308
8.3.5	Medi de diferenciació condrogènica	310
8.3.6	Medi de diferenciació cardíaca	310
8.4	Sistemes de cultiu de cèl·lules animals	311

8.4.1	Sistemes comercials de cultiu estàtic.....	311
8.4.2	Sistemes de cultiu dinàmic: minibioreactors.....	312
8.4.3	Equip de monitoratge i control del cultiu: Hexascreen.....	313
8.4.3.1	Condicions d'ús estàndard	314
8.5	Equips de mesura	315
8.5.1	Equip de mesura d'oxigen dissolt per desmodulació coherent.....	315
8.5.2	Equip de mesura de la impedància	315
8.5.2.1	Condicions d'ús estàndard	315
8.5.3	Equip d'estimulació elèctrica	316
8.5.3.1	Elèctrodes de platí	316
8.5.3.2	Condicions d'ús estàndard: proves de funcionalitat	316
8.5.4	Equip d'estimulació mecànica	318
8.6	Mètodes analítics	319
8.6.1	Anàlisi de la concentració cel·lular	319
8.6.1.1	Recompte directe	319
8.6.1.2	Recompte per exclusió nuclear	320
8.6.2	Anàlisi enzimàtic de la glucosa i lactat	321
8.6.3	Anàlisi genètic i histològic	321
8.6.3.1	Purificació i quantificació del RNA total	322
8.6.3.2	La RT-PCR.....	324
8.6.3.3	Histologia de Safranina O	326
8.6.3.4	Immuno-histoquímica per Col·lagen tipus II	326
8.7	Mesures i protocols	327
8.7.1	Mesura de la velocitat de consum d'oxigen: La OUR.....	327
8.7.1.1	Calibrat de la mesura d'oxigen dissolt.....	328
8.7.1.2	Mesura de la constant de desorció	328
8.7.1.3	Mesura de la OUR	328
8.7.2	Mesures fora de línia: creixements paral·lels	330
8.7.3	Tractaments d'activació de la superfície de cultiu	331
8.7.3.1	Activació química	331
8.7.3.2	Activació per plasma	331
8.7.4	Protocol d'inclusió dels fluoròfors en membranes	331
8.7.4.1	Protocol d'inclusió del $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$	332
8.7.4.2	Protocol d'inclusió del $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$	332

8.7.4.3	Protocol d'inclusió del PdOEp	332
8.7.4.4	Protocol d'inclusió de la Camphorquinone	332
8.7.5	Adhesió de la silicona sylgard: optimització del temps de resposta	333
8.7.6	Muntatge dels microelèctrodes en sistemes de cultiu	337
8.7.7	Fabricació de matrius de PLGA	338
8.7.8	Fabricació de matrius de fibrina	339
8.7.8.1	Disgregació dels polímers de fibrina	339
8.8	Càlculs	340
8.8.1	Velocitat màxima de creixement i temps de duplicació	340
8.8.2	Velocitats específiques de consum i producció de metabòlits.....	342
8.8.3	Propietats mecàniques dels polímers.....	343
BIBLIOGRAFIA		345

ABREVIATURES

[X]	concentració cel·lular
Z	mòdul de la impedància
A	ampers
A, C, G, T	adenina, citosina, guanina i tiamina
ASC	cèl·lules mare adultes
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
C	capacitat
Cc	concentració cel·lular
cèl·l.	cèl·lules
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
d	dies
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	àcid deoxiribonucleic
DO	densitat òptica
$\Delta X, \Delta pH$	variació de concentració cel·lular, variació de pH
ε	permitivitat
E_2	estimador de concentració cel·lular
EC	<i>Ethyl cellulose</i>
EDTA	àcid etilendiamintetraacètic
ESC	cèl·lules mare embrioniques
F	fluorescència
ϕ	fase
f, ω	freqüència
FBS	serum fetal boví
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
f_0, ω_c	freqüència central
FW, RV	<i>forward, reverse</i>
GAGs	glucosaminoglicans
Gy	gray, unitat d'absorció de radiació
h	hores
HC, LC	<i>high current, low current</i>
HF, BF	alta freqüència, baixa freqüència
hMSC	cèl·lules mare mesenquimals humanes
HP, LP	<i>high potential, low potential</i>
Hz	hertz
I	intensitat
I+D	investigació i desenvolupament
ICV	integral de cèl·lules viables
IME	microelèctrodes interdigitats
ITS	<i>bobine insulin, human transferrin, and sodium selenite</i>
K_{des}	constant de desorció

$k_L a$	coeficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen
λ	longitud d'ona
L	longitud
LED	<i>light emission diode</i>
$\lambda_{Em.}$	longitud d'ona d'emissió
$\lambda_{Ex.}$	longitud d'ona d'excitació
lpm	litres per minut
M	molar
$\mu_{m\acute{a}x.}$	velocitat màxima de creixement
MCIC	medi complet d'inducció cardíaca
MEMG	<i>Glasgow Modified Eagle Medium</i>
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MSC	cèl·lules mare mesenquimals
N	Newtons
oMSC	cèl·lules mare mesenquimals d'ovella
OUR	velocitat de consum d'oxigen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PLGA	poli-L-lactic-co-glicolic
PVC	<i>Poly vinyl cholride</i>
pw	amplada de l'ona
q	velocitat de consum o producció
R	resistència (ohms)
R^2	coeficient de correlació
RNA	àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
RT-PCR	reverse transcriptase - polymerase chain reaction
S	siemens
τ	temps de vida dels fluoròfors
t_{dup}	temps de duplicació
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
u. l.	unitats d'intensitat
V	voltatge (volts)
Ω	ohms
Z	impedància
σ	desviació estàndard

pàgina deixada expressament en blanc

CAPÍTOL 0

RESUM

El cultiu de cèl·lules animals és una tecnologia que disposa d'un gran potencial econòmic i social, cada cop més elevat, que es troba enfocat al descobriment, desenvolupament i ús de nous productes biotecnològics. Aquest creixement exponencial de la tecnologia del cultiu de cèl·lules animals és conseqüència de la pròpia importància de les aplicacions en les que es troben relacionats aquests productes, sobresortint-ne quatre grans categories: les teràpies víriques, les teràpies bioquímiques i biofarmacèutiques, les teràpies gèniques i les teràpies cel·lulars i tissulars, amb aquesta última adquirint cada cop més importància dins el cultiu de cèl·lules animals.

Degut a la major complexitat del cultiu de cèl·lules animals i a les limitacions que presenten envers els cultius de cèl·lules procariotes per a l'obtenció d'elevades concentracions cel·lulars, és necessari dotar el cultiu de cèl·lules animals de tecnologies que permetin optimitzar-ne la seva expansió cel·lular i, per tant, que permetin l'obtenció de quantitats elevades de producte (o la dosi necessària en teràpies cel·lulars i tissulars). La mancança d'aquestes tecnologies, així com la poca fiabilitat de les existents, ha comportat la suboptimització de la majoria dels processos de cultius de cèl·lules animals, que s'han basat en estratègies de cultiu simples (processos en discontinu) que limiten fortament les concentracions finals obtingudes (cel·lulars i de producte). Així doncs, per tal d'optimitzar els cultius de cèl·lules animals, cal disposar de sistemes de monitoratge i control en línia dels diferents paràmetres del cultiu.

Un dels paràmetres clau en un cultiu de cèl·lules és la mesura de la concentració cel·lular, essent la màxima concentració cel·lular un dels objectius primordials dels cultius cel·lulars, a la fi de poder obtenir una màxima productivitat, però alhora, permetent el càlcul d'altres paràmetres importants, com la velocitat

de creixement, la velocitat de producció específica de productes i els rendiments d'utilització de substrat entre altres, essent paràmetres molt útils per a l'optimització de processos i disseny d'estratègies eficients pel control del cultiu. Això fa que, qualsevol intent d'avançar en el control en línia dels bioreactors passi per a poder mesurar en línia la corresponent concentració cel·lular. No és estrany, doncs, que aquest paràmetre es consideri com el més important a monitorar en aquest tipus de processos.

Si una de les problemàtiques dels cultius de cèl·lules animals és que no arriben a concentracions cel·lulars gaire elevades, en el cas del creixement de cèl·lules animals adherents encara se li ha de sumar la limitació a causa de la necessitat de disposar de superfície lliure pel creixement cel·lular, així com la corresponent inhibició del creixement per contacte. Aquests fets fan que els cultius de cèl·lules adherents arribin a concentracions cel·lulars més baixes que les aconseguides en cultius de cèl·lules animals en suspensió i, per tant, fa que la majoria dels productes biotecnològics es produeixin a partir de cèl·lules que creixen en suspensió. Tot i això, cada cop existeix un ventall de productes més extens produït exclusivament per cèl·lules adherents, que no s'han pogut adaptar amb èxit cap a un cultiu en suspensió com, per exemple, quan el producte són les pròpies cèl·lules adherents, o quan es tracta d'un producte viral o proteic que necessita dels tipus concrets de cèl·lules animals adherents. Aquest augment, juntament amb es tecnologies emergents de les cèl·lules mare i l'enginyeria tissular, on la majoria dels llinatges cel·lulars resultants són adherents, fan que la importància d'aquests cultius de cèl·lules adherents hagi augmentat considerablement en els últims anys.

La problemàtica però, recau en que moltes de les tecnologies que es troben desenvolupades actualment s'han anat focalitzant cap als cultius de cèl·lules animals en suspensió, mentre que els cultius de cèl·lules animals adherents es deixaven a banda. Per tant, el fet que aquestes cèl·lules es trobin adherides formant una monocapa a la superfície del sistema de cultiu i no es trobin en suspensió, implica que les actuals metodologies i sensors comercials utilitzats pel seguiment de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules no adherents i que gaudeixen d'una bona sensibilitat, no siguin aplicables per a aquest tipus de cultius cel·lulars, mentre que les poques tecnologies actuals que s'utilitzen pel monitoratge de cultius de cèl·lules adherents, impliquen la utilització de mètodes destructius i fora de línia, obligant a la utilització de diversos cultius en paral·lel per a poder obtenir més d'un valor de concentració cel·lular al llarg d'un creixement cel·lular, amb la variabilitat que això significa. Això fa que aquest augment considerable de la importància del cultiu de cèl·lules adherents vingui acompanyat per una necessitat creixent del desenvolupament tecnologies dirigides a les cèl·lules animals adherents que en permeti l'optimització dels seus cultius. Així doncs, en aquest treball s'ha abordat aquesta problemàtica, amb l'objectiu de desenvolupar i implementar unes tecnologies que permetin el seguiment, en línia, de la concentració

cel·lular, ja sigui de forma directa o bé de forma indirecta, mitjançant la seva estimació a partir de la mesura de l'activitat cel·lular, i que pugui abraçar l'ampli ventall de línies cel·lulars existents que creixen en adherència i que disposen de característiques cel·lulars diferents (consums de nutrients, concentracions cel·lulars, necessitats de medis de cultiu...).

L'estructura d'aquesta memòria comença amb una introducció (capítol 1), on es revisa la importància dels cultius de cèl·lules animals en Biotecnologia, les seves característiques i principals aplicacions, tot fent un èmfasi especial al cultiu de cèl·lules adherents. A més, també es fa una revisió dels diferents mètodes pel monitoratge, tant de la concentració cel·lular com de l'activitat cel·lular, en cultius de cèl·lules animals, descrivint-ne els avantatges i inconvenients, així com si és possible la seva implementació per cultius de cèl·lules animals adherents. Finalment a la mateixa introducció, s'aprofundeix una mica més en les teràpies cel·lulars i tissulars (enginyeria tissular), revisant-ne la seva importància, aplicacions i cada un dels tres principals components del que es troba format (cèl·lules, estructures de suport i senyals químics i físics). Seguidament (capítol 2), es plantegen els principals objectius del treball. Començant amb els resultats obtinguts, al capítol 3 es procedeix a l'adaptació del sistema de cultiu en minibioreactors per cultius de cèl·lules animals adherents, així com l'adaptació de la mesura de l'activitat cel·lular a partir de la mesura de la OUR i la corresponent evolució de les mesures polarogràfiques cap a mesures òptiques. Al capítol 4, es continua amb el desenvolupament i implementació d'una mesura en línia de la concentració cel·lular basada en l'espectroscòpia d'impedància per cultius de cèl·lules animals adherents, finalitzant amb un estudi de l'ús del sistema desenvolupat pel monitoratge en línia de la morfologia cel·lular. A continuació, al capítol 5, es comprova i s'optimitza el funcionament de les mesures desenvolupades per a l'obtenció dels paràmetres cel·lulars bàsics en aplicacions de teràpies cel·lulars. Finalment pel que fa a resultats (capítol 6), s'implementen les mesures desenvolupades en unes altres aplicacions terapèutiques amb una gran importància, la teràpia tissular. En el capítol 7 s'exposen les principals conclusions extretes del treball. Després de les conclusions (capítol 8) es presenten els materials i mètodes emprats al llarg del treball.

CAPÍTOL 1

INTRODUCCIÓ

1.1 EL CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS

1.1.1 EVOLUCIÓ DEL CULTIU *IN VITRO* DE CÈL·LULES ANIMALS

El cultiu de cèl·lules animals començà a desenvolupar-se a finals del segle XIX i ha donat els seus fruits al llarg del segle XX, amb tota una sèrie de fites que es descriuran de forma breu, però que són molt importants per entendre el desenvolupament d'aquesta disciplina i la seva aplicació industrial.

Al 1878 C. Bernard demostrà que el sistema fisiològic d'un organisme podia ser mantingut com un sistema viu després de la mort de l'organisme. Al 1885 W. Roux va concloure que el procés de creixement específic, observat en el manteniment d'una porció d'embrió de pollastre en solució fisiològica calenta, ocorre independentment de les altres parts de l'embrió. La prolífica recerca d'en R. Harrison (1907), considerat per alguns autors com el pare del cultiu cel·lular, el va portar a fets tan interessants com els que se citen a continuació: va mantenir durant algunes setmanes fragments neurals de la cresta d'embrions de granota; va observar el creixement de fibres nervioses *in vitro*; va utilitzar una gota de limfa coagulada de granota com a medi pel creixement cel·lular; va escollir granotes com a font de teixit, ja que és un animal de sang freda i així la incubació a una temperatura concreta no era necessària.

Al 1910, Burrows va ser el primer investigador en demostrar dos fets importants: cultivar amb èxit cèl·lules embrionàries de pollastre en coàguls de plasma durant llargs temps i l'observació detallada de la mitosi cel·lular. Durant el 1911, Lewis i Lewis observaren el creixement limitat en monocapes amb el primer medi

líquid, que consistia en aigua de mar, sèrum, extracte embrionari, peptones i sals. Al 1916, Rous i Jones varen utilitzar per primera vegada l'enzim proteolític tripsina per resuspendre en cultiu cèl·lules adherents. Entre 1923 i 1931, Carrel i Baker varen enfocar la seva recerca al desenvolupament de tècniques d'escalat per a cultius cel·lulars i de recipients de cultiu: els *T-Flasks*. També realitzaren l'avaluació microscòpica de cèl·lules en cultiu. Al 1927, Carrel i Rivera produeixen la primera vacuna viral: Vaccinia. Uns anys més tard, al 1933, Gey desenvolupà la tècnica de cultiu en tubs rotatoris. Un dibuix d'aquest primer aparell utilitzat per Gey es pot observar a la figura 1.1.

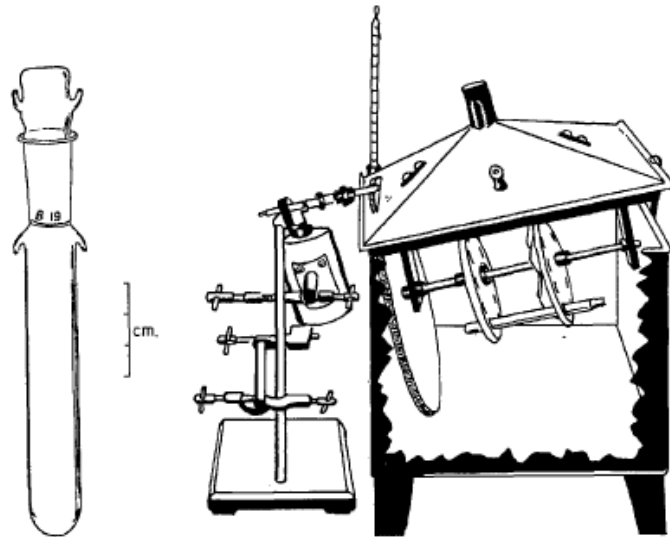


Figura 1.1 Dibuix de l'aparell pel cultiu en tubs rotatoris desenvolupat per Gey. Constava dels tubs de cultiu (esquerra) i de l'aparell rotatori (dreta). Aquest aparell es basava en dues plaques perforades a les que es col·locaven els tubs de cultiu fixats paral·lela i equidistantment mitjançant arandela de goma i les quals giraven, inclinades uns 15°, a 6 voltes per minut regulat amb un motor i uns engranatges simples. (Medawar·1948)

El medi químicament definit CMRL 1066 (Healy i C.·1961), medi format per una font de carboni juntament amb un conjunt de sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines, va ser desenvolupat per Fischer al 1948 i encara ara és utilitzat en els estudis de virologia i citologia. Al 1949, es va fer créixer el virus de la poliomielitis tant en teixits humans com de simi per tal de produir-ne la vacuna a nivell industrial. Les cèl·lules carcinògenes HeLa (deuen el seu nom a la donant Henrietta Lacks) varen ser aïllades i propagades per Gey i col·laboradors al 1952. En aquest mateix any, Dulbecco desenvolupà una placa d'assaig per a virus animals mitjançant monocapes confluents de cèl·lules cultivades. Al 1954, Abercrombie observà inhibició per contacte: la mobilitat de cèl·lules diploides en cultius en monocapes s'aturava quan el contacte s'efectuava amb cèl·lules adjacents.

En el decurs de 1961, Hatflick i Moorhead demostraren que els fibroblasts humans morien després d'un nombre finit de divisions. Al 1965, es realitzà la primera descripció d'un medi sense sèrum animal per Ham. Al 1975, Köhler i Milstein aconseguiren desenvolupar amb èxit una línia cel·lular d'hibridoma per a la

producció d'anticossos monoclonals, mitjançant la fusió cel·lular d'un mieloma i un limfòcit de tipus B. Amb aquests descobriments la importància dels productes obtinguts a partir de cèl·lules animals va créixer espectacularment donat el seu potencial per a l'obtenció d'un ampli espectre de productes útils en el diagnòstic i tractament de malalties.

Durant tota la dècada dels 70 la recerca s'enfocà cap al desenvolupament de tècniques i protocols experimentals com: els cultius en suspensió, la immobilització i l'encapsulació cel·lular, definició de medis sense sèrum i l'ús d'antibiòtics en aquests, així com el disseny de bioreactors, com ara els *air-lifts* i els de fibres buides (*hollow-fibers*) per cultivar cèl·lules animals a altes densitats, millorant-se molts aspectes, com ara l'agitació i l'aeració en condicions de mínim estrès cel·lular.

A la dècada dels anys vuitanta es produeix un canvi enormement significatiu en el món de la Biotecnologia. L'aparició de les tècniques del DNA recombinant va permetre la introducció de gens que codificaven proteïnes animals d'interès en el material genètic de qualsevol microorganisme, per tal d'expressar-los i obtenir quantitats importants de la proteïna desitjada. D'aquesta manera és possible transferir rutinàriament gens humans a organismes unicel·lulars com bacteris o llevats. Alguns exemples de proteïnes humanes d'ús terapèutic obtingudes per tècniques de DNA recombinant són: la insulina, la somatotropina o hormona del creixement, els antígens virals i els interferons. Aquestes proteïnes recombinants s'han introduït, bàsicament, en el material genètic del bacteri *Escherichia coli* (Werner·1993).

A partir dels anys 80-90, el desenvolupament de sistemes de cultius per millorar el seu rendiment, el creixent èmfasi en la producció d'anticossos monoclonals o el desenvolupament d'alguns productes de cultiu cel·lular a partir de tècniques del DNA recombinant, han permès el creixement d'aquest camp, obtenint com a resultat varis productes biotecnològics que ja han estat desenvolupats i explotats a nivell comercial amb molt d'èxit.

Actualment, aquesta tecnologia es troba totalment consolidada i està dotada amb un gran potencial econòmic i social cada cop més pronunciat, que es troba enfocat al descobriment i desenvolupament de nous productes biotecnològics, tal i com es pot observar la figura 1.2, on es presenta l'evolució temporal als Estats Units dels ingressos per les vendes d'aquests productes ja explotats a nivell comercial, així com de les inversions en I+D pel descobriment i desenvolupament de nous productes biotecnològics.

Es pot observar un augment exponencial continuat tant per als ingressos per vendes de productes obtinguts a partir de cultius de cèl·lules animals com per a les inversions en I+D, augmentant fins el punt

que les pròpies necessitats creades per a la I+D superen la pròpia capacitat mundial per a la producció de cultius cel·lulars a gran escala (Mallik i col·2002). El comportament exponencial, continua a partir del 2005, tant per a les inversions en I+D amb aproximadament 39,4 bilions de dollars americans invertits als Estats Units (PhRMA·2006), com pels ingressos per vendes, amb un valor estimat de mercat de 40 bilions de dollars pel 2006 (Walsh·2007) i amb previsions de sobrepassar els 70 bilions de dollars a finals de la dècada (Pavlou i Reichert·2004).

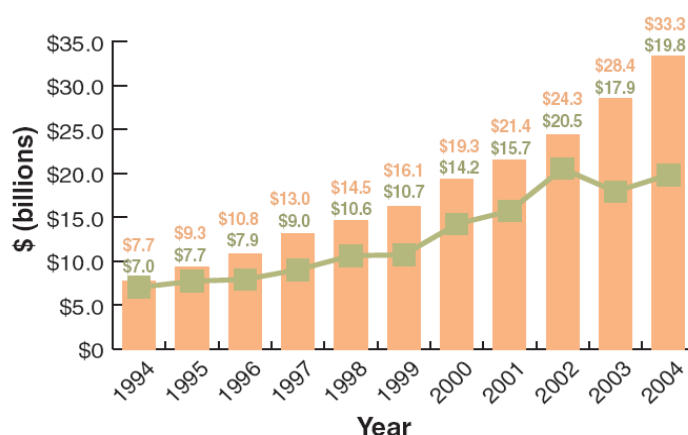


Figura 1.2 Comparació al llarg dels anys entre els bilions de dollars provinents de les vendes dels diferents productes biotecnològics ja comercials (barres i valor superior) i els bilions de dollars destinats a la recerca en I+D de nous productes biotecnològics (línia i valor inferior).(Lawrence·2005)

Aquestes quantitats tant elevades són necessàries degut a que el procés de descobriment i desenvolupament de nous medicaments efectius és un procés llarg, amb un promig entre 10 i 15 anys, difícil, on només s'acaba aprovant un medicament de cada 5.000 composts avaluats, i costós, cap a uns 800 milions de dollars americans de promig per a fer arribar aquest nou medicament des dels laboratoris als pacients (TuftsCenter·2001). L'esquema d'aquest procés es pot observar a la figura 1.3.

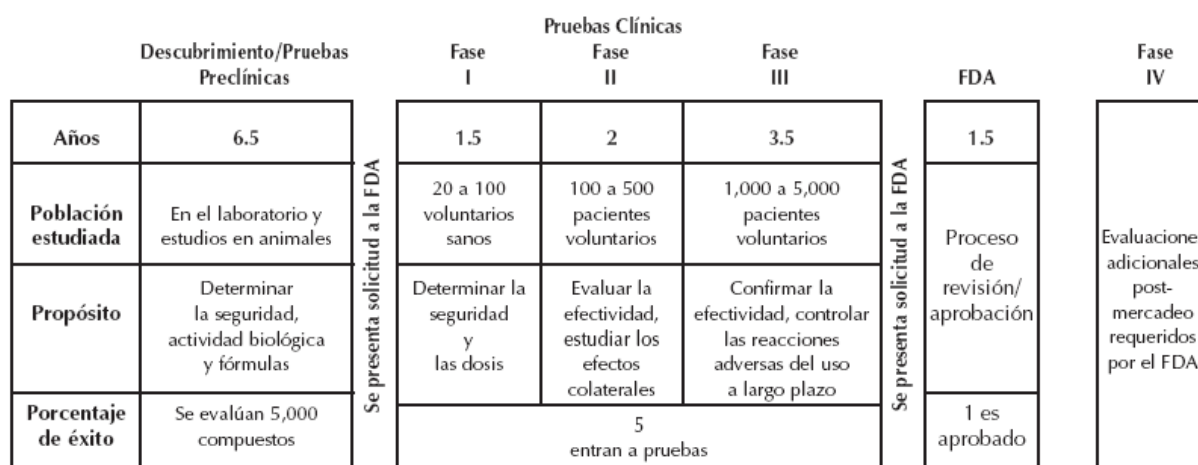


Figura 1.3 Esquema del procés que ha de passar un nou medicament des del seu descobriment fins que finalment surt al mercat. (PhRMA·2006)

Tot i aquests costs tant elevats, més de 600 nous medicaments estan ja en fases clíniques en humans o sota l'estudi de l'Administració d'Aliments i Medicaments (FDA) (PhRMA·2006), i es sumaran als ja més de 165 productes biotecnològics que ja s'han aprovat i que es troben disponibles al mercat (Walsh·2006).

1.1.2 APLICACIONS DEL CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS

Aquest creixement exponencial de la importància i el potencial de la tecnologia del cultiu de cèl·lules animals és la conseqüència de la importància dels productes desenvolupats i de les corresponents aplicacions en les que es troben relacionats. Tot i la gran varietat d'aquests productes, hi ha quatre categories d'aplicacions que apleguen la majoria de l'interès:

- Unes de les primeres aplicacions existents dels cultius de cèl·lules animals s'agrupen dins de la categoria de **teràpies víriques**. Aquestes aplicacions es basen en la replicació de virus en cultius cel·lulars (en substitució dels animals) per a la producció a gran escala de vacunes, tant humanes com veterinàries, però també inclou l'ús dels cultius cel·lulars per a la detecció i l'aïllament de virus, així com la recerca bàsica del sistema víric de creixement i infecció d'organismes. Alguns exemples en són les vacunes de la polio o vacunes per a les malalties de Marek i Newcastle, entre moltes d'altres.

- La segona categoria, essent la que compta amb més aplicacions productes desenvolupats és la **teràpia bioquímica i biofarmacèutica**, on les aplicacions incloses es basen en la producció a gran escala de cèl·lules que han estat, o no, genèticament modificades per a la producció de proteïnes amb alt valor terapèutic i/o comercial. Dins d'aquesta categoria es troben els anticossos monoclonals pel diagnòstic, per a teràpies i com a tècniques de separació, antigens específics contra tumors, diferents immunoreguladors com interferons i interleuquines, així com factors de creixement, enzims i hormones entre altres.

- Una altra categoria en són les **teràpies gèniques**. Aquestes teràpies, que es basen en l'enginyeria genètica per a la transfecció o la reprogramació de nou material genètic a unes cèl·lules animals emprant un virus o altres vectors com a missatgers, inclouen com a aplicacions l'extracció de cèl·lules d'un pacient amb un gen desaparegut o malmès per a la substitució d'aquest gen, amb la posterior reinserció al pacient de les cèl·lules cultivades i reparades, o bé del propi vector al pacient. Aquesta teràpia s'observa com a possible solució en el tractament de malalties tant importants com el càncer o la SIDA.

- La quarta categoria amb un elevat interès és la **teràpia cel·lular i tissular**. Aquesta teràpia es basa en la producció a gran escala de les pròpies cèl·lules animals, en aplicacions per a l'estudi dels efectes de noves drogues i composts sobre la viabilitat i creixement de cultius cel·lulars molt importants per a la

recerca sobre càncers. A més a més també inclou procediments d'aïllament, expansió amb la posterior reintroducció de les pròpies cèl·lules d'un pacient per abordar aquelles malalties que requereixen la regeneració de cèl·lules danyades en el pacient, així com l'ús d'aquestes cèl·lules per a la substitució de teixits i òrgans, més conegut com a enginyeria tissular, amb la pell artificial pel tractament de cremades i úlceres com a primer producte comercial disponible (any 1998), però amb molts d'altres en procés de desenvolupament.

- Finalment, també hi ha altres aplicacions que poden no tenir les mateixes repercussions que les anteriors, com podrien ser la seva utilització com a model d'estudi de la biologia i bioquímica bàsica, l'extracció i cultiu de cèl·lules fetals per a al diagnòstic de possibles anomalies, assaigs cel·lulars per a la realització de tests toxicològics o la realització d'escandalls de substàncies amb potencial per a ser utilitzades com a drogues en la recerca contra càncers, entre altres aplicacions.

La importància de totes aquestes aplicacions es pot observar en la figura 1.4, on es poden observar els nous medicaments en desenvolupament que estan ja en fases clíniques en humans o sota l'estudi de l'Administració d'Aliments i Medicaments (FDA), agrupats en funció de la categoria terapèutica en la que es troben inclosos (esquerra) i en funció de la seva aplicació (dreta).

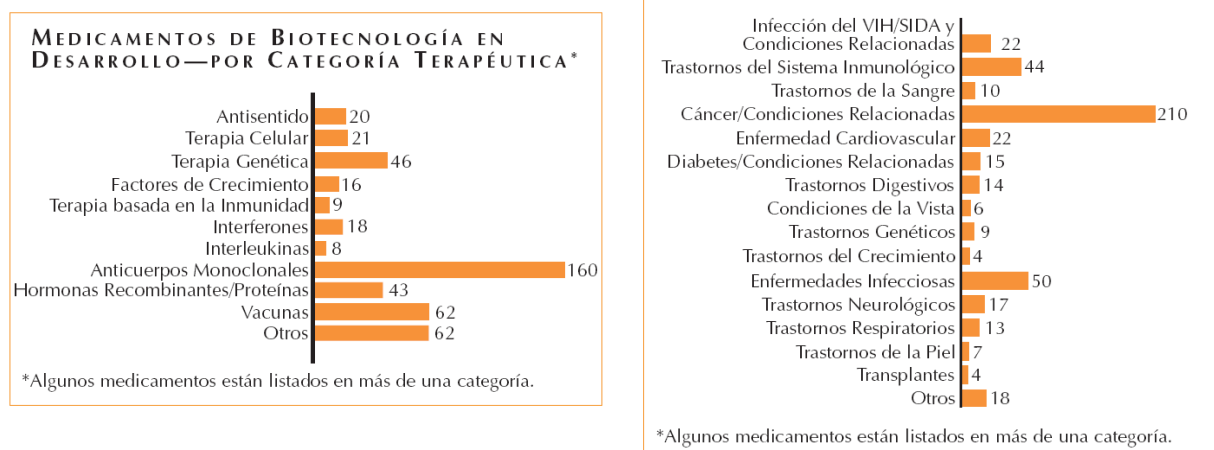


Figura 1.4 Agrupament dels productes biotecnològics en desenvolupament avançat segons la categoria terapèutica (esquerra) i segons l'aplicació (dreta). (PhRMA·2006)

Es pot observar doncs, que tot i que la majoria de productes en desenvolupament estan enfocats a les teràpies bioquímiques i biofarmacèutiques, en les que s'inclou la producció de proteïnes recombinants i nous anticossos monoclonals com a més extenses, tant les teràpies gèniques com les cel·lulars i tissulars, han adquirit ja una importància significativa, incloent un 10% i un 5% respectivament dels productes en

desenvolupament. Aquests són uns valors molt elevats si es té en compte el curt temps de vida del que disposen (entre 10 i 15 anys) i, per tant, la poca quantitat de productes aprovats en la actualitat, arribant la primera teràpia genètica aprovada al novembre de 2003, mentre només es disposa de 4 teràpies tissulars ((Walsh·2006),dades a 2004).

1.1.3 IMPORTÀNCIA DEL CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS

Tot i que la majoria de les biomolècules amb un elevat valor terapèutic són produïdes exclusivament per cèl·lules animals, tal i com s'ha comentat anteriorment, gràcies a la tecnologia de l'ADN recombinant, moltes d'aquestes biomolècules produïdes per cèl·lules animals, poden ésser produïdes mitjançant cultius de cèl·lules procariotes a les que se'ls havia afegit el gen que les codificava, obtenint així una sèrie d'avantatges respecte a les cèl·lules animals a l'hora de produir les proteïnes en cultius cel·lulars. Aquestes avantatges són:

- Millor resistència a les condicions ambientals, com ara l'estrès mecànic, que permeten augmentar la concentració d'oxigen dissolt en el medi i per tant permeten augmentar la concentració cel·lular.
- Medis de cultiu més econòmics i més simples.
- Velocitats de creixement específiques més elevades que comporten una millor productivitat cel·lular.
- Més fiabilitat en evitar contaminació.
- Protocols d'emmagatzematge cel·lular més senzills, obtenint una millor viabilitat cel·lular durant la recuperació posterior.

Tot i que la senzillesa dels cultius de cèl·lules procariotes presenta aquesta sèrie d'avantatges que milloren en gran mesura la productivitat de la proteïna expressada, els cultius de cèl·lules procariotes presenten també, a la vegada, unes problemàtiques que a vegades suposen un esglaió massa important per a poder salvar-lo (Hu i Dodge·1985). La falta, en cèl·lules procariotes, de modificacions post-transduccionals com per exemple fosforilacions, glicosilacions, amidacions, carboxilacions o una baixa capacitat per un plegament tridimensional correcte de la proteïna, dona com a resultat una nova proteïna de característiques fisicoquímiques i funcionals no desitjades.

A més d'aquestes característiques pobres, normalment suficients per a obtenir una activitat final de la proteïna quasi nul·la (Berman i Lasky·1985), s'ha d'afegir que en molts casos les proteïnes es troben formades per diferents subunitats. Aquestes subunitats depenen de l'estructura tridimensional per poder-se unir entre elles i, a més a més, es poden trobar codificades per diferents gens. Finalment, encara que la

proteïna produïda conservés la seva activitat, tant els bacteris com els llevats poden no excretar-la, de manera que es complicaria molt la purificació del producte.

Pel que fa a la legislació vigent, cal tenir en compte que és molt estricta, i cada vegada més, a l'hora de validar aquells productes d'ús terapèutic obtinguts a partir de bacteris i llevats recombinants, ja que aquestes proteïnes poden portar associats components de l'hoste o haver patit lleugeres modificacions respecte la seva conformació nativa, motiu pel qual podrien originar alguna resposta immunitària perjudicial.

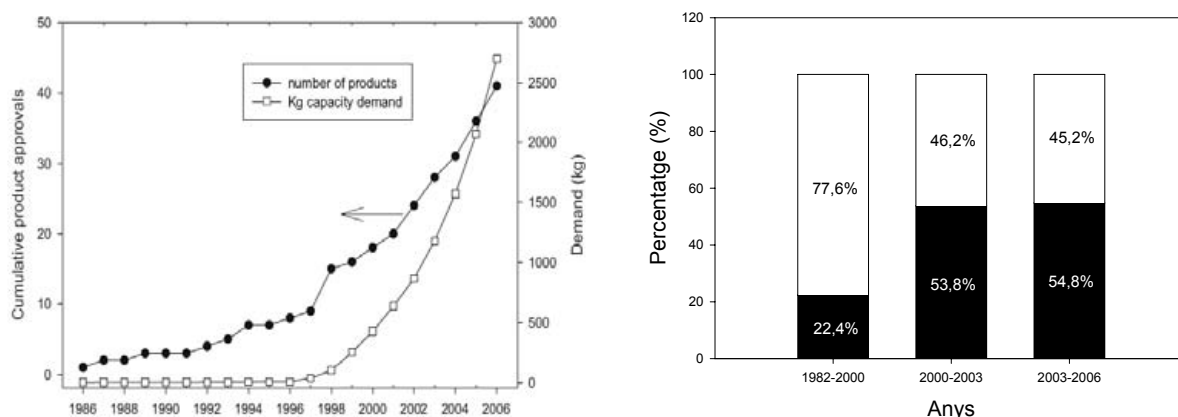


Figura 1.5 Esquerra: Evolució temporal tant del número de productes aprovats fins a la data, provinents de cultius de cèl·lules animals (●), com de la demanda d'aquests productes (□) (Butler·2005). Dreta: Evolució temporal del percentatge del total de productes biotecnològics aprovats produïts a partir de cultius de cèl·lules animals (zona en color negre) o bé a partir de cultius de cèl·lules no animals (zona en color blanc). Dades extreïdes de (Walsh·2003) i (Walsh·2006).

Juntament amb les teràpies gèniques i teràpies cel·lulars i tissulars, que directament ja es basen en el cultiu de les cèl·lules pròpies del pacient, tots aquests fets esmentats fan que la quantitat dels productes biotecnològics existents que utilitzen cultius de cèl·lules animals sigui cada cop més elevada, tant en termes absoluts (figura 1.5, esquerra), com percentuals respecte els cultius de cèl·lules procariotes (figura 1.5, dreta), tot i les avantatges que suposa el seu cultiu anomenades inicialment.

1.1.4 CARACTERÍSTIQUES DEL CULTIU CEL·LULAR

Les cèl·lules animals són cèl·lules eucariotes que presenten importants diferències morfològiques i funcionals respecte les cèl·lules procariotes i altres eucariotes com fongs unicel·lulars o filamentosos i cèl·lules vegetals. Aquestes diferències poden provenir de la grandària de la cèl·lula, la presència o absència de paret cel·lular, els orgànuls presents, l'estructuració del material genètic, el tipus de divisió cel·lular i el sistema d'organització cel·lular.

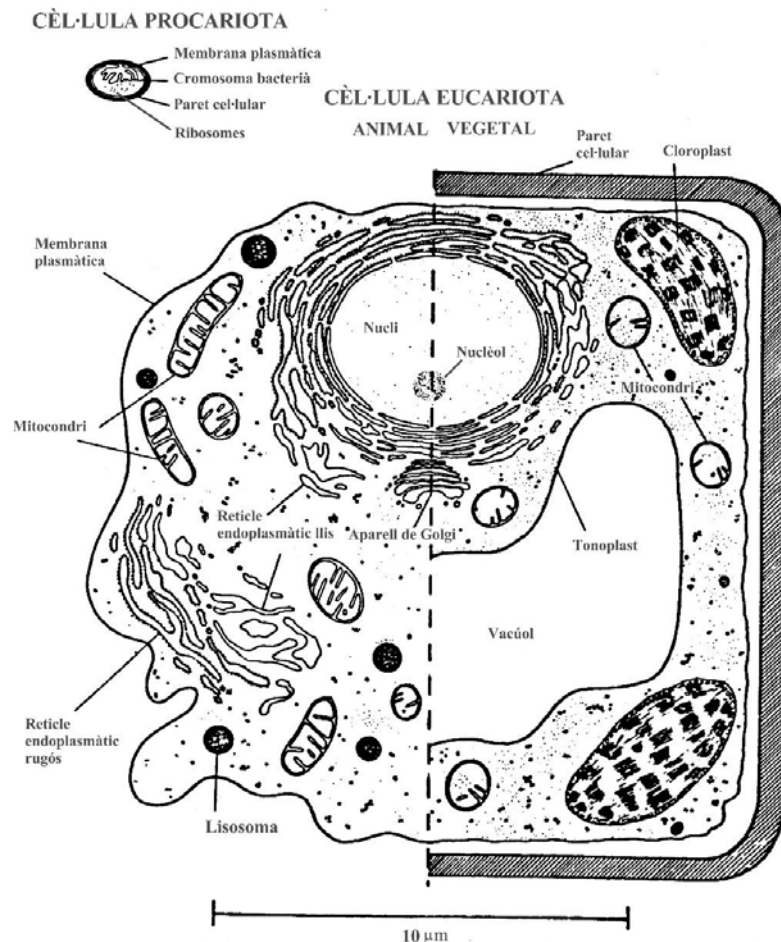


Figura 1.6 Esquema comparatiu entre cèl·lules eucariotes i cèl·lules procariotes.

Els trets fonamentals que permeten diferenciar les cèl·lules animals de les procariotes i altres eucariotes, tal i com es pot observar a la figura 1.6, són bàsicament els següents:

- Les cèl·lules eucariotes animals, a l'igual que les vegetals, tenen una grandària que oscil·la entre els 5 i els 20 μm de diàmetre mitjà, i són molt més grans que altres eucariotes com els llevats (3-7 μm) i que els organismes procariotes (0.3-1 μm).
- Les cèl·lules eucariotes, a diferència de les procariotes, presenten gran quantitat de membranes internes que no es troben unides a la membrana plasmàtica i que separen regions específiques de la resta del citoplasma. Aquestes membranes defineixen un conjunt d'estructures subcel·lulars anomenades òrgans (nucli, mitochondri, reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi, etc.) que tenen una funció cel·lular específica.
- Les cèl·lules eucariotes tenen una quantitat major de DNA que les procariotes. En el cas dels bacteris, el DNA s'organitza en un únic cromosoma que no es troba separat del citoplasma per cap embolcall nuclear

i, fins i tot, determinades espècies contenen també plasmidis (petites estructures circulars de DNA amb capacitat d'autoreplicació). El DNA de les cèl·lules eucariotes es troba associat a múltiples proteïnes i s'estructura en parelles de cromosomes continguts dins del nucli.

- Les cèl·lules animals, a diferència dels llevats, fongs filamentosos, cèl·lules vegetals i procariotes, no disposen d'una paret cel·lular que els hi confereixi rigidesa, únicament es troben envoltades per una fina membrana plasmàtica que regula l'entrada dels nutrients necessaris pel creixement i la sortida de subproductes cel·lulars. Aquest fet, tal com s'explica en el proper apartat, condiciona la manera com cal portar a terme els cultius *in vitro* de cèl·lules animals, donat que fa la cèl·lula molt més susceptible a esforços mecànics.

- A més, quan les cèl·lules animals es troben en l'entorn d'un teixit, les cèl·lules es troben en unes condicions homeostàtiques molt ben definides i perfectament controlades i regulades, tant a nivell fisicoquímic com a nivell metabòlic.

Aquest conjunt de diferències esmentades en les cèl·lules animals impliquen diverses diferències físico-químiques i metabòliques respecte la resta dels cultius esmentats.

1.1.4.1 CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES

A diferència dels bacteris i fongs, entre ells els llevats, els cultius de cèl·lules animals necessiten medis molt més complexos i rics, tal i com es pot observar a la taula 1.1, on es pot comparar la senzillesa d'un medi utilitzat pel cultiu de bacteris amb la complexitat d'un medi utilitzat en el cultiu de cèl·lules animals. La composició d'aquests medis depèn del tipus cel·lular, però a tots s'hi ha d'incloure una sèrie de components: una font de carboni (normalment es tracta de glucosa), un tampó de sals minerals que permeten mantenir un pH i una pressió osmòtica adient i, a més a més, un gran nombre d'aminoàcids i vitamines que la cèl·lula no està capacitada per a fabricar, entre ells la glutamina, que actua també de font de carboni i nitrogen. A part de tots aquests elements, encara s'ha d'afegir un sèrum suplementari per poder permetre el creixement cel·lular i, en el cas de les cèl·lules animals adherents, per obtenir també una bona adhesió al suport físic. Aquest sèrum conté una gran quantitat d'elements traça, lípids, factors de creixement i hormones que les cèl·lules necessiten per un creixement correcte, tot i que la composició no és constant i varia d'un lot a un altre. L'addició d'aquest sèrum comporta una sèrie de problemàtiques per diferents raons. Un d'aquests problemes és degut a la composició variable del sèrum, ja que la utilització de dos lots diferents amb un mateix tipus cel·lular, o bé utilitzar un mateix lot per a dues línies cel·lulars diferents, dona com a resultat unes característiques de creixement diferents, fins i tot arribant a inhibir el

mateix creixement. Per tant, és necessari provar que cada lot de sèrum diferent permeti el creixement correcte de les cèl·lules (Freshney·1985). Una altra de les problemàtiques, que se'n deriva de la utilització de sèrums animals, es dona a l'hora d'efectuar els processos de validació, sobretot en el cas de productes terapèutics, ja que al no tenir una composició definida, el producte resultant podria contenir una sèrie d'elements perjudicials per a l'usuari. Per aquesta raó, la tendència actual és utilitzar cada cop uns medis més definits, tot i l'encariment del procés que suposa prescindir del sèrum.

Taula 1.1 Comparació de la complexitat entre un exemple de medi utilitzat pel cultiu de bactèries (medi M9) amb un exemple de medi base utilitzat pel cultiu de cèl·lules animals (medi GMEM).

GMEM (cèl·lules animals)			M9 (bactèria)
Sals Inorgàniques	Aminoàcids	Vitamines	Sals Inorgàniques
CaCl ₂	L-Arginina	Cholina	NH ₄ Cl
Fe(NO ₃) ₃	L-Cystina	Àcid Fòlic	NaCl
MgSO ₄	L-Glutamina	Myo-Inositol	KH ₂ PO ₄
KCl	L-Histidina	Niacinamida	Na ₂ HPO ₄
NaHCO ₃	L-Isoleucina	D-Pantothenic	
NaCl	L-Leucina	Pyridoxal	
NaH ₂ PO ₄	L-Lysina	Riboflavina	
	L-Methionina	Thiamina	
	L-Phenylalanina		
Altres	L-Threonina		Altres
D-Glucosa	L-Tryptophan		D-Glucosa
Roig de fenol	L-Tyrosina		
Sèrum Suplementari	L-Valina		

Pel que fa als diferents paràmetres fisicoquímics, la temperatura òptima en cultius de cèl·lules animals es troba entre els 35 °C i 37 °C. Una baixada de la temperatura provocaria una baixada de la velocitat de creixement, sense provocar una gran baixada en la viabilitat del cultiu, mentre que si la temperatura augmenta la viabilitat baixa ràpidament fins a una mort ràpida del cultiu. Pel que fa als valors òptims de pH, es troben entre els 7.0 i 7.4, provocant una baixada de la velocitat de creixement i de la viabilitat quan els valors s'allunyen dels òptims. S'ha de tenir en compte que, mentre la temperatura es manté constant al llarg del cultiu, el pH es va acidificant per l'acció dels àcids produïts com a subproductes en el metabolisme cel·lular. Pel que fa a la pressió osmòtica, el rang òptim va de 290 a 310 mOsm/kg. Tal i com passa amb el pH, l'osmolaritat es pot veure afectada per addicions de nutrients cap a la zona superior del rang òptim, provocant una disminució de la velocitat de creixement. Aquestes disminucions de la velocitat de creixement cel·lular deguda a variacions de les condicions òptimes de cultiu es poden observar als esquemes representats a la figura 1.7.

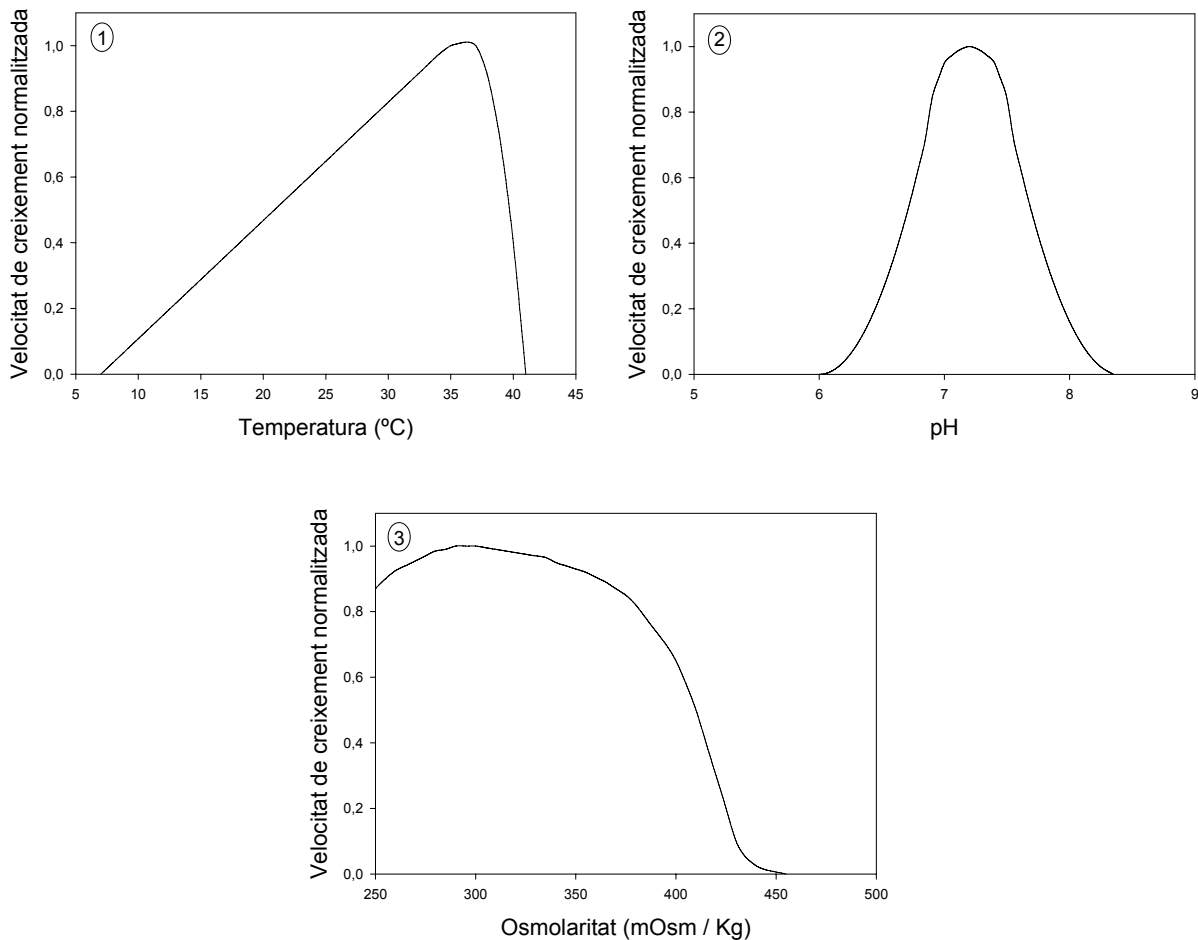


Figura 1.7 Esquemes de la variació de la velocitat de creixement d'un cultiu de cèl·lules animals en funció del valor de les diferents condicions de cultiu. Les condicions de cultiu representades en són la temperatura (nº1), el pH (nº2) i l'osmolaritat (nº3). (Kallos i Behie·1999)

D'altra banda, la concentració d'oxigen present en el medi de cultiu haurà d'estar entre el 30% i 60% de la concentració de saturació. A diferència del que passa en cultius de bacteris i llevats, en aquest cas no es poden utilitzar sistemes d'agitació mecànics a altes velocitats. La raó recau en que les cèl·lules animals, contràriament als procariotes i fongs, no tenen paret cel·lular que els previngui de l'estrès creat per aquests sistemes d'agitació (Chalmers·1994). Si en els cultius de llevats i bacteris les velocitats d'agitació varien entre 400-600 rpm, en els cultius de cèl·lules animals baixen a valors entre 50-100 rpm, o bé es fan servir sistemes d'aeració sense bombollegig o d'aeració per capçal, o a través de membranes permeables als gasos.

El seguiment i control dels paràmetres fisicoquímics en els cultius cel·lulars té una gran importància (Freshney·1994), ja que tal com s'acaba de veure els rangs per a un bon creixement són limitats. Així

doncs, tant per a l'optimització de processos com pels processos de producció, serà necessari realitzar un control acurat de les condicions físico-químiques del cultiu.

1.1.4.2 CARACTERÍSTIQUES METABÒLIQUES

El coneixement de les característiques metabòliques de les cèl·lules animals és bàsic per optimitzar el seu comportament *in vitro*, donat que serà necessària la optimització de la relació entre el consum i l'administració de nutrients d'un determinat medi, així com també de la producció de subproductes, que podrien limitar el cultiu. A la figura 1.8 es disposa d'una representació simplificada del metabolisme d'una cèl·lula animal.

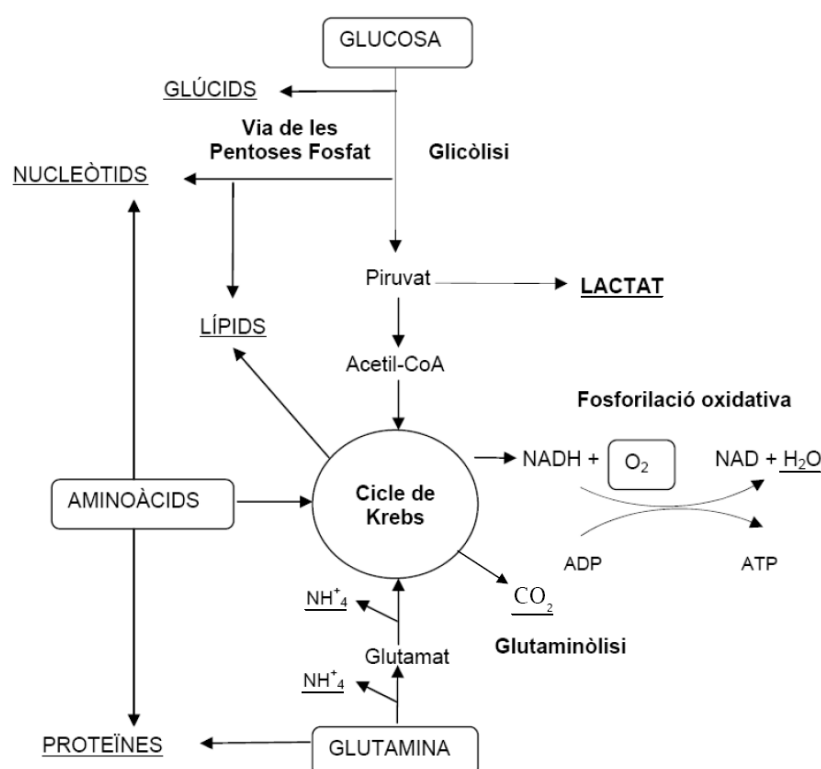


Figura 1.8 Esquema simplificat de les rutes metabòliques de la cèl·lula animal (A Sanfeliu·1995).

El comportament metabòlic de la cèl·lula pateix una forta alteració quan aquesta deixa de formar part del cultiu homeòstatic en el teixit pluricel·lular original i és sotmesa al procés de d'adaptació per poder ser cultivada *in vitro*. Aquest nou comportament es caracteritza per una forta desregulació a l'hora d'incorporar i consumir els nutrients, la qual cosa porta a un ús ineficient dels principals substrats com la glucosa i la glutamina, els quals es troben en concentracions elevades en els medis de cultiu habituals, i de retruc a la posterior síntesi d'una sèrie de subproductes tòxics pel creixement com són el lactat i l'amoni, entre d'altres, que poden modificar variables importants de cultiu com el pH. Existeixen diferents alternatives no excloents per intentar minimitzar aquesta desregulació:

- L'enginyeria metabòlica de les cèl·lules per tal de modificar els gens que regulen els seus fluxos metabòlics (Paredes *i col.*·1999; A. Sanfeliu *i col.*·1997).
- El control metabòlic, en base a la redefinició dels medis de cultiu i, en concret, dels substrats lentament metabolitzables.(Altamirano *i col.*·2001a; Altamirano *i col.*·2001b; Altamirano *i col.*·2000)
- El disseny d'estratègies de cultiu elaborades que permetin controlar directament el nivell dels diferents substrats en el medi, com per exemple el fed-batch i la perfusió.(Gámez·2000)

1.1.5 LÍNIES CEL·LULARS

S'anomena línia cel·lular a aquelles cèl·lules que han estat transformades per tal d'adquirir la capacitat de poder ésser cultivades *in vitro* indefinidament (Werner i Noe·1993). Per a obtenir una línia cel·lular han de passar diversos estats. Un cultiu es primari quan es cultiven cèl·lules provinents directament d'un organisme viu. Aquestes cèl·lules poden dividir-se un número molt petit de cops i poden sobreviure durant un cert temps si es mantenen unes bones condicions, però no continuen creixent i moren finalment. El principal interès dels cultius primaris és utilitzar-los per representar els models més semblants a situacions *in vivo*, ja que poden expressar algunes característiques que no es tenen en les línies cel·lulars.

A partir dels cultius primaris, es poden subcultivar algunes de les cèl·lules en determinades condicions en un nou medi per obtenir un cultiu secundari, capaç de dividir-se i créixer un número finit de vegades *in vitro*, entre 25 i 50 generacions, depenent del grau de diferenciació de la cèl·lula, on les cèl·lules totalment diferenciades són més difícils de mantenir la capacitat de divisió. Al cap d'un temps determinat, aquest cultiu deixa de créixer i es mor.

A partir d'aquest cultiu, ja sigui de manera natural o induïda mitjançant composts químics, radiacions o a través de virus, es poden obtenir cèl·lules mutades amb la capacitat de dividir-se indefinidament, sense significar necessàriament que siguin cèl·lules tumorals tot i que en alguns casos ho poden ser. Aquests tipus de cèl·lules ja formen les línies cel·lulars. Aquestes línies cel·lulars també tenen una sèrie de propietats, com una ràpida velocitat de creixement i una capacitat de proliferació indefinida, que augmenten el seu interès per la producció de proteïnes recombinants. Les línies cel·lulars animals que s'utilitzen en els cultius *in vitro* provenen fonamentalment de cinc tipus bàsics de teixits de mamífer: epitelial, muscular, nerviós, línies sanguínies i connectiu (Shahar *i col.*·1994). Tot i que la majoria de les característiques dels cultius cel·lulars animals són comunes per a les diferents línies cel·lulars, algunes

característiques depenen del sistema de creixement cel·lular i que divideixen les línies cel·lulars en dos grans grups, determinant el sistema de cultiu necessari per a un correcte creixement. Aquests dos grans grups són:

Les cèl·lules adherents (figura 1.9), que són aquelles cèl·lules que necessiten un suport amb una superfície adequada que els permeti sobreviure i multiplicar-se. Alguns exemples són les cèl·lules musculars, les nervioses, fibroblasts i moltes epitelials procedents d'òrgans com el ronyó o fetge. Una de les característiques importants que tenen aquest tipus de cèl·lules és que es veuen inhibides pel contacte amb les cèl·lules veïnes (Freshney·1994), de manera que creixeran al llarg de la superfície disponible fins a formar una monocapa. Quan ja no queda superfície lliure s'obté un cultiu confluent, on les cèl·lules es van comprimint i la seva velocitat de creixement va baixant fins a ser nul·la.

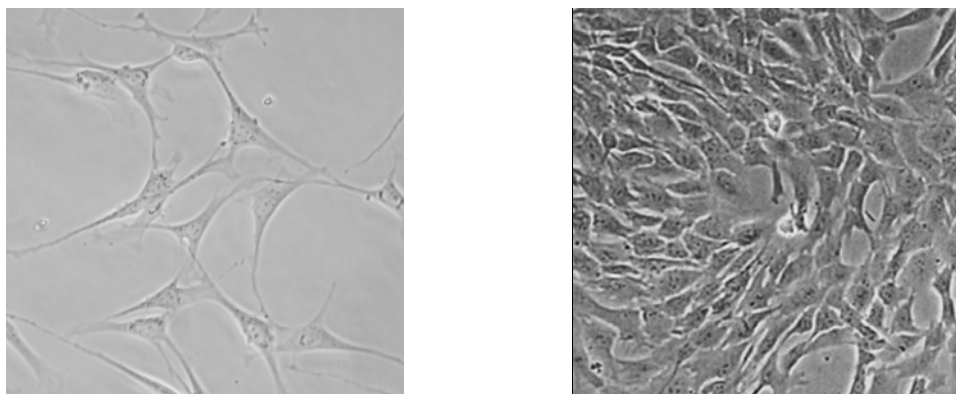


Figura 1.9 Fotografies realitzades al microscopi de cèl·lules animals adherents. Les línies cel·lulars fotografiades són ones cèl·lules mare mesenquimals (esquerra) i cèl·lules epitelials (dreta).

Així doncs, la principal problemàtica que presenten els cultius no és només la falta d'algun dels nutrients, sinó la manca de superfície lliure per a poder-se expandir. Tot i que a nivell de laboratori es poden cultivar en plaques de petri, flascons o rollers, per a produccions a gran escala s'ha necessitat, des de bon inici, el desenvolupament d'un mètode que permetés evitar el cultiu simultani de milers de rollers, com els que es poden trobar encara a algunes plantes de producció (figura 1.10, A). Primerament varen sortir els cultius en microsuports (figura 1.10, B), amb la primera producció a gran escala de la vacuna pel virus de la polio (van Wezel·1972) i, des d'aleshores, s'han anat desenvolupant tècniques per millorar l'ancoratge a diferents tipus de microsuports per poder augmentar considerablement la densitat cel·lular en cultius de cèl·lules adherents.

Els microsuports, però, presenten una sèrie de problemes, com per exemple l'esterilització, la neteja i problemes d'oxigenació, que han portat al desenvolupament d'altres tecnologies amb millor viabilitat i

densitat cel·lular, com els Hollow fibers (figura 1.10, C) o els llits de fibres (figura 1.10, D) i els mòduls de plats empacats (GE Osmonics). Amb les recents aplicacions a l'enginyeria de teixits, on la majoria de les cèl·lules són adherents, l'interès i el potencial de les cèl·lules adherents i els seus productes ha augmentat enormement i, per tant, es fa necessària la recerca i el desenvolupament de tecnologies destinades a aquest gran grup cel·lular.

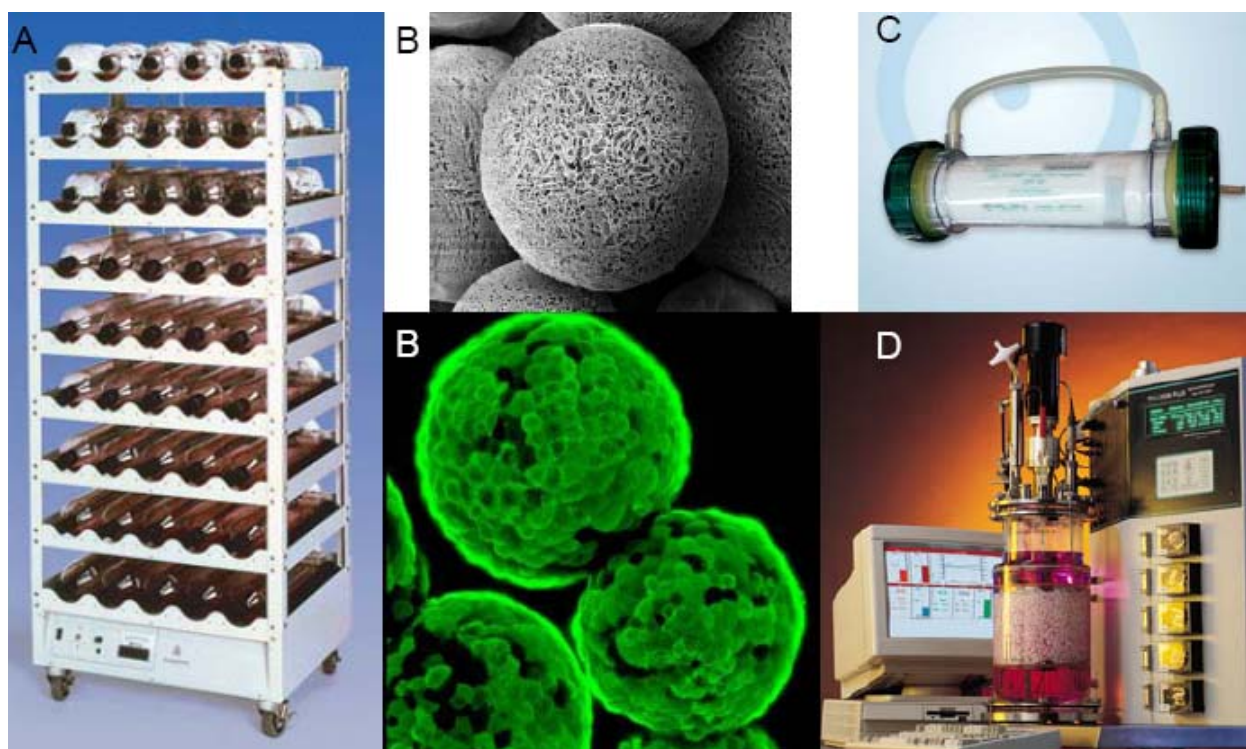


Figura 1.10 Exemples d'aparells de cultiu cel·lular comercials a partir de rollers com els que es poden trobar a bastants plantes de producció.

Les cèl·lules no adherents (figura 1.11), que són aquelles cèl·lules que poden créixer en suspensió en el medi, arribant a concentracions cel·lulars molt més elevades que els cultius de cèl·lules adherents. Alguns exemples típics en cultius són les cèl·lules CHO (Chinese Hamster Ovary) o les cèl·lules BHK (Baby Hamster Kidney), que tot i provenir de teixits originàriament adherents han estat adaptades per a créixer en suspensió, i els hibridomes, un exemple de cèl·lula sanguínia. La majoria dels productes biològics provinents dels cultius animals, han estat desenvolupats amb cèl·lules no adherents ja que poden arribar a una major concentració i per tant a una major productivitat. En aquests cultius, la principal limitació es troba en l'esgotament d'algun dels nutrients presents en el medi o per l'acumulació de subproductes tòxics provinents del propi metabolisme de les cèl·lules. La recerca i desenvolupament, que ha vingut marcat per les cèl·lules no adherents, han estat enfocats cap a l'obtenció de sistemes d'alimentació i retenció cel·lular, com ara els sistemes de fed-batch, continu o perfusió.

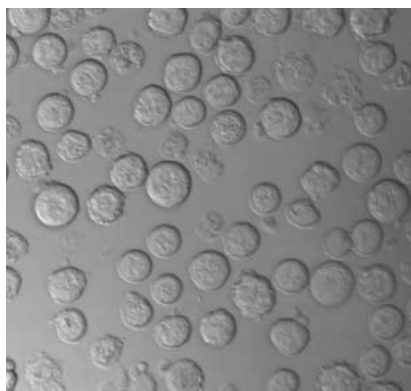


Figura 1.11 Fotografies realitzades al microscopi de cèl·lules animals no adherents. Les cèl·lules fotografiades són hibridomes.

Taula 1.2 Exemples més típics pels dos tipus de línies cel·lulars, les cèl·lules adherents i les no adherents.

Attached Cell Lines		
<i>Name</i>	<i>Species and tissue of origin</i>	<i>Morphology</i>
MRC-5	Human lung	Fibroblast
HELA	Human cervix	Epithelial
VERO	African Green Monkey Kidney	Epithelial
NIH 3T3	Mouse embryo	Fibroblast
L929	Mouse connective tissue	Fibroblast
CHO	Chinese Hamster Ovary	Fibroblast
BHK-21	Syrian Hamster Kidney	Fibroblast
HEK 293	Human Kidney	Epithelial
HEPG2	Human Liver	Epithelial
BAE-1	Bovine aorta	Endothelial
Suspension Cell Lines		
<i>Name</i>	<i>Species and tissue of origin</i>	<i>Morphology</i>
Hybridoma	Mouse Myeloma and B-cell Lymphoma	Lymphoblastoid
NSO	Mouse Myeloma	Lymphoblastoid-like
U937	Human Histiocytic Lymphoma	Lymphoblastoid
Namalwa	Human Lymphoma	Lymphoblastoid
HL60	Human Leukaemia	Lymphoblastoid-like
WEHI 231	Mouse B-cell Lymphoma	Lymphoblastoid
YAC 1	Mouse Lymphoma	Lymphoblastoid
U 266B1	Human Myeloma	Lymphoblastoid
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	Neuroblast
BHK-21 (suspension adapted)	Syrian Hamster Kidney	Lymphoblastoid-like
CHO (suspension adapted)	Chinese Hamster Ovary	Lymphoblastoid-like

A la taula 1.2 es poden observar algunes de les línies cel·lulars animals més utilitzades, segons el grup cel·lular al que pertanyen; cèl·lules animals adherents i cèl·lules animals en suspensió. El fet que les cèl·lules animals en suspensió poden arribar a una concentració més alta fa que la majoria de productes biotecnològics produïts a partir de cultius de cèl·lules animals s'hagin dut a terme amb cultius de cèl·lules

en suspensió (Walsh·2003) i, fins i tot, s'ha procedit a l'adaptació d'algunes de les línies cel·lulars adherents cap a cultius en suspensió, tal i com s'ha especificat a la taula 1.2 amb les línies cel·lulars BHK-21 i CHO. Tot i aquestes característiques preferents de les cèl·lules en suspensió respecte les adherents, cada cop hi ha més productes biotecnològics que es produeixen a partir de cèl·lules adherents, ja que cada cop existeix un ventall de productes més extens produït exclusivament per cèl·lules adherents, que no s'han pogut adaptar amb èxit cap a un cultiu en suspensió com, per exemple, quan el producte són les pròpies cèl·lules adherents, o quan es tracta d'un producte viral que necessita dels tipus concrets de cèl·lules animals adherents. A la taula 1.3 es poden observar alguns d'aquests productes obtinguts a gran escala a partir de cultius de cèl·lules animals adherents.

Taula 1.3 Alguns exemples de productes obtinguts a gran escala a partir de cultius de cèl·lules animals adherents (creixement en microcàrrers), ja siguin les pròpies cèl·lules, productes cel·lulars o bé productes virals obtinguts a partir d'utilitzar les cèl·lules animals adherents com a hostes.

Producte	Cèl·lules	Referències
Interferó β	Fibroblasts humans	(Giard <i>i col.</i> ·1979)
Cèl·lules endotelials	Cèl·lules endotelials	(Bing <i>i col.</i> ·1991)
Línies cel·lulars primàries i línies establertes	BHK, MDCK, fibroblast d'embrió de gall	(Reuveny <i>i col.</i> ·1982)
Cèl·lules d'illot pancreàtic	Cèl·lules d'illot pancreàtic	(Bone i Swenne·1982)
Enzims proteolítics	Fibroblasts humans (MRC-5)	(Varani <i>i col.</i> ·1986)
Activador del plasminogen tissular	CHO	(Nilsson <i>i col.</i> ·1988)
Inhibidor del creixement	Cèl·lules vero	(Spier i Fowler·1985)
Factor de creixement de cèl·lules nervioses	Cèl·lules de cor de gall	(Norrgren <i>i col.</i> ·1983)
Herpes Simplex	Fibroblasts humans (MRC-5)	(Griffiths i Thornton·1981)
Hepatitis A	Cèl·lules de ronyó de mono (frhk-4)	(Widell <i>i col.</i> ·1984)
Corona Virus	Cèl·lules murines (DTB)	(Talbot <i>i col.</i> ·1989)
Rabies Virus	Cèl·lules vero	(van Wezel <i>i col.</i> ·1978)
Polio Virus	Cèl·lules vero	(Montagnon·1985)
Reo Virus	Cèl·lules vero	(Berry <i>i col.</i> ·1999)

L'augment exponencial que estan patint els productes biotecnològics, tant en la varietat de productes com en la importància d'aquests i, per tant, els productes produïts a partir de cultius de cèl·lules animals adherents, així com les tecnologies emergents de les cèl·lules mare i l'enginyeria tissular, on la majoria

dels llinatges cel·lulars resultants són adherents tal i com es mostra a continuació a la figura 1.12, fan que la importància d'aquests cultius de cèl·lules adherents hagi augmentat considerablement en els últims anys.

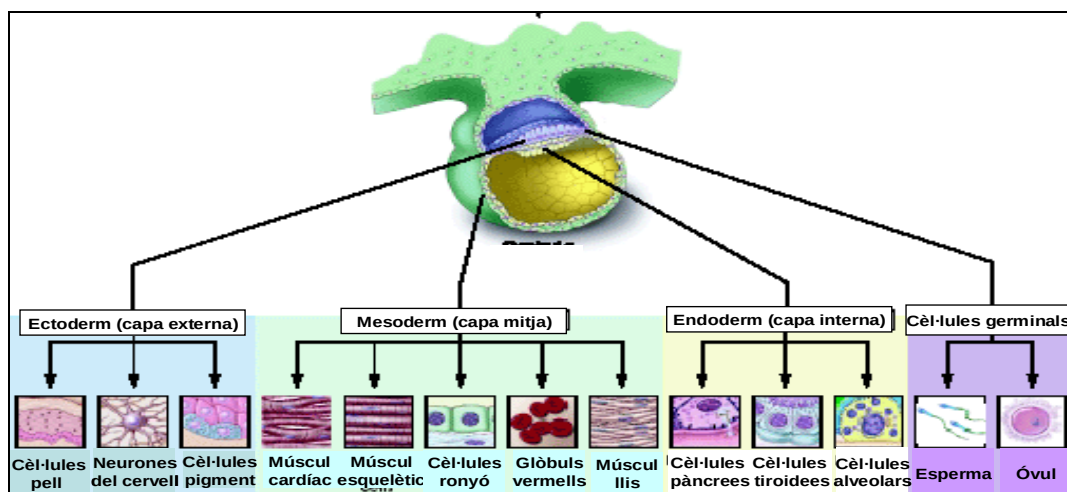


Figura 1.12 Llinatges cel·lulars resultants a partir de la diferenciació de cèl·lules mare. De tots els llinatges finals possibles, només les cèl·lules sanguínies i les cèl·lules germinals creixen en suspensió, tractant-se la resta de cèl·lules animals adherents.

1.2 MONITORATGE DE CULTIUS DE CÈL·LULES ANIMALS ADHERENTS

Amb la gran complexitat de les cèl·lules animals i amb les limitacions que presenten envers els cultius de cèl·lules procariotes per a l'obtenció d'elevades concentracions cel·lulars i, tenint en compte que aquesta complexitat, així com les limitacions, es veuen amplificades quan els cultius són de cèl·lules animals adherents, un aspecte clau és la possibilitat de disposar de sistemes de monitoratge i control en línia dels diferents paràmetres del cultiu que permeti optimitzar l'expansió cel·lular dels cultius de cèl·lules animals per a l'obtenció d'una quantitat elevada de producte o de la dosi necessària quan es tracta de teràpies cel·lulars i tissulars.

Dins d'aquests paràmetres, no s'inclouen només els paràmetres fisicoquímics necessaris per a mantenir unes condicions òptimes pel creixement, sinó que també s'inclouen els paràmetres bioquímics i fisiològics necessaris per obtenir informació de l'estat en que es troba el cultiu. D'entre aquestes paràmetres bioquímics i fisiològics, els que aporten una informació més útil en un cultiu cel·lular en són la concentració i la viabilitat cel·lular i l'activitat de les cèl·lules estimada a partir de la concentració dels substrats i subproductes clau del cultiu. D'aquesta manera, amb el monitoratge i control d'aquests paràmetres es pot mantenir un control del cultiu i del procés, tant en l'àmbit del desenvolupament de processos, on el propòsit

rau en adequar una estratègia òptima per mantenir el creixement i la viabilitat del cultiu cel·lular durant el màxim temps i així augmentar-ne la seva productivitat, com en l'àmbit de producció dels propis processos, on el principal propòsit recau en assegurar-ne la reproductibilitat dels processos.

En l'actualitat, l'escassetat d'aquestes tecnologies ha comportat la suboptimització de la majoria dels processos de cultius de cèl·lules animals a l'haver de limitar les estratègies de cultiu a processos en discontinu degut a la falta d'aquestes tecnologies o a la poca fiabilitat de les existents. Aquesta suboptimització, que no només s'observa a les produccions a partir de cultius de cèl·lules animals adherents, sinó que també s'observa en produccions a partir de cultius de cèl·lules animals en suspensió, han posat de manifest les necessitats de dotar als cultius de cèl·lules animals de sistemes pel seguiment en línia de les variables dels cultius cel·lulars i, per tant, de la necessitat de desenvolupar un seguit de sensors fiables i robusts per la mesura en línia dels principals paràmetres fisiològics que caracteritzen aquests processos biològics. Aquests sensors han de complir una sèrie de requeriments necessaris per poder ésser utilitzats industrialment (Olsson i Nielsen·1997):

- **Fiabilitat:** han de permetre la mesura en línia continuadament preservant l'estabilitat i l'esterilitat al llarg del període d'operació (fins a 20 dies).
- **Calibratge:** la mesura ha de tenir una relació lineal respecte la concentració cel·lular en tot el rang d'operació i, si no pot ser lineal, el calibratge de tenir una bona precisió. També ha de permetre el calibratge en línia i ha de tenir una alta resolució i sensibilitat en concentracions crítiques. Aquestes dues últimes característiques són molt importants pel seguiment dels paràmetres en cultius de cèl·lules animals, ja que al tractar amb unes concentracions cel·lulars baixes, els marges de variació d'algunes de les variables a monitorar són molt petits, inclús mínims en el cas de cultius de cèl·lules animals adherents.
- **Interferències:** La mesura ha de tenir la màxima especificitat possible per no tenir interferències degudes a altres components del cultiu, a canvis en les condicions d'operació (agitació, aeració, concentració d'oxigen, pH i temperatura) o de l'ambient.
- **Disseny:** Ha de ser esterilitzable i ha d'ésser de fàcil neteja o bé d'un sol ús. El sensor ha d'estar situat en una zona amb una bona mescla que sigui representativa del bioreactor i ha de poder compaginar diferents aplicacions (bacteris, llevats, fongs i cèl·lules animals en suspensió o adherents).

Durant els últims anys, s'han desenvolupat diferents metodologies per a l'estimació en línia d'algunes d'aquestes variables claus en cultius cel·lulars. S'han desenvolupat mètodes pel seguiment en línia dels substrats, com la glucosa (Graf i Schugerl-1991; Kurokawa *i col.*-1994; Ozturk *i col.*-1997b; Wang *i col.*-1995) i la glutamina (Campmajó *i col.*-1994; Kurokawa *i col.*-1994; Wang *i col.*-1995). També se n'han descrit pels principals subproductes del metabolisme cel·lular animal, com pel lactat (Kurokawa *i col.*-1994; Ozturk *i col.*-1997b; Wang *i col.*-1995) i l'amoní (Campmajó *i col.*-1994; Graf i Schugerl-1991; Jorgensen *i col.*-1997). Aquests mètodes utilitzen tècniques cromatogràfiques per HPLC o d'anàlisi FIA i poden ésser aplicables en diferents cultius, ja sigui de bacteris, llevats, fongs o cèl·lules animals.

1.2.1 MONITORATGE DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR

Una de les variables clau en un cultiu de cèl·lules, ja siguin cèl·lules animals o bé procariotes, és la mesura de la concentració cel·lular. El seguiment en línia de la concentració cel·lular en un cultiu té un interès evident, essent la màxima concentració cel·lular un dels objectius primordials dels cultius cel·lulars, a la fi de poder obtenir una màxima productivitat, però alhora, també permet el càlcul d'altres paràmetres importants, com la velocitat de creixement, la velocitat de producció específica de productes i els rendiments d'utilització de substrat entre altres, paràmetres molt útils per a l'optimització de processos i disseny d'estratègies eficients pel control del cultiu, com podria ésser el subministrament de nutrients en un cultiu per a mantenir-ne una concentració constant d'aquests. Això fa que, qualsevol intent d'avançar en el control en línia dels bioreactors passi per a poder mesurar en línia la corresponent concentració cel·lular. No és estrany, doncs, que aquest paràmetre es consideri com el més important a monitorar en aquest tipus de processos.

Tot i que encara no es disposa d'un sistema acceptat universalment que permeti mesurar tant la concentració cel·lular com la viabilitat de les cèl·lules, un estudi dels treballs publicats revela una gran diversitat de mètodes i d'instruments, actualment en ús, pel monitoratge en línia de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals (Konstantinov *i col.*-1994). Aquesta diversitat és el resultat de varis factors, com per exemple les diferències del tipus de bioreactor utilitzat, les característiques de la línia cel·lular o les característiques de mesura dels sistemes de monitoratge. Així, aquests mètodes es poden dividir segons el grau d'automatització en els mètodes de mesura fora de línia, quan existeix un tractament posterior a la presa de mostra per determinar-ne la concentració, i els mètodes en línia, quan el tractament es fa al mateix moment que la presa de mostra (semi-continua), o bé realitzen la mesura dins del propi cultiu. Tot i que els mètodes necessaris pel control de processos són els mètodes en línia, sovint els mètodes de mesura fora de línia són utilitzats com a mètodes de referència i validació per les diferents

tècniques de mesura de la concentració cel·lular, com per exemple el mètode de recompte cel·lular descrit en l'apartat 8.6.1.1 de Materials i Mètodes.

Taula 1.4 Mètodes directes pel monitoratge en temps real de la concentració cel·lular. (Gámez·2000)

Mètode	Avantatges	Desavantatges	Referències
Densitometria de ressonància acústica (ARD)	Estabilitat elevada. No té problemes d'obturacions.	Relativament complicat. Requereix un sistema de filtratge. Baixa sensibilitat . Afectat per l'estat fisiològic cel·lular.	(Kilburn i col·1989)
Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)	Pot mesurar a densitats cel·lulars molt altes. Respon a la concentració de cèl·lules viables. Insensible a canvis fisiològics.	Complicat. Instrumentació molt cara. Sensibilitat baixa.	(Mancuso i col·1990)
Mètode electroquímic	Relativament simple i esterilitzable. Connexió dins el sistema.	Sense un coneixement teòric gaire clar. Possible dependència de l'estat fisiològic.	(Karube i Sode·1991)
Conductivitat	Equipament senzill. Pot mesurar a densitats cel·lulars molt altes.	Sensibilitat baixa i gran error en la mesura. Resultats depenen de l'estat fisiològic cel·lular.	(Blute i col·1988)
Capacitat	Sonda esterilitzable senzilla. Respon a la concentració de cèl·lules viables. Sensors comercials disponibles. Bons resultats amb cultius microbians.	Pertorbat per conductivitats altes del medi. No treballa bé a baixes densitats. Baix rendiment amb cèl·lules animals.	(Konstantinov i col·1992) (Guan i col·1998)
Fluorimetria	Sonda esterilitzable. Bona sensibilitat a baixes concentracions. Sensors comercials disponibles. Es pot correlar amb la concentració de cèl·lules viables.	Afectat per múltiples factors. Interpretació del senyal difícil. Correlació amb la densitat cel·lular poc fiable. Sensibilitat baixa a altes densitats. Resposta depenent de l'estat fisiològic cel·lular.	(MacMichel i col·1987) (Siano i Mutharasan·1991)
Absorbància i/o dispersió	Sonda esterilitzable . Disseny robust. Bona sensibilitat en un rang ampli. Considerable experiència en cultius microbians.	Pertorba l'embrutiment de la superfície òptica. Afectat per l'estat fisiològic cel·lular. Interferències per bombolles d'aire.	(Konstantinov i col·1992) (Wu i col·1995)
Microscòpia <i>in situ</i>	Conceptualment nova tecnologia, capaç de donar més informació que els altres mètodes.	Poca experiència acumulada. Bastant car.	(Maruhashi i col·1994) (Bittner i col·1998)

Els sistemes de monitoratge també poden ser classificats segons les propietats de mesura, essent els mètodes directes aquells que engloben un conjunt de tècniques que mesuren directament propietats físiques de la cèl·lula i dels seus components, o bé essent mètodes indirectes aquells que consisteixen en tècniques que mesuren paràmetres relacionats amb l'activitat cel·lular. Ambdós sistemes de mesura són molt importants per a poder realitzar un control òptim dels cultius cel·lulars. A la taula 1.4 es recullen

alguns dels mètodes directes, on es comenten alguns dels avantatges i desavantatges que aquests comporten, mentre que els mètodes indirectes es descriuen posteriorment a l'apartat 1.2.2.

Treballar amb cultius de cèl·lules animals, significa treballar a les concentracions cel·lulars més baixes possibles pel que fa a cultius cel·lulars i, per tant, la sensibilitat juga un paper molt important en el monitoratge de la concentració cel·lular. A més, per a poder ser aplicables industrialment, necessiten d'una tecnologia poc complexa, barata i que no sigui molt complicada d'implementar. Aquests fets, fan que la majoria dels mètodes resumits en la taula 1.4 comportin problemàtiques prou significatives per a descartar-los com a possible solució pel seguiment de la concentració cel·lular en bioreactors de cèl·lules animals. A més, cada un dels mètodes exposats, depèn de les característiques de la línia cel·lular que s'utilitzi i per tant, s'han d'analitzar els dos grans grups de cèl·lules animals per separat.

1.2.1.1 CULTIUS DE CÈL·LULES ANIMALS EN SUSPENSIO

Les metodologies més robustes i, per tant, les que són més utilitzades actualment per a la mesura de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals, són aquelles que contenen sensors òptics que es basen en l'absorbància i/o la dispersió i la fluorimetria. Aquests sensors òptics tenen múltiples avantatges, ja que són sensors amb uns temps de resposta ràpids, tenen una bona sensibilitat, són simples i de fàcil manteniment.

Entre els mètodes òptics, la densitat òptica (DO), correlacionada de forma lineal amb la concentració de cèl·lules, és el mètode més usat per a la mesura de concentració cel·lular, inicialment pels cultius de cèl·lules procariotes i, posteriorment, pel cultiu de cèl·lules animals, gràcies a la sortida al mercat d'un gran nombre de sensors comercials amb una bona sensibilitat a zones de baixa concentració cel·lular (Olsson i Nielsen 1997). Les raons essencials que fan que s'utilitzin normalment en comptes d'altres mètodes, són la rapidesa i la senzillesa del mètode, permetent que molts cops s'utilitzi com a referència, tant en línia com fora de línia, pel desenvolupament d'altres mètodes de mesura. El principal desavantatge és que el mètode de la densitat òptica no permet la distinció entre cèl·lules viables mortes, sinó que fa el seguiment de la concentració de cèl·lules totals.

A la figura 1.13 es poden observar tant el avantatges que suposa aquest sistema de mesura en línia, amb una correlació molt bona amb els recomptes de concentració realitzats fora de línia durant les etapes inicials i de creixement exponencial, moments en que la concentració de cèl·lules totals és pràcticament la mateixa que la concentració de cèl·lules viables, però també els desavantatges corresponents, amb el creixement desmesurat del senyal de la sonda òptica degut a factors que distorsionen el senyal, com el

trencament de material cel·lular amb el consegüent augment de residus cel·lulars, tal i com ja s'ha descrit anteriorment (Behrendt i col., 1994).

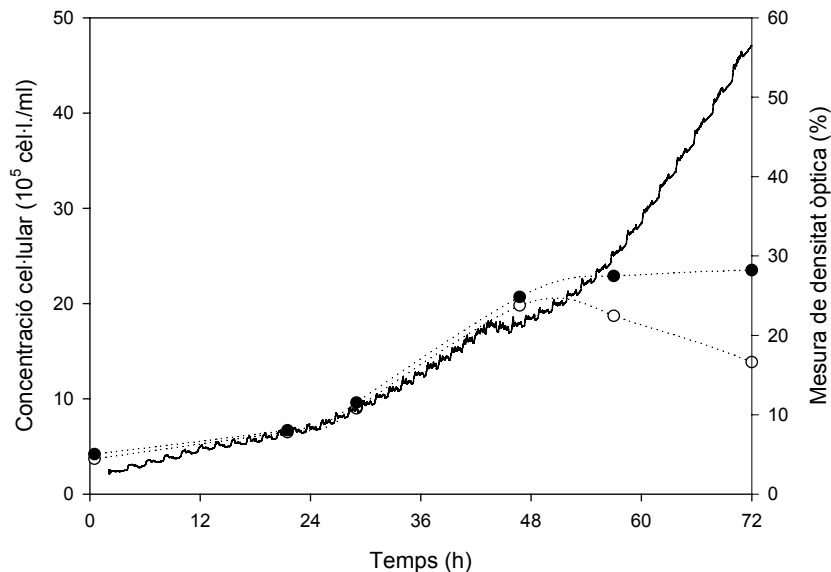


Figura 1.13 Monitoratge d'un creixement de cèl·lules d'hibridoma en un bioreactor operat en discontinu a partir d'un sensor òptic (—). Comparació amb les mesures de concentració de cèl·lules totals (●●●) i cèl·lules viables (○○○) efectuades fora de línia.

Altres mètodes que també s'han utilitzat són els basats en la fluorimetria, però no aporten tants avantatges i no es troben prou desenvolupats per a instal·lar-los en processos de producció a gran escala.

1.2.1.2 CULTIUS DE CÈL·LULES ANIMALS ADHERENTS

El fet que la majoria dels productes biotecnològics es produeixin a partir de cèl·lules en suspensió, fa que les tecnologies que es troben desenvolupades actualment s'hagin focalitzat cap als cultius de cèl·lules animals en suspensió, mentre que els cultius de cèl·lules animals adherents es deixaven a banda. Això fa que aquest augment considerable de la importància del cultiu de cèl·lules adherents anomenat anteriorment vingui acompanyat per una necessitat creixent del desenvolupament tecnologies dirigides a les cèl·lules animals adherents que en permeti l'optimització dels seus cultius.

En el cas de cultius de cèl·lules adherents però, les problemàtiques augmenten considerablement respecte els cultius de cèl·lules en suspensió per diferents raons. Primerament, s'ha de tenir en compte el fet que els cultius de cèl·lules animals no arriben a concentracions cel·lulars gaire elevades, al que s'ha de sumar la limitació del creixement de les cèl·lules animals adherents a causa de la necessitat de disposar de superfície lliure pel creixement cel·lular i la corresponent inhibició del creixement per contacte. Aquests fets fan que els cultius de cèl·lules adherents arribin a concentracions cel·lulars més baixes que les

aconseguides en cultius de cèl·lules animals en suspensió, agreujant significativament la problemàtica amb la sensibilitat de les metodologies actuals de seguiment de concentració cel·lular.

La segona problemàtica inherent dels cultius de cèl·lules animals adherents és el fet que les cèl·lules es trobin adherides formant una monocapa a la superfície del sistema de cultiu i no es trobin en suspensió, implicant que les actuals metodologies òptiques i els sensors comercials utilitzats pel seguiment de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules no adherents i que gaudeixen d'una bona sensibilitat, no siguin aplicables per a aquest tipus de cultius cel·lulars.

Finalment, una tercera problemàtica prové de les tecnologies actuals que s'utilitzen pel monitoratge de cultius de cèl·lules adherents. Aquestes tecnologies, a diferència dels cultius de cèl·lules que creixen en suspensió, impliquen la utilització de mètodes destructius i fora de línia, obligant a la utilització de diversos creixements paral·lels per a poder obtenir més d'un valor de concentració cel·lular al llarg d'un creixement cel·lular, amb la variabilitat que això significa. Aquesta variabilitat comporten la necessitat d'augmentar les repeticions de resultats, i per tant del número de cultius paral·lels, per a l'obtenció de paràmetres estadístics, necessaris en qualsevol manipulació de material biològic.

Aquestes problemàtiques fan que la implementació de la majoria dels mètodes descrits anteriorment sigui impossible. Existeix doncs, la necessitat de dotar els cultius de cèl·lules animals adherents d'un sistema de mesura en línia de la concentració de cèl·lules viables, estable, i que permeti el seguiment de la concentració cel·lular des de concentracions cel·lulars molt baixes fins a nivells de confluència.

1.2.1.3 ESPECTROSCÒPIA D'IMPEDÀNCIA

Aquestes problemàtiques esmentades fan que, entre les diferents possibilitats que es desprenen de les diferents tècniques de mesura de la concentració cel·lular, la que disposa de més avantatges i menys inconvenients és la tecnologia basada en l'aplicació de mesures d'espectroscòpia d'impedància. Aquesta tècnica té l'avantatge que permet mesurar directament cèl·lules viables, que en principi són l'objectiu principal de la mesura, donat que són les cèl·lules que estan actives i, per tant, produeixen el producte d'interès. En canvi, té l'inconvenient de ser una tècnica poc desenvolupada. La col·laboració existent entre el grup de recerca en què s'ha efectuat aquest treball i el grup de recerca del Departament d'Enginyeria Electrònica de la Universitat Politècnica de Catalunya ha permès explorar la possibilitat d'aplicació d'aquesta tècnica de mesura directa de la concentració de cèl·lules viables.

Els sistemes de mesures de d'espectroscòpia d'impedància, l'explicació dels quals es troba àmpliament desenvolupada en el capítol 4, són basats en l'anàlisi dielèctric de cultius cel·lulars, essent una tècnica atractiva a fi d'estimar la concentració cel·lular ja que és un sistema de monitoratge automatitzat en temps real i aplicable a medis complexos (Kell *i col.*·1990). Les propietats elèctriques dels cultius cel·lulars en el rang de la radiofreqüència són una funció directa i monòtona del radi i la fracció de volum de les partícules (Harris *i col.*·1987). Els mètodes basats en les mesures elèctriques utilitzen la dependència de les variables macroscòpiques d'un material com la conductància (G) i la capacitat (C) o les propietats elèctriques intrínseques com la conductivitat (σ) i la permitivitat (ϵ) amb la fracció de volum cel·lular (P) a un o dos punts de freqüència.

Alguns dels resultats publicats obtinguts amb diferents tipus de cèl·lules han demostrat una relació estreta entre les propietats dielèctriques de cultius cel·lulars, com la capacitat amb la concentració cel·lular (Asami *i col.*·1999; Davey *i col.*·1992; Fehrenbach *i col.*·1992; Markx *i col.*·1991; Matanguihan *i col.*·1994; Mishima *i col.*·1991b), donant un senyal lineal fins a alts nivells de concentració cel·lular (Harris i Kell·1983). Aquests fets fan que aquest mètode de seguiment de la concentració cel·lular hagi estat utilitzat en cultius de procariotes, tant a 2 elèctrodes (també anomenada tècnica a 2 fils, (Radke i Alocilja·2004) com a 4 elèctrodes (també anomenada tècnica a 4 fils, (Soley *i col.*·2005), en cultius de cèl·lules animals en suspensió, tant a 2 fils com a 4 fils (Gámez·2000) i finalment en cultius de cèl·lules en monocapa a 2 fils (Borkholder·1998).

A més, aquests sistemes s'han utilitzat per a l'obtenció d'informació sistemàtica sobre l'estat de les cèl·lules en cultius de llevats (Asami i Yonezawa·1995), mentre que altres autors (Austin *i col.*·1994; Mishima *i col.*·1991a) han demostrat una relació, encara que no quantitativament, entre la capacitat i els canvis en la fase de creixement estacionària i la viabilitat cel·lular, evidenciant la potencialitat de l'ús de la espectroscòpia dielèctrica com una eina per detectar canvis en l'estat fisiològic de les cèl·lules (Matanguihan *i col.*·1994).

El quart capítol del present treball, es focalitzarà en el desenvolupament i la validació d'un sistema de mesura de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules adherents, basat en l'espectroscòpia d'impedància mesurada a 4 fils (els sistemes de mesura a 2 i 4 fils es troben explicats al llarg d'aquest capítol), mitjançant la utilització de microelèctrodes interdigitats i la seva implementació a escala de minibioreactors.

1.2.2 MONITORATGE DE L'ACTIVITAT CEL·LULAR

Tot i la possibilitat de la implementació de mesures directes de la concentració cel·lular, a vegades es fa necessària la implementació d'altres mètodes que aportin una informació similar, ja sigui com a substitució dels mètodes directes o per motius econòmics o per obtenir una complexitat molt més senzilla dels sistemes de mesura, o com a mesura complementària a la obtinguda a partir dels propis mètodes directes. Aquests, són els mètodes indirectes per a la determinació de la concentració cel·lular, es basen en les mesures de l'activitat cel·lular en els cultius i permeten la determinació de l'estat fisiològic dels cultius cel·lulars.

D'aquesta manera, es torna en una eina útil no només per controlar la correcta evolució del cultiu, sinó que també es fa necessària pel control de processos que tenen una estratègia de cultiu amb una alimentació compensada i, en determinats processos, és necessària per a la determinació de diferents temps claus, com per exemple, el càlcul del TOA (*time of action*) en processos d'infecció vírica, essent el TOA el moment idoni per, o bé iniciar una estratègia de cultiu (*time of feed*, TOF), o bé procedir en la infecció cel·lular (*time of infection*, TOI), tal i com es pot observar a la figura 1.14, on es mostra com es mesura el TOA a partir de la determinació de la OUR (esquerra), amb les diverses alternatives d'actuació que ofereix aquest sistema de monitoratge de la velocitat de consum d'oxigen (dreta).

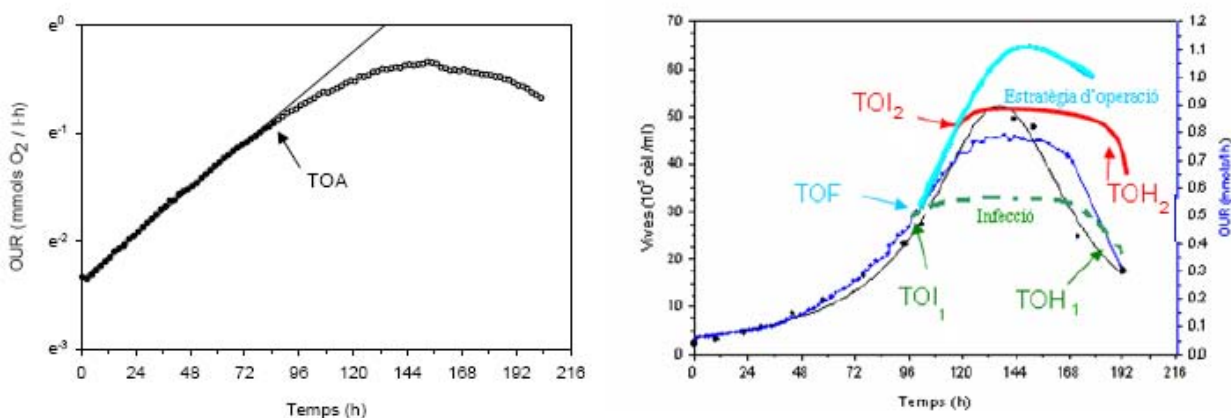


Figura 1.14 Monitoratge del perfil de la OUR en front el temps (esquerra) per a la determinació del final de la fase de creixement exponencial i, per tant el temps d'acció (TOA), amb les diferents alternatives d'actuació que ens presenta la detecció d'aquest temps (dreta). En els primers moments d'actuació es pot iniciar una estratègia de cultiu (TOF) o procedir en la infecció (TOI), i finalment el temps d'aturada (TOH). (Lecina i col. 2004).

Per aquestes raons, s'ha fet èmfasi en els darrers anys en monitorar variables que aporten aquesta informació necessària, com és el cas de la velocitat de consum d'oxigen (OUR) (Behrendt i col. 1994), el potencial redox (Higareda i col. 1997), la velocitat de flux de calor (Guan i col. 1998) i l'evolució de la

concentració de diòxid de carboni (De Tremblay *i col.*·1993). Els principals mètodes de mesura de l'activitat cel·lular amb els principals avantatges i desavantatges es troben resumits a la taula 1.5.

Taula 1.5 Mètodes indirectes pel monitoratge en temps real de l'activitat cel·lular. (Gámez·2000)

Mètode	Avantatges	Desavantatges	Referències
Estimació basada en la velocitat de consum d'oxigen (OUR)	Concepte senzill. Relativament fàcil d'implementar.	Validesa limitada. Suposa que la velocitat específica de consum d'oxigen (SOUR) és constant.	(Ozturk <i>i col.</i> ·1997a)
Estimació basada en la velocitat d'evolució de CO ₂ (CER)	Concepte senzill.	CER és més difícil de determinar. Requereix espectròmetre de masses . L'estimació suposa grans errors.	(De Tremblay <i>i col.</i> ·1993)
Estimació basada en la velocitat de producció d'ATP (APR)	Concepte que ha de ser més acurat que l'estimació basada en l'OUR.	La suposició que l'APR és constant pot no ser vàlida. Requereix estimació de l'OUR i el LPR.	(Dorresteyn <i>i col.</i> ·1996; Eyer <i>i Heinzle</i> ·1996)
Estimació basada en la velocitat de consum de substrats o producció de productes	Concepte senzill. Molt utilitzat, sobretot mitjançant el seguiment de la glucosa, làctic, glutamina i amoni.	Només vàlid durant la fase exponencial. Majoria de sistemes de mesura en línia complexos composts de sistemes mostreig, filtrat i anàlisi.	(Campmajo <i>i col.</i> ·1994; Kurokawa <i>i col.</i> ·1994)

Com es pot observar, les metodologies d'estimació indirecta de la biomassa es basen en suposicions que no sempre es poden complir, i dependran de diferents variables, com la fase cel·lular en la que es troben. De forma general, la mesura d'activitat serà directament relacionable amb la concentració cel·lular mentre els cultius es mantinguin en fase exponencial. De totes maneres, encara que la correlació entre concentració cel·lular i activitat no es mantingui, aquesta mesura resulta d'un gran interès, ja que indica l'estat del cultiu en temps real en qualsevol de les fases d'un cultiu cel·lular, fet que permet donar resposta a possibles desviacions dels valors òptims. Per exemple, ens podríem trobar en que arribem a un exhauriment d'un nutrient essencial, moment en que una mesura directa de la concentració cel·lular només ens permetria detectar l'accident aproximadament després de d'unes hores, mentre que una mesura d'activitat permet una detecció pràcticament immediata, de l'alentiment del metabolisme cel·lular.

Tot i que el sistema de mesura basat en la velocitat de consum de substrats o producció de subproductes es molt senzilla i àmpliament utilitzada quan la mesura es realitza fora de línia, quan aquesta s'ha de realitzar en línia es complica el sistema de mesura, fent que la metodologia més senzilla pel seguiment en línia de l'activitat cel·lular sigui la que utilitza la velocitat de consum d'oxigen com a paràmetre a seguir (Konstantinov *i col.*·1994), mentre que dels diferents mètodes pel monitoratge de l'OUR, el que

proporciona millors avantatges és el mètode dinàmic (Gámez·2000), l'explicació del qual es troba àmpliament desenvolupat en el capítol 3, que només necessita del sensor estàndard pel seguiment de la concentració d'oxigen, i es basa en el perfil del descens en la concentració d'oxigen entre dues concentracions conegudes propiciat per la respiració cel·lular quan hi ha una aturada en el subministrament d'aire en el cultiu.

Aquestes propietats fan que la mesura de l'activitat cel·lular es transformi en un paràmetre clau pel monitoratge i control de cultius cel·lulars, tant per a cèl·lules en suspensió, en els que ja s'ha vist que els sistemes més simples perden fiabilitat fora de la fase exponencial dels cultius, com per a cèl·lules adherents, en que els mètodes directes de determinació de la concentració cel·lular són actualment bastant complexes i es troben encara poc desenvolupats. Per aquesta raó, el tercer capítol del present treball, es focalitzarà en la implementació, validació i optimització d'un sistema de mesura de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents a escala de minibioreactors, basat en la mesura de la OUR.

1.3 ENGINYERIA CEL·LULAR I TISSULAR: LA REGENERACIÓ DE TEIXITS

L'àrea de les teràpies cel·lulars i tissulars, més conegudes amb el nom de medicina regenerativa, és una àrea emergent que es va definir en el primer congrés de la "National Science Foundation" al 1988 com *"l'aplicació dels principis i mètodes de l'enginyeria i les ciències de la vida pel coneixement de la relació entre estructura-funció en teixits humans i sans i el desenvolupament de substituts biològics per a la reparació o regeneració de les funcions de teixits i òrgans"*. Més tard, Langer i Vacanti el 1993, acabaren de concretar la definició de l'enginyeria tissular com "un camp emergent i interdisciplinari que aplica els principis de la biologia i l'enginyeria pel desenvolupament de substituts viables per restaurar, mantenir i millorar el funcionament de teixits humans" (Langer i Vacanti·1993).

Tot i que encara és un camp molt recent i tot just ha començat a oferir productes comercials a petita escala, amb només 4 productes al 2004 i sense obtenir gaire èxit comercial, com per exemple la pell artificial o els condrocits autòlegs, existeixen nombrosos articles recents indicant-ne perspectives d'èxit clínic en aproximadament 15 anys (Hellman i Nerem·2007; Johnson i col··2007; M.A.T.E.S·2007; Vunjak-Novakovic i Kaplan·2006). A més, aquests tipus de teràpies s'han vist enormement impulsades amb el sorgiment de la tecnologia de les cèl·lules mare, capaces d'evolucionar cap a tots els diferents tipus cel·lulars especialitzats d'un teixit de l'organisme, amb l'esperança de que el fet d'aprendre com controlar

la diferenciació i el creixement d'aquestes cèl·lules permeti el desenvolupament de nous tractaments per afrontar una ampla varietat de problemàtiques mèdiques.

Aquest impuls provinent de la tecnologia de les cèl·lules mare queda reflectit a la figura 1.15, on es troben representades les perspectives previstes pels ingressos anuals als estats units provinents d'aquestes teràpies basades en la utilització de cèl·lules mare publicades al "Stem Cell Market Analysis Fact Sheet" de la "2nd Annual Stem Cell Summit" (Febrer 2007, San Diego).

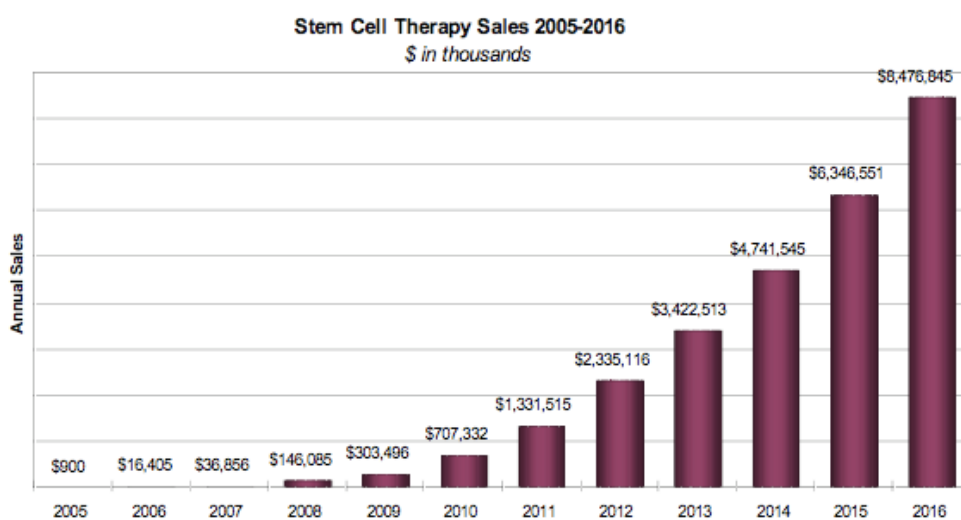


Figura 1.15 Estimació dels ingressos anuals per vendes als Estats Units provinents de teràpies basades en la utilització de cèl·lules mare.

Es pot observar que tot i que els ingressos actuals provinents de teràpies basades en les cèl·lules mare són bastant petits, les perspectives actuals segueixen una clara tendència a augmentar exponencialment al llarg dels propers anys de manera que, tot i que encara es trobaran lluny dels ingressos per vendes obtinguts a partir de teràpies bioquímiques i biofarmacèutiques, els ingressos provinents de tecnologies basades en les cèl·lules mare significaran una part bastant important dins el total d'ingressos per productes biotecnològics.

Això fa que aquestes perspectives, juntament amb la gran varietat i importància de les sortides de què disposen els productes obtinguts, atorguen un gran potencial a l'enginyeria de teixits, fent que la suma acumulada de diners invertits en la corresponent I+D d'aquesta tecnologia als Estats Units arribi a un total de 4,5 bilions de dòlars a data de 2004 (Lysaght i Hazlehurst·2004).

1.3.1 APLICACIONS, ESTRATÈGIES I BASES DE L'ENGINYERIA DE TEIXITS

Tal i com descriu la seva definició, el principal propòsit de l'enginyeria tissular és intentar donar una solució viable al problema de la regeneració de teixits i òrgans, on el conjunt de tècniques clàssiques utilitzades actualment basades en la medicina tradicional, compten amb grans limitacions que la fan totalment inviable. Aquestes limitacions fan que, només a Europa hi hagués aproximadament 62.000 persones en llista d'espera per un transplantament d'òrgan durant l'any 2004, de les quals unes 3.500 varen morir en llista d'espera (dades del Ministeri de Sanitat i Consum,(Ministerio·2004)).

Per a aconseguir aquest propòsit, l'enginyeria tissular conta de tres estratègies principals, on la utilització d'una o altre estratègia dependrà del teixit o òrgan que s'hagi de tractar, així com del grau i del tipus de lesió que aquest presenti: (Stoltz i col.·2006):

- Implantació de cèl·lules directament aïllades o aïllades i cultivades. En aquesta primera estratègia, grups de cèl·lules individuals o petits agregats cel·lulars del pacient són injectats en el teixit danyat. En alguns casos, prèviament a la injecció, les cèl·lules són cultivades i expandides *in vitro*.

- Implantació de teixit generat *in vitro* a partir de cèl·lules i estructures de suport (polímers). En aquesta segona estratègia, s'implanta un teixit tridimensional format per una matriu de suport per a les cèl·lules del propi pacient en el teixit danyat. De la mateixa manera que en el primer dels casos, aquest teixit tridimensional pot ser implantat directament en el teixit danyat un cop es disposa de les cèl·lules a l'interior de la matriu, o bé aquest teixit pot ésser cultivat *in vitro* prèviament.

- Regeneració de teixit *in situ*. Finalment, l'última de les estratègies consisteix en la implantació directe d'un polímer o estructura de suport en el teixit danyat per tal que les pròpies cèl·lules del pacient promoguin la reparació local del teixit a partir d'estímuls químics.

A partir de les diferents estratègies terapèutiques en l'enginyeria tissular, es poden deduir quines són les eines utilitzades per a dur-les a terme. Aquestes eines també són anomenades com a els pilars de l'enginyeria tissular i s'hi inclouen, tal i com es mostra a la figura 1.16, les cèl·lules, els polímers o matrius, els senyals i finalment un entorn controlat per a poder obtenir una combinació correcta de tots ells i així generar el teixit desitjat. Tots i cada un dels pilars té una importància molt elevada dins de l'enginyeria de teixits i la tria de cada una de elles, així com la tria de les interaccions entre elles dependrà del tipus de teixit o òrgan que es vulgui tractar i del grau i tipus de lesió existent.

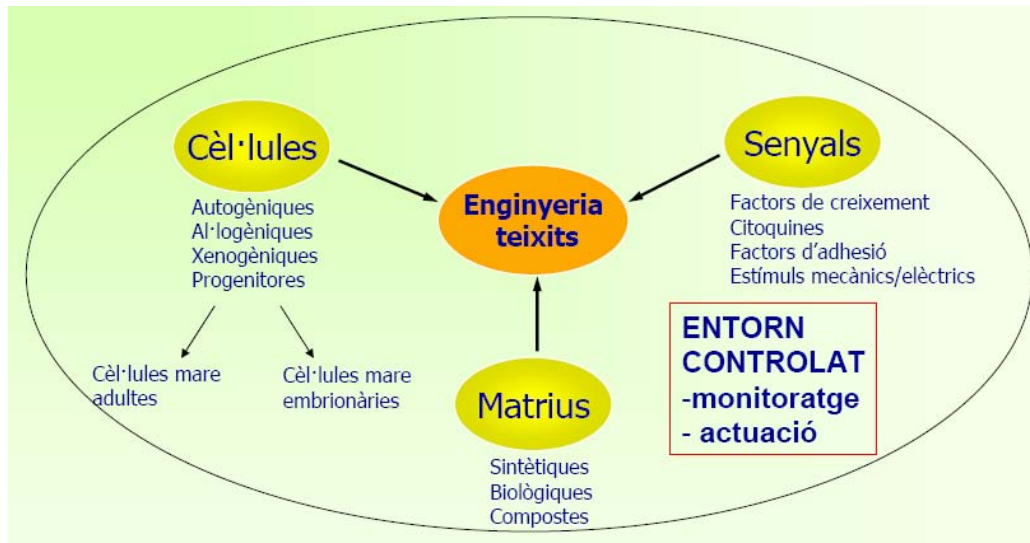


Figura 1.16 Els quatre pilars bàsics de l'enginyeria tissular: les cèl·lules, les matrius i els senyals, tot en un entorn controlat.

1.3.1.1 LES CÈL·LULES

Les cèl·lules, el component biològic de l'enginyeria de teixits, és una de les eines fonamentals per tal de restaurar, millorar o mantenir les funcions d'un teixit o òrgan no funcional, ja que representen els components bàsics que de forma conjunta realitzen les funcions pròpies de tot teixit o òrgan i, per tant, seran indispensables en les teràpies cel·lulars i tissulars. No obstant, l'extracció de les mateixes no sempre serà necessària i dependrà de les característiques pròpies del teixit o òrgan que es vulgui regenerar (taula 1.6).

Taula 1.6 Classificació dels diferents tipus de teixits segons la corresponent capacitat de reparació mostrada *in vivo*.

Tipus de teixit	Capacitat de reparació present
Teixit connectiu: os.	Regeneració espontània
Teixit connectiu: cartílag articular, lligament, disc intervertebral, altres.	Reparació
Teixit Epitelial: epidermis, altres.	Regeneració espontània
Teixit muscular: llis.	Regeneració espontània
Teixit muscular: cardíac	Reparació
Teixit nerviós	Reparació

D'aquesta manera, en el cas que aquest òrgan o teixit es trobi dotat d'una capacitat de regeneració espontània, és a dir, que de forma natural o mitjançant estimulació, el teixit o òrgan danyat recupera les funcions pròpies, no cal l'extracció de les cèl·lules, mentre que si el teixit o òrgan a regenerar només es troba dotat de la capacitat reparadora inherent dels teixits, és a dir, a la reparació del teixit però amb pèrdua de la seva funcionalitat, aleshores en caldrà la seva extracció.

Un factor important a tenir en compte en cas d'utilitzar una font cel·lular per a la regeneració de teixits, n'és la seva procedència, de manera que es pot partir de cèl·lules autòlogues del propi pacient, cèl·lules al·logèniques d'un donant i xenogèniques d'una altra espècie, tot i que aquestes últimes dues s'han de descartar al poder donar alguna reacció immunològica al pacient o una contaminació per patògens, a part que no aportarien una millora considerable a les teràpies actuals de regeneració. A la vegada, cada font cel·lular pot estar formada per cèl·lules adultes ja diferenciades, cèl·lules adultes no diferenciades, també anomenades cèl·lules mare adultes o bé pot estar formada per cèl·lules embrionàries, també conegudes com a cèl·lules mare embrionàries.

La utilització de cèl·lules autogèniques adultes diferenciades del propi pacient depèn de la possibilitat i repercussions de l'extracció. Com a exemple, l'extracció de cèl·lules del cor (miocardiòcits) no és factible per les pròpies repercussions en la salut del malalt, mentre que l'extracció de cèl·lules del cartílag hialí (condròcits) és possible mitjançant una senzilla artroscòpia i les repercussions per la salut del malalt són mínimes (Marcacci *i col.* 2002). L'altre requisit que s'ha de complir per a la utilització de cèl·lules autogèniques adultes diferenciades del propi pacient, és la capacitat de dividir-se *in vitro*.

Quan el teixit o òrgan que es vol regenerar no compleix els requisits necessaris, s'ha de recórrer a altres fonts cel·lulars que permetin una extracció cel·lular sense greus perjudicis pel malalt, una elevada capacitat de divisió o proliferació *in vitro* i que presentessin les mateixes característiques estructurals i funcionals que el teixit o òrgan a regenerar. Sota aquesta finalitat, es va començar a investigar la utilització de cèl·lules mare embrionàries i cèl·lules mare adultes.

Per una banda, les cèl·lules mare embrionàries són cèl·lules que deriven de la massa interna de l'embrió en l'estadi de blastocit, és a dir, entre 7 i 14 dies. Són cèl·lules pluripotencials ja que tenen la capacitat de diferenciar-se cap a les tres capes embrionàries principals (figura 1.17): ectoderma, endoderma i mesoderma (Odorico *i col.* 2001) i, per tant, poden donar lloc a qualsevol de les més de 200 línies cel·lulars existents en el cos humà (Thomson 1998).

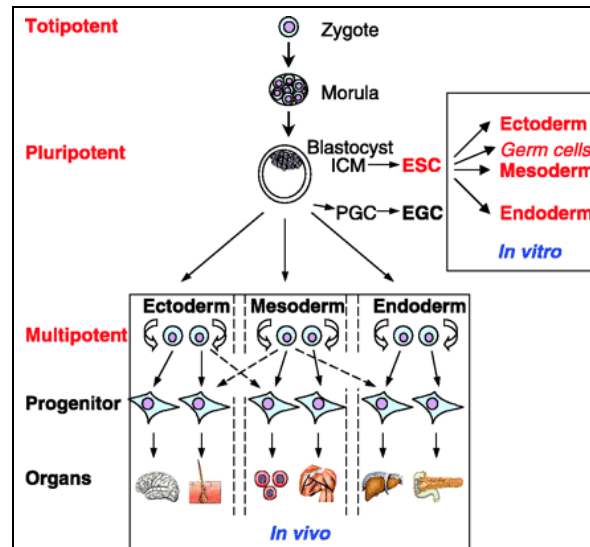


Figura 1.17 Situació de les cèl·lules mare embrionàries (*embryonic stem cells*, ESC) i de les cèl·lules mare adultes (*adult stem cells*, ASC). (Wobus i Boheler·2005)

Tot i la seva pluripotencialitat i que es poden cultivar *in vitro* obtenint una elevada capacitat de proliferació, aquestes cèl·lules embrionàries tendeixen a formar teratomes quan no es troben diferenciades i poden presentar rebuig immunitari ja que no es poden obtenir de l'individu adult, fet que fa que es necessitin estratègies de manipulació genètica per tal de superar aquestes problemàtiques. A part dels reptes científics que encara queden per determinar, la utilització de cèl·lules mare embrionàries presenta avui dia problemes ètics i legals. D'aquesta última observació, cal esmentar que al 2004 es va aprovar a Espanya el Reial Decret 2132/2004 que permet l'ús per a la investigació de cèl·lules mare embrionàries humanes a partir de preembrions congelats sobrants dels processos de fecundació *in vitro*, que segurament farà avançar molt en el coneixement i les possibilitats terapèutiques de les cèl·lules mare embrionàries en un futur no molt llunyà.

Per altra banda, les cèl·lules mare adultes són cèl·lules no diferenciades que es troben en teixits i òrgans de tot mamífer adult (M. P. Vacanti *i col.*·2000) i la seva funció és la de proveir el cos de la necessitat de cèl·lules especialitzades mitjançant la corresponent transformació o diferenciació. Un clar exemple són les cèl·lules mare hematopoiètiques que diàriament donen lloc a 200 bilions de glòbuls vermells. Inicialment, es pensava que les cèl·lules mare adultes només podien diferenciar-se cap a una sola línia cel·lular, però actualment s'ha demostrat que moltes de les cèl·lules mare adultes que trobem en els diferents teixits i òrgans, tenen la capacitat de diferenciar-se en més d'un tipus cel·lular diferent al llinatge característic del teixit en el que resideixen (multipotencialitat).

Dins d'aquest grup se'n destaquen les cèl·lules mare mesenquimals, que són una subpoblació de cèl·lules que resideixen a l'estroma del moll de l'os que representa entre el 0,001% i el 0,01% de les cèl·lules nucleades del moll de l'os, és a dir, uns 10 cops menys abundants que les cèl·lules mare hematopoètiques, però amb l'avantatge que es poden expandir *in vitro* amb certa facilitat. La multipotencialitat d'aquesta línia cel·lular les permet diferenciar-se en condrocits, osteoblasts, adipòcits, i en tots aquells tipus cel·lulars d'origen mesenquimal (representat a continuació a la figura 1.18), encara que algunes poblacions han exhibit una capacitat per diferenciar-se en tipus cel·lulars derivats de teixits de qualsevol de les tres capes embrionàries (Jiang *i col.* 2002; Reyes *i col.* 2001), trencant el dogma que les cèl·lules mare derivades d'un teixit adult només poden produir llinatges característics del teixit en el que resideixen. Aquest fenomen s'ha anomenat plasticitat o transdiferenciació.

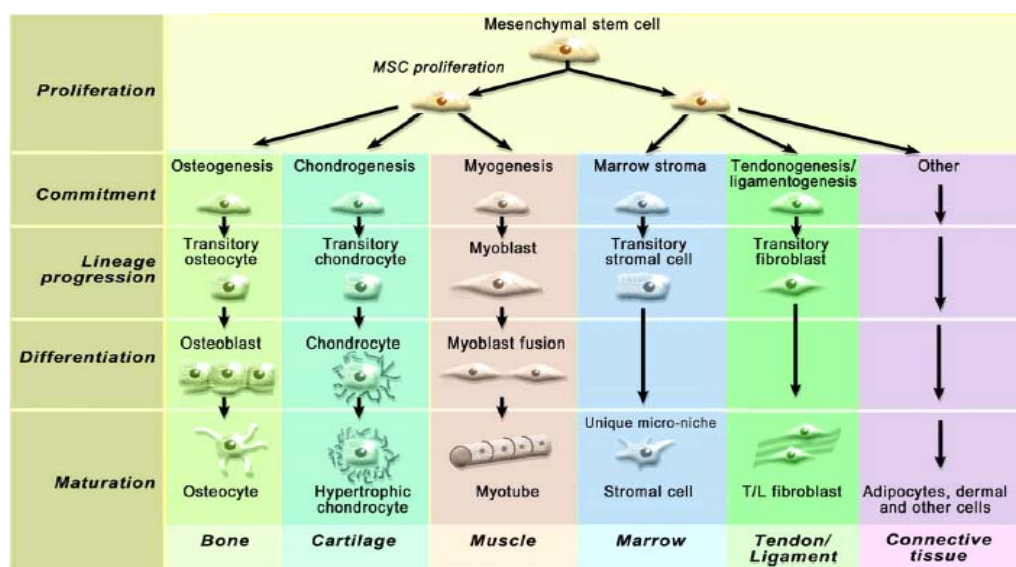


Figura 1.18 Esquema de multipotencialitat de les cèl·lules mare adultes mesenquimals humanes del moll de l'os. (A.I. Caplan 1994)

Amb aquesta multipotencialitat i tenint en compte que a diferència de les cèl·lules mare embrionàries, no formen teratomes, que no presenten rebuig immune al ser extretes del propi pacient, i que no existeixen repercussions ètiques ni legals, fa que aquests tipus cel·lulars permetin salvar l'escull presentat amb la utilització de cèl·lules mare embrionàries per a la regeneració de teixits i òrgans. Per aquesta raó, actualment les cèl·lules mare adultes són les línies cel·lular més indicades per a teràpia cel·lular i tissular.

1.3.1.2 ESTRUCTURES DE SUPORT O MATRIUS

El fet d'incorporar les matrius o polímers neix de la necessitat de superar les dificultats que representa la regeneració dels diferents teixits i òrgans amb característiques i peculiaritats pròpies. Juntament amb les propietats de regeneració presents en els diferents teixits (taula 1.6), s'ha de considerar la capacitat

migratòria de les cèl·lules per tal de regenerar un dany o lesió en un teixit o òrgan, es a dir, la capacitat de localitzar la zona danyada i realitzar el confinament en la mateixa de les cèl·lules encarregades de la regeneració. Com a exemple, una petita fractura en un ós no té conseqüències majors i no requereix més que el redireccionament de la zona afectada, ja que les cèl·lules encarregades de la regeneració de l'ós es troben dotades d'una capacitat regeneradora i migratòria, mentre que una lesió en el cartílag articular presenta moltes més complicacions amb la necessitat d'intervenció quirúrgica i, en molts casos, deficiències funcionals futures, degut a que les cèl·lules encarregades de la regeneració del cartílag hialí no tenen capacitat regeneradora ni migratòria.

Per tant, és en aquests casos en que es fa imprescindible una estratègia terapèutica que proporcioni cèl·lules amb les característiques estructurals i funcionals corresponents al teixit o òrgan a regenerar a la zona lesionada, però mitjançant la inclusió de les mateixes en un polímer per evitar la necessitat de la migració i la seva dispersió. A més, en alguns casos en què el teixit o òrgan presenta capacitat regeneradora i migratòria també s'aplica una teràpia cel·lular i tissular amb polímers per tal de facilitar la migració cel·lular a la zona afectada i proveir a les cèl·lules corresponents d'un ambient adequat per a la seva diferenciació i manteniment (C. A. Vacanti *i col.* 1992), o bé quan aquesta lesió és massa greu per realitzar una teràpia cel·lular sense la presència de polímers. Finalment, la utilització de polímers també pot ser necessària com a eina de generació d'estímuls de creixement i diferenciació cel·lular quan les pròpies cèl·lules no siguin capaces de dirigir-se per si soles cap aquelles característiques estructurals i funcionals pròpies del teixit o òrgan que es vulgui regenerar.

En funció del teixit o òrgan al que s'ha d'aplicar el polímer, aquest haurà de tenir un conjunt de propietats diferents pel que fa a l'estructura de suport i a la seva capacitat d'estímul cel·lular. Aquestes variables en són les propietats físiques del polímer, les propietats de transport i les propietats biològiques.

Pel que fa a les propietats físiques del polímer, aquestes inclouen el mecanisme de formació, les característiques mecàniques del mateix i el seu grau de degradació. Primerament, el mecanisme de formació del polímer es determinarà en funció de si volem aplicar una teràpia *in vitro* amb polímer més cèl·lules o *in situ* només amb polímer. Per altra banda, les propietats mecàniques del polímer dependran del tipus de polímer, de la seva concentració i del mètode de polimerització utilitzat, determinant-ne l'elasticitat, la compressibilitat, la viscositat, la força de tensió i velocitat de degradació del mateix. Aquestes propietats macroscòpiques que hauran de tenir els diferents polímers variaran segons la funció del teixit a reparar. Per exemple en la regeneració de teixit cardíac, es requerirà un polímer amb elevada capacitat de compressió, elasticitat i força de tensió, per tal de suportar les forces de contracció pròpies de

les cèl·lules del cor. Finalment, el grau de degradació d'un polímer ens permetrà mantenir l'estructura tridimensional durant més o menys temps en funció del requeriment específic de cada teixit i òrgan per a la seva regeneració.

Pel que fa a les propietats de transport del polímer, aquestes ens determinaran el grau de difusió molecular. Tot i que tots els polímers requeriran d'un mínim de difusió, tan pels components bàsics per a la supervivència cel·lular (Oxigen, glucosa, vitamines....) com pels productes residuals del metabolisme cel·lular (àcid làctic, CO₂....), en alguns casos serà necessari utilitzar un polímer que permeti la difusió de grans molècules o molècules amb càrrega, mentre que en altres casos aquesta difusió no serà necessària.

Finalment, el polímer haurà de presentar unes propietats biològiques, tant a l'estimulació cel·lular cap a aquelles característiques funcionals i estructurals desitjades, com a la no toxicitat cel·lular i inducció de resposta inflammatòria al teixit tractat, que s'adeqüin al teixit o òrgan a regenerar.

Com a conseqüència de les diverses propietats esmentades que han de complir els polímers en funció del teixit o òrgan a regenerar, la quantitat i varietat de polímers que s'han investigat per a la seva utilització en l'enginyeria tissular són considerables. Actualment, els polímers es diferencien en funció del seu origen dividint-se en naturals o sintètics i la selecció d'un o altre en dependrà de les avantatges i desavantatges que presenten. Mentre que els polímers naturals gaudeixen d'una millor adhesió cel·lular i d'una millor capacitat de promoure la diferenciació cel·lulars, els polímers sintètics tenen les avantatges de l'obtenció de polímers reproduïbles, poden ser dissenyats per a una degradació controlada i solen tenir una menor resposta immune o toxicitat. Com a exemples tenim el col·lagen, l'àcid hialurònic, l'alginat, el chitosan i la fibrina com a naturals i els polilàctics i els polièsters com el poliglicòlic (PGA) i el poli-L-lactic-co-glicòlic (PLGA), els polieteresters com la polidioxanona i el polietilenglicol com a polímers sintètics.

A part de la classificació dels polímers en funció del seu origen, natural o sintètic, aquests també poden ser classificats en funció del seu estat, sòlid o en forma d'hidrogel, que atribuiran unes característiques determinades als diferents polímers. En estat sòlid trobem el que es coneix com a malla (Freed *i col.*·1993) i esponja (Karageorgiou i Kaplan·2005) i permeten l'obtenció de polímers amb característiques reproduïbles pel que fa a la mida de porus de la matriu (Schoof *i col.*·2001), mentre que els polímers en forma d'hidrogel miren de mimetitzar les característiques pròpies de la matriu extracel·lular que trobem en els diferents teixits i òrgans, caracteritzada per una elevada hidratació (més del 30% del seu pes).

1.3.1.3 ELS SENYALS QUÍMICS I FÍSICS

Quan la regeneració tissular inclogui la utilització de cèl·lules, sigui quina sigui la font cel·lular o es necessiti o no de polímers, aquestes poden presentar certes limitacions pel que fa a la seva capacitat de diferenciació cap a les característiques pròpies del teixit que volem regenerar, a la capacitat de proliferació per obtenir un nombre suficient de cèl·lules capaces de formar un teixit, o bé a la seva capacitat de migració a la zona lesionada no és la correcta. Aquestes limitacions fan que sigui necessària la utilització de diferents senyals físics i químics.

Pel que fa als senyals o estímuls químics, aquests són proteïnes (o pèptids) que s'uneixen a receptors de membrana cel·lular i que activen un seguit de cascades de senyals intracel·lulars que derivaran amb l'activació de la proliferació cel·lular, la diferenciació cel·lular i la migració cel·lular. Els reguladors bioquímics que s'utilitzen actualment són els factors de creixement i les citoquines, com les interleuquines i els interferons.

Per altra banda, els senyals o estímuls físics representen totes aquelles forces externes que es poden aplicar en una cèl·lula, ja sigui mitjançant la pressió exercida al fer circular un fluid, per la pressió exercida per un element sòlid o el moviment induït a l'aplicar un corrent elèctric i que provoquen una resposta cel·lular en forma de migració cel·lular (S. Li *i col.*·2005), proliferació cel·lular (Q. Li *i col.*·1997) i secreció de transmissors i diferenciació cel·lular (Chicurel *i col.*·1998; Riha *i col.*·2005). El procés mitjançant el qual les cèl·lules interpreten les forces físiques i les tradueixen per adoptar els canvis cel·lulars corresponents, és encara avui dia desconegut, tot i que una de les hipòtesis és que una proteïna clau de la membrana extracel·lular actua com un mecanosensor i mecanotransductor, permetent convertir una senyal física en una de química que desencadenaria una cascada de senyals intracel·lulars que determinarien els canvis cel·lulars específics.

De les funcions o respostes obtingudes a partir de l'aplicació d'estímuls físics, la més buscada és la d'aconseguir la correcta diferenciació de les línies cel·lulars, siguin les que siguin. Per a aconseguir-ho, els estímuls físics més utilitzats són l'estimulació mecànica (Altman *i col.*·2001) i l'estimulació per camps elèctrics (Sauer *i col.*·1999), fent que surtin una gran quantitat de sistemes experimentals per tal d'aplicar aquests estímuls a diverses línies cel·lulars incloses en matrius (Bursac *i col.*·1999; Eschenhagen *i col.*·1997; Kofidis *i col.*·2002; Zimmermann *i col.*·2001).

Per una banda, al llarg del cinquè capítol del present treball, es començarà amb el seguiment de les principals aplicacions dels cultius cel·lulars per a una línia cel·lular animal adherent, en concret de les cèl·lules *vero*. Aquests processos a monitorar en són la caracterització del creixement cel·lular sobre plàstic, la caracterització d'efectes citotòxics de molècules sobre cultius confluents i la caracterització del creixement cel·lular sobre suports per a produccions a gran escala. Seguidament, al sisè capítol del treball, s'entrarà al seguiment en aplicacions d'enginyeria tissular, tant per a la regeneració condrocitària com per a la regeneració cardíaca. Al llarg d'aquest capítol, s'anirà comprovant per a les dues aplicacions, els efectes de diferenciació provocats a l'afegir, al sistema, cada un dels diferents pilars de l'enginyeria tissular esmentats; les cèl·lules, els senyals químics i físics i les estructures de suport encarregades d'aportar un entorn tridimensional òptim.

1.4 PLANTEJAMENT DEL PRESENT TREBALL

Tant per aspectes de desenvolupament (diferents medis, línies cel·lulars...), com pel desenvolupament de teràpies personalitzades, com ho són les cel·lulars i tissulars, el grup de recerca (Grup d'Enginyeria Cel·lular i Tissular de la UAB, GECiT) on s'ha efectuat aquest treball està desenvolupant una plataforma de múltiples minibioreactors en miniatura, i d'un sol ús, anomenada HexaScreen. Per aquesta raó, els desenvolupaments efectuats en aquest treball han estat enfocats i dissenyats per a complementar aquesta plataforma, plataforma en la que també s'han anat realitzant la resta d'experiments que s'han anat duent a terme al llarg del treball.

Així doncs, el que fa al treball que es presenta a continuació, aquest es centra en l'adequació de sistemes de mesura en línia pel monitoratge de les principals variables biològiques (concentració i activitat cel·lular) en la plataforma HexaScreen, pel cultiu múltiple de cèl·lules animals adherents a escala de minibioreactors, que permeti realitzar un pas endavant en les tecnologies necessàries pels diferents camps i aplicacions en els cultius de cèl·lules animals. Aquest treball es troba enfocat al cultiu de cèl·lules animals adherents, ja que les respectives eines de monitoratge actuals es troben molt poc desenvolupades i optimitzades en comparació amb les tecnologies presents enfocades al cultiu de cèl·lules animals en suspensió.

D'aquesta manera, el treball es troba dividit en dues parts principals (esquematitzat a continuació a la figura 1.19), on la primera es troba enfocada en el desenvolupament dels sistemes necessaris de mesura i seguiment en línia de les variables biològiques, i la segona, en la que s'introduiran aquests sistemes desenvolupats en diferents processos i aplicacions del cultiu de cèl·lules animals, monitorant diversos

processos d'expansió cel·lular per a l'obtenció dels paràmetres necessaris per a la optimització dels cultius cel·lular, tant per a la producció d'un producte biotecnològic com per a l'obtenció de la dosi necessària en teràpies cel·lulars i tissulars. D'aquesta manera, es podrà determinar tant la funcionalitat dels sistemes desenvolupats com les pròpies necessitats d'evolució d'aquests.

Així, en la primera part de desenvolupament es partirà del principal sistema actual de seguiment per a cultius de cèl·lules animals adherents, és a dir, el seguiment de l'activitat cel·lular a partir del monitoratge de la velocitat de consum d'oxigen, i se n'optimitzarà el seu funcionament. Seguidament, es desenvoluparà i s'optimitzarà un sistema per a la mesura directa de la concentració cel·lular basat en l'espectroscòpia d'impedància.

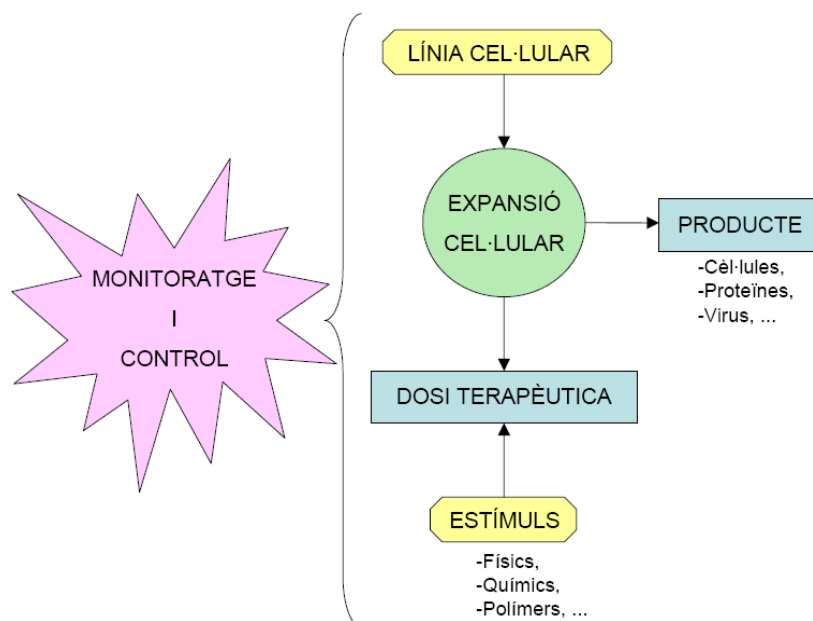


Figura 1.19 Esquema de l'abast del treball. Desenvolupament d'un sistema robust de monitoratge de la concentració cel·lular, i la seva utilització pel control de diferents processos inclosos en teràpies cel·lulars i tissulars.

Per altra banda, en la segona part, s'usaran aquests sistemes desenvolupats en processos emmarcats dins de les diferents teràpies i aplicacions del cultiu de cèl·lules animals adherents per tal d'observar-ne la seva funcionalitat i poder-les evolucionar per a una correcta adaptació a les diverses condicions de cultiu utilitzades en aquestes aplicacions, ja sigui en la línia cel·lular de cultiu, com en la presència d'estructures de suport cel·lular i de senyals químics i físics. Per tant, aquests sistemes s'introduiran en processos, tant per a teràpies cel·lulars (caracterització cel·lular, caracterització de citotòxics i producció cel·lular) com per a teràpies tissulars (caracterització cel·lular, utilització d'estímuls físics i químics per a la diferenciació cel·lular).

CAPÍTOL 2

OBJECTIUS

Tal i com ja s'ha comentat en el capítol anterior, l'objectiu principal que es pretén assolir en aquest treball és el desenvolupament d'un sistema de monitoratge en línia de la concentració i activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents. Aquest sistema ha de disposar d'una mesura robusta, amb una bona sensibilitat i optimitzat per tal de permetre l'obtenció dels paràmetres cel·lulars bàsics en els principals processos de les diferents aplicacions dels cultius de cèl·lules animals adherents.

Així doncs, l'elaboració d'aquest treball es divideix en dues parts: una primera part en el que es realitza el desenvolupament i implementació de les mesures en línia, i una segona part en el que s'utilitzen aquests sistemes de mesura desenvolupats pel seguiment en els processos d'obtenció de cèl·lules de les principals aplicacions dels cultius de cèl·lules animals adherents.

1) Desenvolupament i implementació de les mesures en línia de l'activitat i la concentració cel·lular:

Tal i com s'ha comentat en la introducció, el sistema més senzill i amb més experiència (tal i com es pot observar a l'esquema que es mostra a continuació, figura 2.1), i per tant el més utilitzat, de mesura en línia de la concentració cel·lular en cultius cel·lulars es basa en l'estimació de la concentració cel·lular present en un cultiu a partir de la mesura de l'activitat cel·lular del cultiu. Degut a les característiques dels cultius de cèl·lules animals adherents exposades al capítol anterior (temps de duplicació més elevats, concentracions cel·lulars finals més petites, diferents consums...), hi ha la possibilitat que aquests mètodes d'estimació de la concentració cel·lular no tinguin suficient sensibilitat.

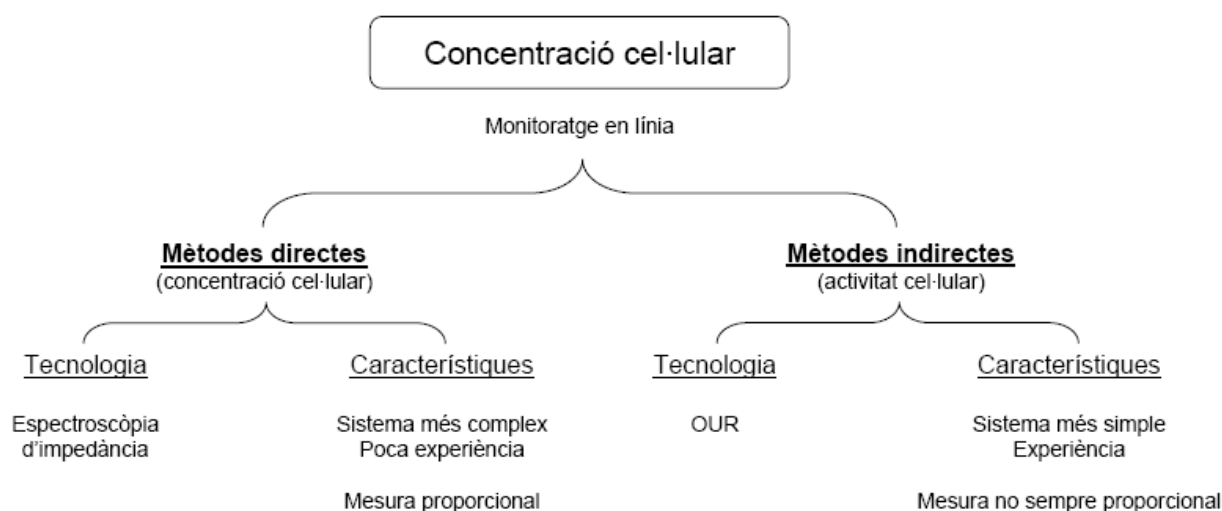


Figura 2.1 Esquema de les tecnologies a desenvolupar per a la obtenció d'una mesura en línia de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents

Així doncs, a més de l'adaptació d'una mesura de l'activitat cel·lular (a partir de mesures d'OUR), s'efectuarà el desenvolupament i la implementació d'una mesura directa de la concentració cel·lular (basada en l'espectroscòpia d'impedància) per a poder-la utilitzar en els cultius amb els que no es pugui obtenir una mesura d'activitat amb suficient sensibilitat. Els diferents passos a seguir, així com els corresponents objectius associats, es detallen a continuació:

- Primerament és necessària l'adaptació del sistema de cultiu cel·lular i monitoratge (sistema de minibioreactors) al cultiu de cèl·lules animals adherents per tal d'obtenir uns creixements en aquest sistema de cultiu que siguin representatius dels creixements obtinguts en els sistemes de cultiu cel·lular estàndards per a cèl·lules adherents.
- Adaptació d'una mesura en línia de l'activitat cel·lular, la mesura d'OUR mitjançant la utilització de sondes polarogràfiques per a la mesura de l'oxigen dissolt en el medi, en cultius de cèl·lules animals adherents. Millora de la robustesa i la fiabilitat de la mesura de l'oxigen dissolt, a partir de la substitució del sistema basat en mesures polarogràfiques per un sistema basat en mesures òptiques. Desenvolupament i optimització d'una membrana per a la mesura òptica d'oxigen, incloent la selecció del fluorofor sensible a l'oxigen, l'elecció del mètode de detecció de la corresponent fluorescència emesa i la selecció de la matriu i el protocol de fabricació òptims. Un cop obtinguda una membrana amb una robustesa i sensibilitat bones, es determinarà el rang de concentracions mesurables i la toxicitat obtingudes per a la membrana desenvolupada per si es fa necessari un augment de la concentració del fluorofor escollit o la incorporació

d'un recobriment sense toxicitat per a la membrana desenvolupada. Comprovació de la robustesa, fiabilitat i sensibilitat de la mesura d'OUR obtinguda en cultius de cèl·lules animals.

- Desenvolupament i implementació d'una mesura en línia de la concentració cel·lular basada en l'espectroscòpia d'impedància, incloent la determinació del sistema de mesura i la optimització de la mateixa per a l'obtenció d'una mesura estable, fiable i amb una bona sensibilitat de la concentració cel·lular. Determinació de la biocompatibilitat del muntatge de mesura, dels efectes del sistema de cultiu sobre la mesura i de la recta de calibrat de la mesura desenvolupada. A més, es complementarà el desenvolupament amb un estudi sobre la possibilitat de l'ús del sistema de mesura basat en l'espectroscòpia d'impedància pel monitoratge en línia de la morfologia cel·lular.

2) Aplicacions en teràpies bioquímiques, genètiques, cel·lulars i tissulars:

Pel que fa a la segona part del treball, aquesta constarà en aplicar els diferents sistemes de mesura en línia de la concentració cel·lular desenvolupats al llarg de la primera part del treball, per tal de determinar-ne quin d'aquest sistema és el més adequat, així com la funcionalitat dels mateixos i les necessitats d'evolució obtingudes per a les diferents línies cel·lulars que s'analitzaran. Els diferents passos a seguir, així com els corresponents objectius associats, es detallen a continuació:

- Aplicació de la mesura desenvolupada pel seguiment i per a la determinació dels paràmetres de cultiu, principalment la velocitat de creixement, dels principals processos de cultiu de cèl·lules animals adherents en teràpies bioquímiques i cel·lulars. Aquests processos principals són els de caracterització del creixement cel·lular sobre plàstic, de caracterització d'efectes citotòxics de molècules sobre els cultius confluents i de caracterització del creixement cel·lular sobre suports polimèrics (microsuports) per a produccions a gran escala de biomolècules, virus per a vacunes o vectors per a teràpies gèniques. Determinació de la sensibilitat de la mesura desenvolupada i de les necessitats d'optimització i evolució de la mateixa.

- Aplicació de la mesura desenvolupada pel seguiment i per a la determinació dels paràmetres de cultiu, principalment la velocitat de creixement, dels principals processos de cultiu de cèl·lules animals adherents en teràpies tissulars per a la regeneració condrocitària i per a la regeneració cardíaca. Aquests processos són el d'expansió de la font cel·lular, la utilització d'estímul físics i químics per a la diferenciació cel·lular cap a condrocits o cardiomiòcits, i finalment la utilització de polímers, en cas necessari, per tal d'incorporar un entorn tridimensional òptim per a la diferenciació cel·lular. A més, es realitzaran estudis genètics i

morfològics per a la determinació del grau de diferenciació cel·lular adquirit a mesura que es van afegint els diferents estímuls diferenciadors.

CAPÍTOL 3

MESURA DE L'ACTIVITAT CEL·LULAR

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la mesura de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals, tant en cultius de cèl·lules animals en suspensió com en adherents, és un paràmetre clau pel seguiment en línia dels creixements, ja que a més a més de ser una mesura indirecta de la concentració cel·lular d'un cultiu, ens permet conèixer l'estat fisiològic de les cèl·lules. Aquest monitoratge a temps real de l'activitat en els cultius es pot utilitzar pel disseny d'estratègies molt més avançades del control de bioprocessos i definir el tipus d'operació que es durà a terme, ja sigui en discontinu, discontinu alimentat, continu o en perfusió.

El fet de treballar en cultius de cèl·lules adherents, implica que els mètodes clàssics de monitoratge en línia d'una mesura directa de la concentració cel·lular (de gran senzillesa i àmpliament utilitzats al llarg del cultiu cel·lular, com per exemple la mesura de densitat òptica) no siguin aplicables. Aquest fet, crea la necessitat de desenvolupar un sistema de mesura indirecta de la concentració cel·lular, realçant-ne doncs la importància de disposar d'aquest monitoratge (mesura indirecta de la concentració cel·lular a partir de l'activitat cel·lular) com a mesura fiable i de complexitat molt més baixa.

3.1 INTRODUCCIÓ A LA MESURA DE LA VELOCITAT DE CONSUM D'OXIGEN (OUR)

Per aquestes raons esmentades, en els darrers anys s'ha fet èmfasi en monitorar variables que aporten aquesta informació sobre l'activitat cel·lular, com és el cas de la velocitat de consum d'oxigen (OUR) (Behrendt *i col.* 1994), el potencial redox (Higareda *i col.* 1997), la velocitat de flux de calor (Guan *i*

col.·1998) i l'evolució de la concentració de diòxid de carboni (De Tremblay *i col.*·1993). Entre aquestes metodologies, la més àmpliament utilitzada pel seguiment de l'activitat cel·lular és la que utilitza la velocitat de consum d'oxigen com a paràmetre a seguir (Konstantinov *i col.*·1994), que no necessita de cap altre tipus de sonda extra per a la seva mesura, sinó que es pot realitzar amb les sondes d'oxigen ja presents rutinàriament en els bioreactors.

A banda del seu ús directe, la OUR sovint es combina amb altres variables per generar mesures útils amb un sòlid sentit fisiològic. Entre aquestes variables, les més habituals són la velocitat específica del consum d'oxigen, el quocient respiratori (relació entre CO₂ produït i O₂ consumit) i la velocitat de consum de glucosa. Individualment o en combinació, aquestes variables dels cultius cel·lulars proporcionen un coneixement més profund sobre diversos aspectes del metabolisme cel·lular.

Malgrat la importància de la OUR, la seva utilització rutinària en operacions de bioprocessos està limitada per les dificultats trobades en el seu monitoratge en línia (Konstantinov *i col.*·1994), sobretot quan en processos productius es tendeix a la màxima simplicitat del sistema. Encara que s'han desenvolupat un bon nombre de mètodes, tots ells comporten desavantatges que impedeixen l'aplicació de la OUR com una variable del bioprocés estàndard, tal i com ho són l'oxigen dissolt o el pH.

3.2 LA BASE DE LA MESURA DE LA OUR

En general, els mètodes per monitorar la OUR es poden dividir en dos grups: mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen en la fase gas, i els mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen en la fase líquida. Donat al fet que la mesura en fase gas requereix uns equips sofisticats i cars (analitzadors de gasos i espectròmetres de masses), mentre que la mesura d'oxigen en la fase líquida gaudeix d'una gran simplicitat, s'ha descartat la possibilitat del desenvolupament d'un sistema de mesura de l'activitat cel·lular basat en mesura de la concentració d'oxigen en fase gasosa.

Per a la mesura de la velocitat de consum d'oxigen, existeixen diverses tècniques, entre les quals en destaquen un parell. La primera de les tècniques, coneguda com mètode dinàmic, disposa de varies versions i només s'empra el propi sensor polarogràfic d'oxigen estàndard que incorpora el bioreactor, convertint-la en una tècnica assequible i barata. El concepte essencial del mètode, que pot realitzar-se directament en l'interior del bioreactor, consisteix en aturar el subministrament d'oxigen durant un temps limitat i calculant el valor de la OUR entre dues concentracions fixades d'oxigen a partir del descens dinàmic de la concentració d'oxigen causat per la respiració cel·lular. Un cop s'arriba a la concentració

d'oxigen més baixa del rang fixat i el càlcul del valor de la OUR s'ha realitzat, es reprèn el subministrament d'oxigen. Aquest concepte, que es troba ampliat a l'apartat 8.7.1 de Materials i Mètodes, queda plasmat a la figura 3.1, on es presenta l'evolució de la concentració d'oxigen dissolt al llarg del procés de càlcul de l'OUR. Per altra banda, la segona alternativa es basa en el manteniment d'una concentració constant d'oxigen en la fase gasosa (sense aturades en el subministrament d'oxigen) i calculant la OUR a partir del perfil de la concentració d'oxigen dissolt i a través de la realització d'un balanç d'oxigen en la fase líquida assumint que, tant el coeficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen (k_La) com la constant de la llei de Henry (H), són constants al llarg del cultiu (Zhou i Hu·1994).

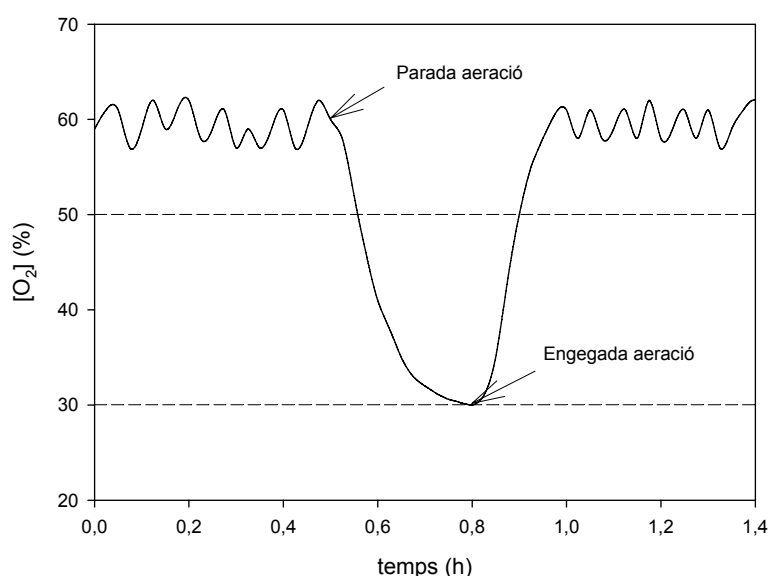


Figura 3.1 Perfil de la concentració d'oxigen dissolt en el medi durant el procés de mesura de la OUR a partir del mètode dinàmic en un cultiu cel·lular. L'interval de mesura de la OUR es realitza entre dues concentracions fixades d'oxigen dissolt. En aquest cas, entre 50 i 30%.

Dels diferents mètodes pel monitoratge de l'OUR, s'ha escollit el que ens proporciona millors avantatges i que prové de més antecedents bibliogràfics aplicats amb èxit, és a dir, el mètode dinàmic (Gámez·2000). Tot i la major simplicitat del mètode, en la seva aplicació cal tenir en compte una sèrie de factors i limitacions, per tal d'arribar a obtenir una mesura fiable:

- Cal tenir en compte la constant de temps de resposta del sensor de concentració de l'oxigen dissolt en el medi, essent aquesta constant funció del temps que tarda el sensor d'oxigen dissolt en observar un canvi en la concentració d'oxigen dissolt des del moment en que s'ha dut a terme el canvi. Per tant, si no es tingués en compte aquest temps de resposta, es podrien acoblar grans errors en la mesura quan s'arribés a concentracions cel·lulars elevades on la dinàmica del sistema es més ràpida i s'acosta a la dinàmica de la sonda, emascarant-ne els resultats. El fet de treballar amb cèl·lules animals però, fa que no sigui un

paràmetre tant crític com en el cas de bacteris i fongs (inclosos els llevats) on les concentracions cel·lulars són més elevades i, per tant, les dinàmiques del sistema són més ràpides.

- Crea trastorns en l'operació. Aquest fet implica la realització d'una certa distorsió en el nivell d'oxigen dissolt al medi quan es fan les mesures i pot no ser acceptable en alguns casos. Per tant, s'ha de comprovar pels diferents tipus cel·lulars a monitorar.

- No proporciona un senyal continu. El procediment ha de ser iniciat periòdicament a intervals de temps regulars. A més, el fet de crear trastorns en l'operació obliga a efectuar les mesures en intervals de temps prou espaiats, tot i que la dinàmica relativament lenta dels creixements de cèl·lules animals, juntament amb la poca concentració cel·lular existent en cultius adherents, fa que aquesta distorsió no sigui crítica.

- Requereix l'estimació acurada del k_{La} . En la majoria de casos s'assumeix k_{La} constant, tot i que no deixa de ser bàsicament una aproximació, ja que estrictament el valor del k_{La} pot variar al llarg del cultiu per diferents circumstàncies, com podrien ser canvis en la viscositat (augment de cèl·lules i debris), el volum (evaporació) i l'aeració (colmatació filtres) entre d'altres (Fleisehaker i Sinskey·1981; Prokop·1981). Dins d'aquestes circumstàncies, la que més podria afectar al nostre sistema és la variació deguda a fenòmens d'evaporació del volum de medi respecte el volum de gas al capçal del minibioreactor.

Tots aquests factors, suposen l'automatització d'una seqüència d'accions per a la realització de mesures de la OUR, ja que encara que el principi és simple, l'estimació de la OUR a partir del perfil d'oxigen dissolt no és sempre immediata. Aquesta automatització, efectuada a través del programari Labview, s'ha dut a terme en el *Grup d'Enginyeria Cel·lular i Tissular* (GECiT) de la UAB en col·laboració amb el Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC.

3.3 EL SISTEMA DE CULTIU CEL·LULAR I MONITORATGE DE L'OXIGEN DISSOLT

Tot i no existir altres necessitats, el fet d'utilitzar sondes de mesura de l'oxigen dissolt suposa la realització d'un canvi en el sistema de cultiu, ja que els sistemes estàndard de cultiu d'un sol ús per a cèl·lules animals adherents, com per exemple els flascons de cultiu o les plaques de pous (figura 3.2, esquerra), no permeten la implementació d'aquest tipus de sondes. Així doncs, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, es canviarà de sistema de cultiu cap a la plataforma de minibioreactors d'Hexascreen (Monoscreen, HexaScreen C.T. ®), que sí que permeten l'addició de sondes miniaturitzades (figura 3.2, dreta), no

només per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt, sinó que també permet la implementació d'altres sondes de mesura del pH o temperatura entre altres, que aportaran una informació molt valuosa pel control i monitoratge de cultius de cèl·lules animals adherents.



Figura 3.2 Sistemes de cultiu d'un sòl ús estàndards pel cultiu de cèl·lules animals adherents (esquerra). Sistema de cultiu en minibioreactor d'un sòl ús pel cultiu de cèl·lules animals adherents (dreta), que conté ports per a la implementació de sondes pel monitoratge en línia de variables clau dels cultius cel·lulars.

3.3.1 REPRODUCTIBILITAT DEL CREIXEMENT CEL·LULAR

Al canviar de sistema de cultiu, el primer que s'ha d'aconseguir és que els creixements obtinguts en la superfície de creixement del nou sistema siguin similars als creixements obtinguts en els sistemes de cultiu comercials normalment utilitzats, ja que en cas contrari, les mesures realitzades en aquest sistema no serien representatives als creixements obtinguts en sistemes utilitzats pel cultiu i escalat de cèl·lules adherents.

Per poder comprovar si existeix aquesta similitud entre les diferents superfícies de creixement, s'han realitzat mesures fora de línia de la concentració cel·lular de creixements paral·lels (descripció a l'apartat 8.7.2 de Materials i Mètodes), tant en plaques de 6 pous com en minibioreactors, als que se'ls hi ha aplicat un tractament de neteja consistent en submergint-los en aigua ultrapura durant 4 dies. Els creixements s'han realitzat en un incubador a 37°C, 95% d'humitat i amb una atmosfera d'aire amb 5% de CO₂ i s'ha mantingut una relació de "volum / superfície" de 1 ml / 3 cm².

La línia cel·lular escollida ha estat la línia cel·lular vero (apartat 8.1.1 de Materials i Mètodes), ja que a més a més de ser una línia àmpliament utilitzada per la producció de virus i proteïnes recombinants, és també una línia cel·lular adherent bastant robusta i amb una velocitat de creixement elevada, proporcionant uns resultats fiables en uns temps de cultiu curts. Aquestes propietats fan que sigui una línia

cel·lular òptima per a realitzar aquest tipus d'experiments amb cèl·lules animals adherents, de manera que s'utilitzarà pels desenvolupaments i calibratges al llarg de tot el treball. El medi utilitzat és MEMG amb un 10% de FBS, mentre que la concentració cel·lular al inici dels cultius és de 10^4 cèl·lules/cm².

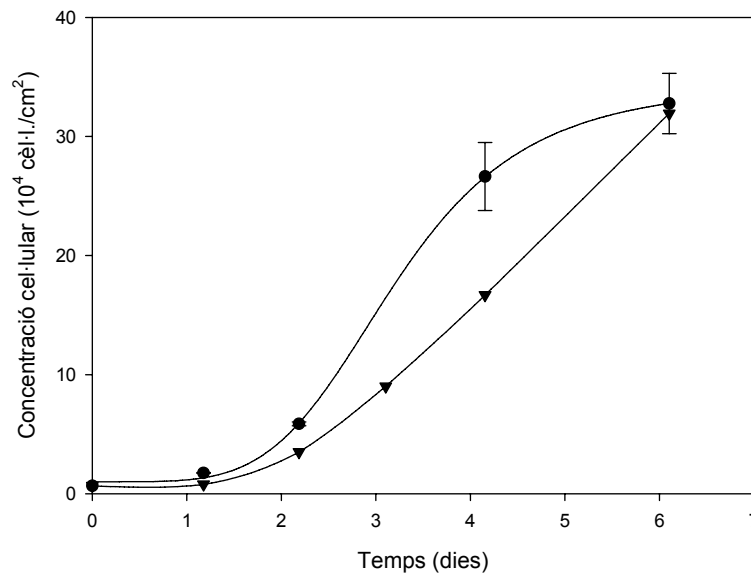


Figura 3.3 Comparació dels creixements de cèl·lules vero obtinguts per a les diferents superfícies de cultiu. Al creixement control obtingut en plaques de 6 pous comercials (●), se'l compara amb el creixement obtingut en el sistema de cultiu en minibioreactors (▼).

Els resultats obtinguts es troben representats a la figura 3.3 on es presenten els perfils dels creixement obtinguts a les dues superfícies de cultiu. Es pot observar que durant el primer dia i mig de cultiu aproximadament, els dos creixements encara no han arrencat i es troben en fase de latència, però a partir del segon dia de cultiu els dos creixements arrenquen arribant a la fase de creixement exponencial. És en aquest moment que ja s'observen diferències significatives entre les dues superfícies de creixement, obtenint un millor creixement amb els sistemes comercials de cultiu que es va fent cada cop més evident a mesura que avança el cultiu. D'aquesta manera, el creixement en els sistemes comercials es comença a parar entre el 4rt i 5è dia de cultiu, mentre que el creixement en els minibioreactors encara es troba en plena fase exponencial.

Finalment, al cap de 6 dies de cultiu, el creixement sobre la superfície dels minibioreactors ja ha arribat a confluència i els valors de la concentració cel·lular coincideixen per a les dues superfícies indicant que, tot i que s'obtinguin uns perfils de creixement diferents causats per les diferents superfícies de cultiu, la concentració final de confluència no depèn de l'adherència a la superfície de cultiu (a no ser que aquesta no permetés en absolut l'adherència de les cèl·lules), sinó que depèn de la línia cel·lular en qüestió i de la

quantitat de medi utilitzada, però com que es manté una relació volum/superfície constant, no hi ha cap diferència de volum de medi que pugui afectar a la concentració final.

Aquests resultats mostren que els creixements no són del tot semblants i per tant, el sistema de cultiu en minibioreactors no és completament representatiu als creixements obtinguts en sistemes de cultiu estàndards en la fase de creixement exponencial, encara que és una primera aproximació bastant acceptable i que sí que permet un creixement final igual als sistemes estàndards. Per tant, s'intentarà obtenir una millora en la fase exponencial dels creixements per a obtenir uns creixements cel·lulars el màxim de similars possibles.

La possible raó d'aquesta diferència entre els creixements pot ser deguda que mentre els sistemes comercials estàndards tenen aplicat un tractament per a l'activació de la superfície de creixement, els minibioreactors no compten amb cap tipus de tractament inicial sobre la superfície de creixement.

Per tant, per a poder aconseguir aquesta similitud en els creixements, s'han analitzat diferents alternatives per a la activació de la superfície de cultiu dels minibioreactors. Aquestes alternatives pels tractaments d'activació, que es basen en fer reaccionar la superfície de cultiu per tal de crear grups hidroxils carregats negativament que ajudin a l'adherència cel·lular, poden ser o tractaments químics (protocol a l'apartat 8.7.3.1 de Materials i Mètodes), que són utilitzats normalment en sistemes comercials de cultiu reaprofitables, o tractaments per plasma (protocol a l'apartat 8.7.3.2 de Materials i Mètodes), que són utilitzats normalment en sistemes comercials de cultiu d'un sol ús.

Per a poder determinar si amb aquestes activacions de la superfície de cultiu dels minibioreactors s'aconsegueix un creixement semblant al creixement obtingut en els sistemes de cultiu estàndards (plaques de 6 pous), s'han realitzat mesures de concentració cel·lular al llarg d'uns creixements duts a terme tant en minibioreactors tractats amb les dues alternatives, com en minibioreactors sense cap tipus de tractament d'activació de superfície per a observar les millores obtingudes en el creixement així com també en les plaques de 6 pous per a comprovar si les millores obtingudes suposen l'obtenció d'uns creixements semblants respecte els sistemes comercials de cultiu estàndard.

Les condicions de cultiu s'han mantingut constants respecte els creixements anteriors, incloent el tractament de neteja amb aigua ultrapura durant 4 dies, tant pels minibioreactors sense cap tipus d'activació de superfície, com els minibioreactors activats, en els que la neteja s'ha efectuat un cop es troben activades les superfícies de cultiu. Els perfils de creixement obtinguts es representen a continuació

a la figura 3.4, on es comparen els perfils de creixement obtinguts, per a poder observar les millores obtingudes amb els tractaments d'activació de la superfície de cultiu.

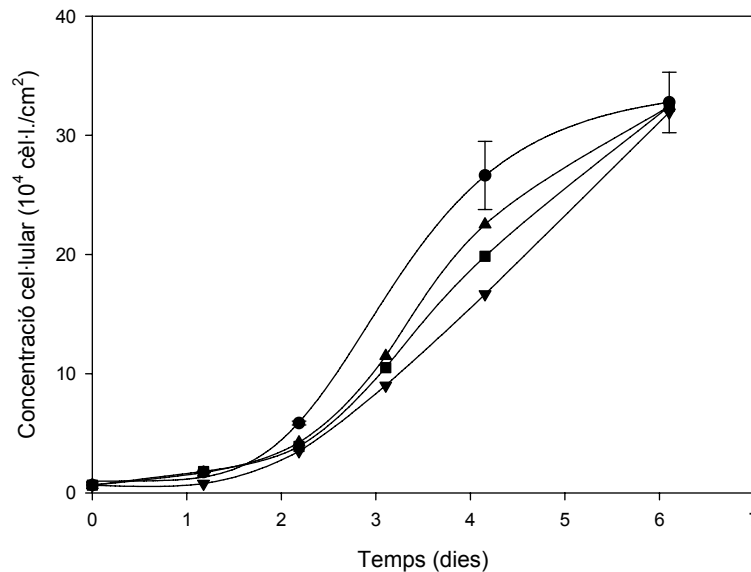


Figura 3.4 Comparació dels creixements de cèl·lules vero obtinguts pels diferents tractaments d'activació realitzats a la superfície de cultiu per a potenciar l'adherència cel·lular. Al creixement control en plaques de 6 pous comercials (●), se'l compara amb els creixements obtinguts amb minibioreactors tractats amb activació per plasma (▲), amb minibioreactors tractats amb activació química (■) i amb el creixement obtingut anteriorment amb minibioreactors sense cap tractament específic (▼).

Es pot observar, tal i com passava en els creixements anteriors, que els cultius es troben en fase de latència fins aproximadament el segon dia de cultiu, moment en que arrenquen amb un creixement exponencial i que el creixement en plaques de cultiu estàndards ja es comença a diferenciar de la resta de creixements. En canvi, no és fins aproximadament al tercer dia de cultiu en que els creixements obtinguts en els minibioreactors tractats mitjançant plasma per a l'activació de la superfície es comencen a diferenciar del creixement obtingut en els minibioreactors sense cap tractament. A partir d'aquest moment, el perfil obtingut pels minibioreactors tractats amb plasma segueix un camí similar a l'obtingut mitjançant els sistemes estàndards de creixement.

Per altra banda, el perfil de creixement obtingut en els minibioreactors tractats químicament també obté millors resultats que els minibioreactors no activats i bastant similars al perfil obtingut amb els minibioreactors tractats amb plasma, encara que amb una velocitat de creixement lleugerament inferior, ja que també a partir del tercer dia es pot veure com els creixements es van separant. Finalment es pot observar que igualment al sisè dia de cultiu, tots els cultius han estat capaços d'arribar a la mateixa concentració cel·lular que en el control, és a dir, a la concentració de confluència.

Tot i que ja es pot observar clarament que la millor alternativa per a l'activació de la superfície de cultiu dels minibioreactors és a través del tractament amb plasma i que amb aquest tractament s'obté un creixement bastant similar als que s'obtenen en sistemes comercials estàndards d'un sòl ús pel cultiu cel·lular, la millor manera de poder comparar i caracteritzar els creixements obtinguts és a través del càlcul de la velocitat de creixement o, el que és el mateix, el temps de duplicació de la línia cel·lular.

Els valors de la velocitat màxima de creixement (μ màx.) i del temps de duplicació obtinguts per a les diferents superfícies de cultiu es troben a la taula 3.1. El càlcul d'aquests paràmetres, que es pot observar ampliat a l'apartat 8.8.1 de Materials i Mètodes, s'efectuen a partir de la linealització del perfil del logaritme del creixement cel·lular en la fase exponencial de creixement, moment en que el paràmetre arriba al seu valor màxim.

Taula 3.1 Comparació de les velocitats de creixement i temps de duplicació obtinguts pels diferents tractaments d'activació per a l'adherència cel·lular.

Superfície	μ màx. (1/d)	T. duplicació (h)
Placa 6 pous	0.90	18.4
Activació Plasma	0.88	18.9
Activació Química	0.84	19.8
Sense activació	0.80	20.8

Si es comparen els valors de la velocitat màxima de creixement obtinguts en els diferents sistemes, es pot observar que tot i no arribar als valors de velocitats màximes de creixement assolits en els sistemes estàndards de cultiu, aquests són molt similars pels muntatges activats per a l'adherència, amb només una variació d'aproximadament 2.5 i 6.5% pels tractaments per plasma i químics respectivament. Per altra banda, la variació en la velocitat de creixement obtinguda pel creixement en el sistema de cultiu en minibioreactors sense cap mena de tractament per a l'adherència, que arriba al 11%, surt significativament dels valors acceptables de variació al tractar amb sistemes biològics, que es podrien situar aproximadament al 5%.

Tot i que la variació obtinguda en els minibioreactors tractats químicament no és molt elevada respecte els creixements en sistemes de cultiu estàndards, s'ha de considerar que aquest tractament d'activació química és un procés manual que es controla personalment, mentre que el tractament per plasma és un

procés que es troba controlat a través d'una màquina, de manera que el protocol d'activació química aconseguit és menys reproducible que el tractament aconseguit amb plasma.

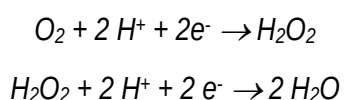
Amb els resultats obtinguts, el nou sistema de cultiu es pot considerar vàlid pel creixement cel·lular de cèl·lules adherents i per a la seva mesura de la concentració cel·lular si es realitza un tractament amb plasma per a l'activació de la superfície de cultiu. Tot i això, s'ha de tenir en compte que aquestes proves d'adherència i d'obtenció d'un creixement representatiu s'han de realitzar per a les diferents línies cel·lulars que s'utilitzin en sistemes de minibioreactors, ja que el tractament necessari pot dependre de la robustesa de la línia cel·lular en qüestió.

3.3.2 SONDES POLAROGRÀFIQUES PER A LA MESURA DE L'OXIGEN DISSOLT

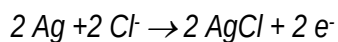
Un cop es disposa d'un sistema de cultiu adequat pel creixement de cèl·lules animals adherents i que permet la implementació de sondes pel control de paràmetres clau en els cultius, ja es pot desenvolupar una sonda estàndard per a la mesura de l'oxigen dissolt, essent l'única sonda necessària per implementar el mètode dinàmic de mesura de la OUR. La sonda més simple i utilitzada per a la determinació de l'oxigen dissolt és l'elèctrode de Clark, àmpliament conegut com a sonda polarogràfica i patentat per L.C. Clark Jr. al 1956.

L'esquema d'aquest tipus de sondes polarogràfiques es pot observar a la figura 3.5, es troba formada per un parell d'elèctrodes, càtode (disc de Platí, Pt) i ànode (anell d'Ag/AgCl), que es troben en contacte mitjançant una solució electrolítica, separada del medi de cultiu a analitzar a través d'una membrana permeable als gasos.

El seu funcionament es basa en la mesura del corrent elèctric que circula entre els dos elèctrodes quan es duu a terme la reducció de l'oxigen a peròxid i l'oxidació de la plata a clorur de plata. Per a tal efecte, s'aplica un potencial entre els dos elèctrodes per permetre que els electrons flueixin cap a la solució electrolítica, on es duen a terme les reaccions de reducció de l'oxigen,



on el potencial de treball de la sonda es determina per tal de que la reducció a peròxid s'hagi produït completament i que la de reducció a aigua encara no s'hagi iniciat (aproximadament uns -0.75V). La reacció d'oxidació de la plata a la superfície de l'ànode,



permet que es tanqui el circuit amb els electrons circulant cap a la font externa de voltatge, on s'efectua la mesura d'intensitat corresponent.

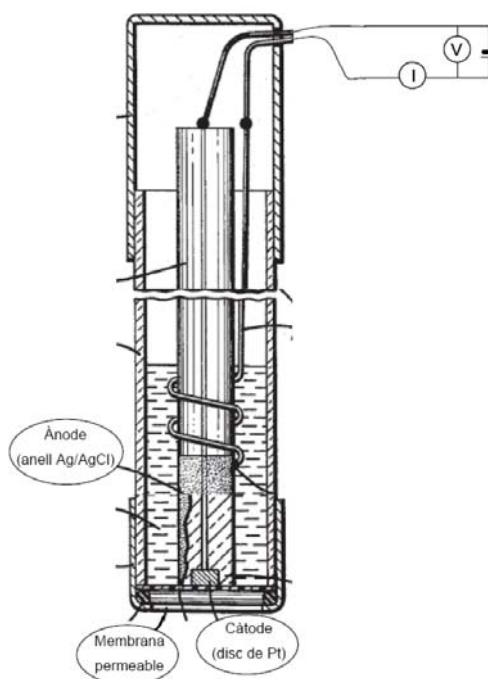


Figura 3.5 Esquema de la sonda polarogràfica (elèctrode de Clark) per a la mesura de l'oxigen dissolt en el medi (Clark·1959).

Un cop ja s'obté la mesura de la intensitat, aquesta ja es pot calibrar respecte la concentració d'oxigen dissolt en el medi. Per a realitzar aquest calibratge, es mesura la intensitat obtinguda mitjançant la sonda polarogràfica miniaturitzada per a la seva utilització en sistemes de cultiu de minibioreactors en un minibioreactor al que es va disminuint la concentració d'oxigen dissolt a partir d'un corrent elevat de nitrogen pel capçal del minibioreactor monitorat. A la vegada, aquesta intensitat mesurada amb les sondes desenvolupades es compara amb la concentració d'oxigen dissolt mesurada a partir d'una sonda polarogràfica comercial estàndard situada en el mateix minibioreactor, minibioreactor al que se li ha realitzat un forat suficient per a la incorporació de l'esmentada sonda comercial. El calibrat resultant es troba representat a continuació a la figura 3.6. El desenvolupament d'aquestes sondes polarogràfiques, però miniaturitzades i implementables en sistemes de cultiu en minibioreactors s'ha dut a terme en el *Grup d'Enginyeria Cel·lular i Tissular* (GECiT) de la UAB (Gálvez·2006, Soley·2010) en col·laboració amb el *Grup de Sensors i Biosensors* del Departament de Química de la UAB (Senabra·2004).

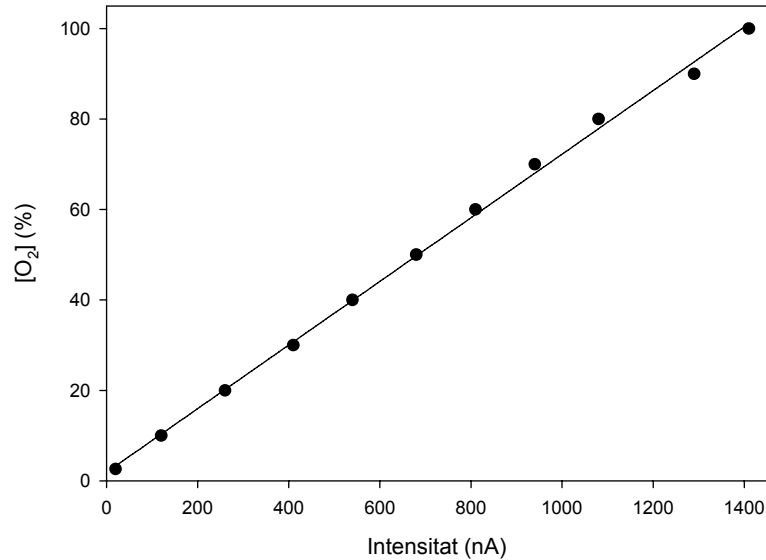


Figura 3.6 Calibratge de la sonda polarogràfica entre la intensitat mesurada amb la sonda polarogràfica i la concentració d'oxigen dissolt en el medi.

Amb el calibratge obtingut, es pot observar com la correlació entre la intensitat mesurada amb la sonda polarogràfica miniaturitzada i la concentració real d'oxigen dissolt en el medi és molt bona. El fet que la linealitat obtinguda es mantingui en tot el rang de concentració (de 0% a 100% d'oxigen dissolt), fa que dues mesures de la intensitat, corresponents al 0% i al 100% siguin suficients pel calibratge d'aquestes sondes miniaturitzades. A més, si es té en compte que la intensitat corresponent a la mesura de l'absència de concentració d'oxigen en el medi dona 0 nA (s'obté un valor de zero per sota de la resolució del sistema, essent per tant menyspreable, pel que es considera de 0 nA), fa que per a la realització dels calibratges d'aquestes sondes polarogràfiques sigui suficient una única mesura de la intensitat corresponent a la saturació de l'aire en el medi, estalviant-se la mesura al 0% d'oxigen dissolt en el medi.

3.4 MESURA DE L'OUR EN CULTIUS DE CÈL·LULES ADHERENTS

Un cop implementat el sistema de mesura de la concentració d'oxigen dissolt en minibioreactors, així com el sistema automatitzat per a la realització i càlcul de la velocitat de consum d'oxigen en cultius cel·lulars, cal comprovar que el sistema és capaç de seguir correctament creixements de cèl·lules animals adherents. En treballs anteriors realitzats dins el grup (Gálvez 2006), aquest sistema de cultiu i monitoratge ha estat utilitzat amb èxit, tal i com s'explicarà a continuació, per a la mesura de la velocitat de consum d'oxigen i seguiment de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals en suspensió. Tot i això, aquest sistema de cultiu i monitoratge en línia encara no s'ha utilitzat pel seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents.

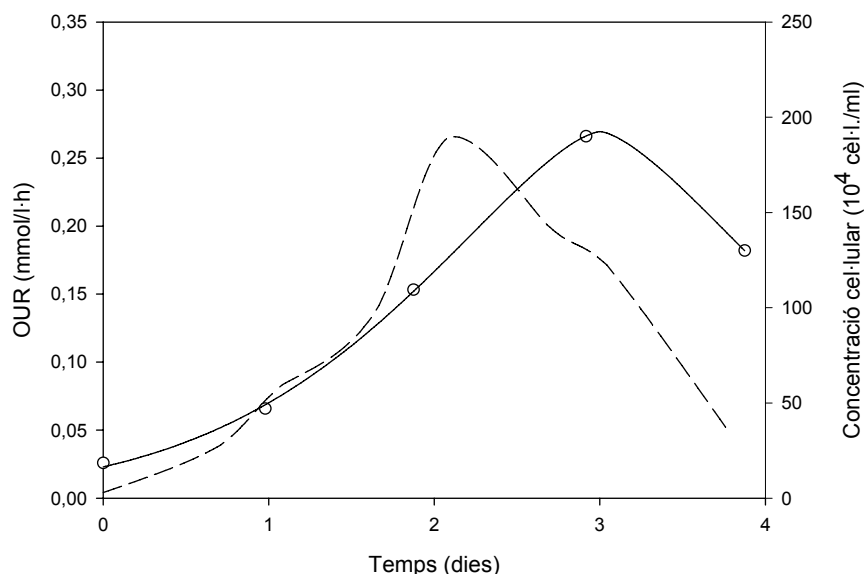


Figura 3.7 Seguiment en línia de la velocitat de consum d'oxigen (—) per a un cultiu de cèl·lules animals en suspensió (hibridomes) a través del sistema de cultiu per minibioreactors i amb la utilització de sondes polarogràfiques d'oxigen miniaturitzades i comparació amb recomptes de concentració cel·lular del minibioreactor (○).

Es pot observar a la figura 3.7, com el seguiment de la OUR en cèl·lules animals en suspensió no només permet l'estimació de la concentració cel·lular al llarg dels cultius, sinó que a més, és capaç de predir amb certa antelació el moment en que el cultiu s'atura, tal i com es pot veure amb els perfils de l'OUR i la concentració cel·lular a partir de recomptes fora de línia, on els valors d'OUR arriben al seu màxim als 2 dies de cultiu, mentre que el cultiu continua creixent durant un dia més abans d'entrar en fase de mort cel·lular.

Aquest fet, es degut a que la mesura de la OUR en cultius cel·lulars és una mesura de l'activitat cel·lular i, per tant, relacionada amb la concentració de cèl·lules viables en el cultiu, mentre que la mesura fora de línia de la concentració cel·lular per recomptes cel·lulars o altres sistemes en línia de mesura directa de la concentració cel·lular com per exemple la densitat òptica es troben relacionades amb la concentració de cèl·lules totals. Per tant, al no mesurar les cèl·lules mortes del cultiu, la mesura de la OUR es troba ràpidament afectada per la mort cel·lular del cultiu, ja sigui a causa de l'esgotament d'un nutrient essencial o l'acumulació de productes tòxics, mentre que les mesures de la concentració cel·lular total, al mesurar tant les cèl·lules vives com les mortes, segueix augmentant de valor durant el principi d'aquesta fase de mort cel·lular i, en algun cas com en la mesura de la densitat òptica, la mesura continua augmentant degut a l'augment de la debris cel·lular.

Per aquesta raó, la mesura de la OUR és converteix en una eina important en cultius de cèl·lules animals en suspensió que aporta la possibilitat d'identificació de possibles problemàtiques en el cultiu, així com l'aplicació d'estratègies d'operació dels cultius, amb l'ajuda de la mesura de la OUR per a la determinació del moment en que s'esgoten els nutrients essencials pel cultiu i es fa necessària l'addició de medi fresc.

Per a comprovar que el sistema és capaç de seguir l'activitat cel·lular en un creixement de cèl·lules animals adherents, s'efectua el seguiment de la OUR al llarg d'un cultiu de cèl·lules *vero* en un minibioreactor a l'interior d'un incubador a 37°C, 95% d'humitat i amb una atmosfera d'aire amb 5% de CO₂, utilitzant com a control les mesures puntuals de concentració cel·lular mesurades fora de línia en creixements paral·lels.

Al passar al sistema de cultius en minibioreactors, el fet d'efectuar el seguiment de la OUR comporta que el volum de medi MEMG amb el 10% de FBS sigui de 13 ml per a poder mantenir el medi en contacte amb les sondes polarogràfiques, mentre que el volum utilitzat en cultius paral·lels efectuats per mesurar la concentració cel·lular fora de línia en plaques de 6 pous és de 3 ml, però amb un recanvi de medi al cap de dos dies de cultiu per evitar la limitació de medi en el creixement. A més a més, per a poder regular l'atmosfera de l'aire del capçal del minibioreactor, s'apliquen polsos de 5 segons de cada 20 amb un cabal de 0,4 l/min de nitrogen mentre es realitzen les OUR o d'aire amb el 5% de CO₂ durant els temps d'espera entre les OUR, que es realitzen per duplicat i amb una freqüència de 2 cops al dia.

Previ al inici del cultiu, s'ha de realitzar el calibrat de la sonda polarogràfica i el càlcul de la constant de desorció per duplicat, a partir del protocol especificat a l'apartat 8.7.1 de Materials i Mètodes. Un cop es té la sonda calibrada, s'inocula el minibioreactor i les plaques de 6 pous a $5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² i es deixen 3 hores per permetre que les cèl·lules s'adhereixin a la superfície de cultiu abans de començar les mesures. Un cop finalitzades les mesures de la OUR al minibioreactor monitorat, se'n mesura la concentració cel·lular assolida per tal de poder comparar-la als controls en minibioreactors paral·lels.

A la figura 3.8 s'han representat els perfils del seguiment de la OUR i de les mesures de concentració cel·lular obtingudes fora de línia a partir dels creixements controls paral·lels al creixement monitorat, per tal de poder-los comparar.

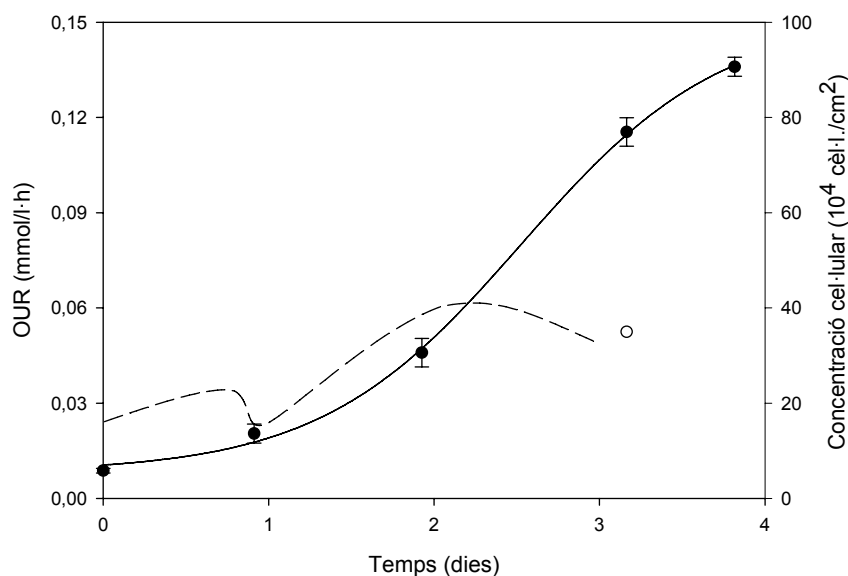


Figura 3.8 Seguiment en línia de la velocitat de consum d'oxigen (---) per a un cultiu de cèl·lules vero en el sistema de cultiu en minibioreactors. Comparació amb el perfil de concentració cel·lular realitzat fora de línia (●) i amb el valor de concentració cel·lular final assolit en el minibioreactor monitorat (○).

Es pot observar doncs, que l'evolució de les dues mesures concorden fins als 2 dies i mig de cultiu, moment en que es pot observar una limitació del creixement cel·lular monitorat a través del perfil de la OUR, on la mesura queda estable, sorgint una discrepància amb l'evolució de les mesures fora de línia, ja que als creixements fora de línia no s'observa cap mena de limitació en el creixement i continuen durant un dia més en creixement exponencial. Al final del tercer dia de cultiu es decideix parar el seguiment de l'activitat en el minibioreactor monitorat per mesurar el valor de la concentració cel·lular. La concentració cel·lular assolida en el minibioreactor monitorat és de $40 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², coincidint amb el perfil de la OUR i indicant que realment el cultiu s'ha aturat.

Aquest fet indica que el perfil de la OUR en el creixement monitorat és correcte, mentre que el perfil obtingut mitjançant els creixements control en paral·lel, que no pateixen cap limitació al tractar-se de creixements en sistemes de cultiu comercials independents al monitorat, no són indicadors del que realment passa amb el minibioreactor monitorat. La causa de la limitació del creixement cel·lular pot venir donada per una limitació en la difusió de l'oxigen deguda a l'augment en el volum de medi emprat en el cultiu dins de minibioreactors que, tot i permetre la utilització de sondes per a la mesura de diversos paràmetres del cultiu, impedeixen una adsorció de l'oxigen suficientment ràpida pel cultiu de cèl·lules animals adherents un cop aquest es veu desplaçat per a la mesura de la OUR.

Per tal de solucionar aquesta problemàtica i aconseguir una ràpida adsorció de l'oxigen al medi de cultiu, s'ha afegit un sistema d'agitació ja validat per a cultius de cèl·lules animals en suspensió (Gálvez·2006) i que permet un augment en les constants d'adsorció i desorció de l'oxigen en el medi (figura 3.9).



Figura 3.9 Tapa del minibioreactor amb la presència d'un pèndol d'agitació per una correcta homogeneïtzació del medi de cultiu.

Per comprovar que s'han solucionat els problemes difusionals i, per tant, que es pot realitzar un correcte seguiment d'un creixement de cèl·lules animals adherents, s'ha monitorat el creixement d'un cultiu de cèl·lules *vero* en el sistema de cultiu en minibioreactors conservant les mateixes condicions de cultiu anteriors, però amb la presència d'aquest sistema d'agitació funcionant a una velocitat de 150 rpm.

Els resultats es mostren a la figura 3.10, on es pot observar que tal i com passava en els cultius de cèl·lules animals que creixen en suspensió (figura 3.7), el seguiment de la OUR en aquest cultiu de cèl·lules animals adherents, no només permet la estimació de la concentració cel·lular present en el cultiu cel·lular, sinó que també permet predir el final del creixement amb antelació, ja que s'obté el màxim corresponent a les mesures d'OUR aproximadament al tercer dia de cultiu, mentre que la mesura de la concentració cel·lular continua augmentant.

Aquest fet indica que, a partir del tercer dia de cultiu ja existeixen limitacions per falta de superfície de creixement (cultiu en confluència) que fan que el cultiu s'estanqui, tot i que la presència de nutrients essencials fa que el cultiu no entri en fase de mort. Aquest fet queda comprovat amb el seguiment de la OUR, ja que a partir del moment en que arriba al seu màxim (dia 3), en comptes de disminuir dràsticament tal i com passa anteriorment en la figura 3.7 on s'esgota el medi de cultiu, el valor de la OUR es va mantenint constant

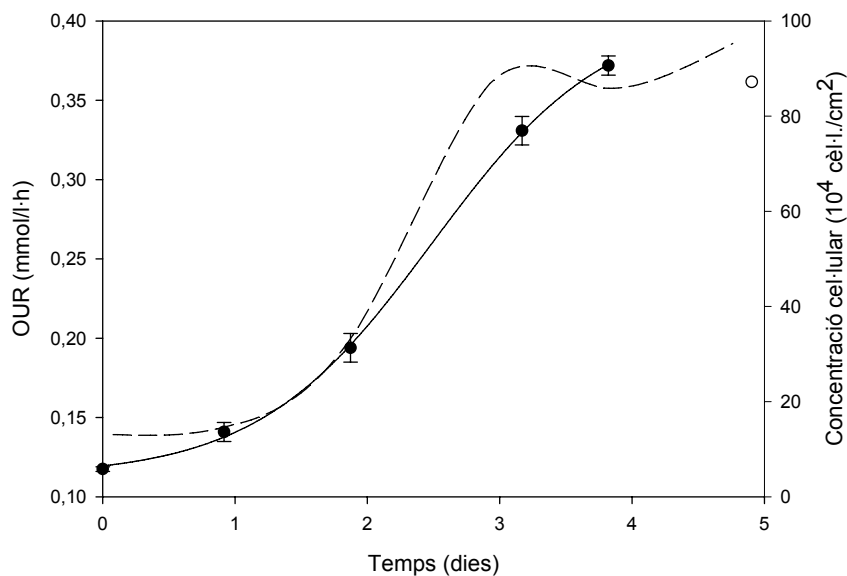


Figura 3.10 Seguiment en línia de la velocitat de consum d'oxigen (—) per a un cultiu de cèl·lules vero en el sistema de cultiu en minibioreactors. Comparació amb el perfil de concentració cel·lular realitzat fora de línia (●) i amb el valor de concentració cel·lular final assolit en el minibioreactor monitorat (○).

Si ens fixem en la fiabilitat de la mesura, es pot observar com a partir del perfil de la OUR es pot realitzar una estimació de la concentració cel·lular present en el cultiu, mostrada en els recomptes de concentració cel·lular realitzats en els creixements fora de línia. A més, el valor de la concentració cel·lular final mesurada al minibioreactor monitorat al final del cultiu coincideix amb els valors corresponents de la OUR i de la concentració cel·lular en els creixements paral·lels, indicant una bona fiabilitat de la mesura de la OUR. Per tant, amb la incorporació del sistema d'agitació pendular, s'han solucionat els problemes difusionals anteriors i, com s'ha pogut comprovar, s'obté una mesura en línia de la velocitat de consum d'oxigen capaç de seguir un cultiu de cèl·lules animals adherents al llarg del seu creixement.

3.5 IDONEÏTAT DEL SISTEMA DE MESURA DE LA OUR

Tot i els resultats obtinguts anteriorment, és interessant corroborar la idoneïtat de la mesura de la OUR, és a dir, que a més de ser capaç de realitzar el seguiment de l'activitat cel·lular al llarg d'un creixement corrent, sigui capaç d'observar canvis sobtats en el creixement a temps real, com podria ser l'esgotament d'un nutrient o un accident. Per a poder observar-ne la idoneïtat de la mesura, s'ha monitorat un cultiu de cèl·lules vero al llarg del seu creixement conservant les mateixes condicions de cultiu que en l'anterior experiment, però al que se l'hi ha provocat un accident de la temperatura escalfant la superfície de cultiu a 40°C durant una hora als 2,5 dies de cultiu, per tal de causar-ne la mort cel·lular. D'aquesta manera es podrà observar si el seguiment de la OUR és capaç de seguir aquesta mort del cultiu.

Els resultats es presenten a la figura 3.11, on pot observar que l'evolució de la mesura de la OUR segueix els creixements fora de línia durant els primers dos dies i mig, de la mateixa manera que s'ha observat en experiments anteriors. En aquest moment (indicat a la gràfica mitjançant una fletxa), un cop es produeix l'accident de temperatura, al trobar-se les cèl·lules inactives metabòlicament a causa de la mort pràcticament de tot el cultiu, la mesura de la OUR comença a disminuir allunyant-se del perfil de concentració cel·lular obtingut en els creixements fora de línia, els quals continuen els seus creixements exponencial aliens a l'accident de temperatura. També es pot observar el fet que el recompte final de concentració cel·lular total del minibioreactor monitorat coincideix amb la concentració cel·lular obtinguda en els creixements realitzats fora de línia en el moment de l'accident de temperatura i, per tant, coincideix amb el màxim de mesura de la OUR.

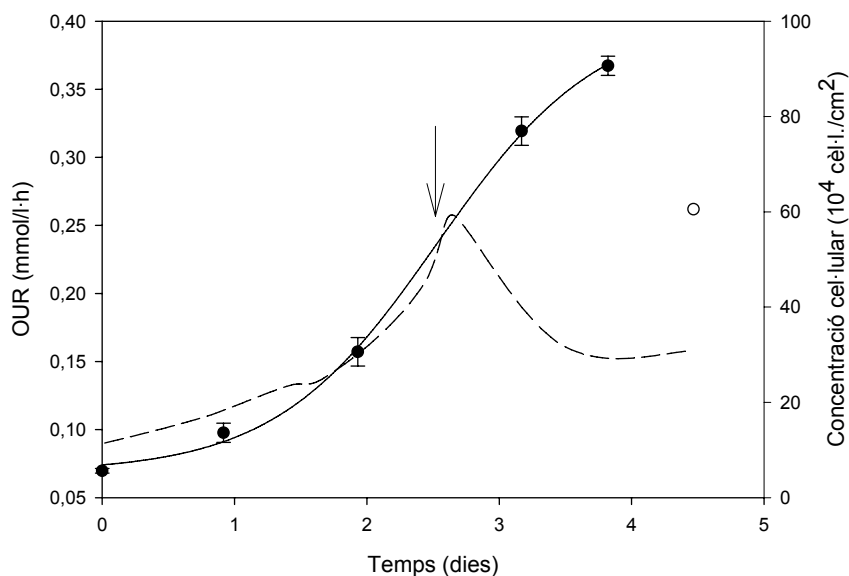


Figura 3.11 Seguiment en línia de la velocitat de consum d'oxigen (— —) per a un cultiu de cèl·lules vero en el sistema de cultiu en minibioreactors, al que se li provoca un accident de temperatura (↓). Comparació amb el perfil de concentració cel·lular realitzat fora de línia (●) i amb el valor de concentració cel·lular final assolit en el minibioreactor monitorat (○).

Amb els resultats obtinguts, queda palès que la mesura de la velocitat de consum d'oxigen en cultius de cèl·lules animals adherents és un indicador de l'activitat metabòlica del cultiu i un estimador de la concentració cel·lular existent en un cultiu i, juntament amb les sondes polarogràfiques i el sistema de cultiu en minibioreactors, permet el seu seguiment en línia al llarg del creixement cel·lular.

3.6 PROBLEMÀTIQUES DE LA MESURA POLAROGRÀFICA

Tot i que, la mesura de la concentració d'oxigen dissolt mitjançant una sonda polarogràfica és una tècnica molt senzilla, que s'ha difós àmpliament i permet el seguiment de l'activitat en un cultiu cel·lular, l'ús de

sondes polarogràfiques implica que l'estabilitat de la mesura es pot veure influenciada per varis factors que poden afectar amb diferents graus als monitoratges de la concentració d'oxigen dissolt en cultius de cèl·lules animals adherents, tal i com s'han reportat anteriorment (Wolfbeis-1991). Aquests factors, es poden traduir en salts o derives de la mesura i, per tant, en una baixa estabilitat de la mesura. Dins d'aquests factors, els que afecten més al nostre sistema de mesura de la concentració d'oxigen s'exposen a continuació.

El primer dels factors a tenir en compte, és que les sondes polarogràfiques tenen un consum de l'electròlit que disminueix la capacitat de reducció de l'oxigen i per tant fa variar la senyal al llarg del temps. En els cultius de cèl·lules animals adherents, on els cultius duren alguns dies, el fet que el senyal variï al llarg del temps implica una font d'indeterminació i error elevada, fins al punt que el sistema deixi de ser capaç de realitzar el seguiment de la concentració d'oxigen, tal i com es pot observar a la figura 3.12, on arriba un moment del cultiu en que la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi baixa dràsticament.

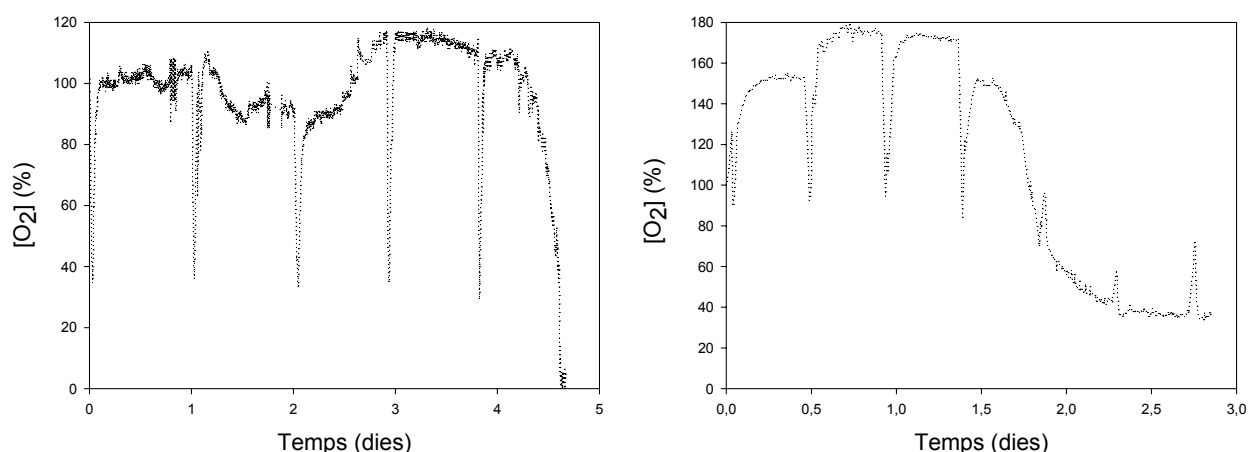


Figura 3.12 Perfils de concentració d'oxigen dissolt obtinguts mitjançant l'ús de sondes polarogràfiques per a dos cultius (repeticions) de cèl·lules *vero* efectuats en minibioreactors on s'observa l'efecte del consum de l'electròlit del sistema. Els cultius s'han realitzat a les mateixes condicions de cultiu que els anteriors (figura 3.11).

Observant els cultius, es pot veure que un dels cultius (figura 3.12, esquerra) perd la capacitat de mesurar l'oxigen a partir del quart dia de cultiu, tot i que permet la realització d'OURs al llarg d'aquests 4 dies anteriors, on el perfil de concentració d'oxigen dissolt es manté bastant estable. El segon dels cultius però (figura 3.12, dreta), aquesta pèrdua de la mesura de l'oxigen dissolt ja es troba a partir d'1,5 dies de cultiu, fent impossible la realització d'OURs i per tant, fent impossible la obtenció d'un perfil d'OURs al llarg del cultiu. A més, la mesura de la concentració d'oxigen ha patit d'altres problemàtiques que es comentaran més endavant.

El segon dels efectes a tenir en compte, és la necessitat de calibratges periòdics a causa de derives provinents de diferent naturalesa com per exemple l'envelliment de la sonda o contaminació de la membrana entre d'altres. Al no poder realitzar el calibrat durant un cultiu cel·lular, aquest inconvenient augmenta considerablement amb els elevats temps de cultiu de cèl·lules animals adherents. Alguns exemples d'aquest fenomen en cultius de cèl·lules *vero* realitzats, es poden observar a la figura 3.13, amb uns salts de senyal clars al llarg del cultiu.

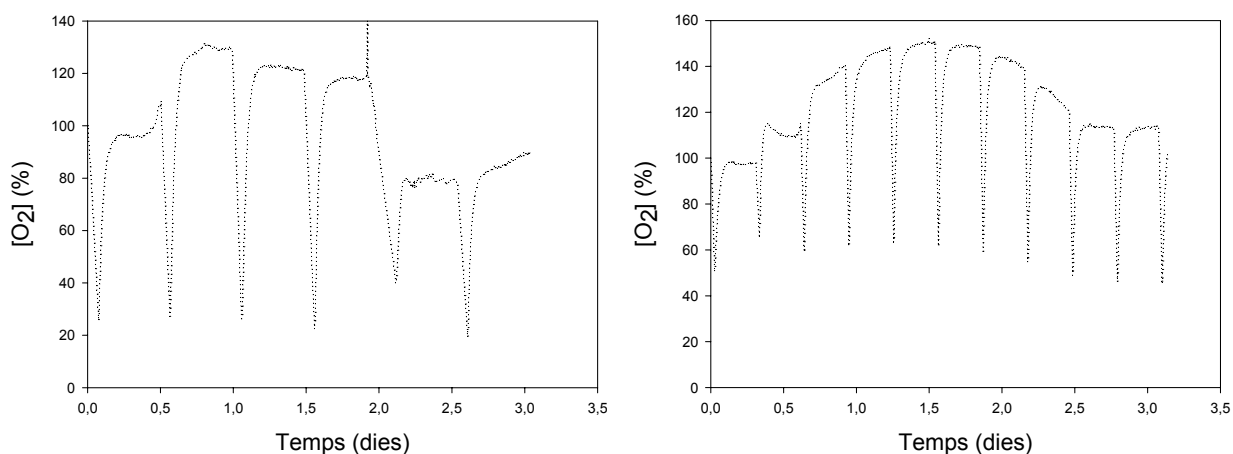


Figura 3.13 Perfils de concentració d'oxigen dissolt obtinguts mitjançant l'ús de sondes polarogràfiques per a dos cultius (repeticions) de cèl·lules *vero* efectuats en minibioreactors on s'observen les derives de senyal del sistema. Els cultius s'han realitzat a les mateixes condicions de cultiu que els anteriors (figura 3.11).

Observant els cultius, es pot veure en el primer dels cultius (esquerra) es manté la concentració estable fins just abans de la segona OUR, moment en que el senyal va canviant fins a valors de 130% d'oxigen. En aquest moment la concentració es va mantenint estable amb un lleuger descens de la mesura degut al creixement cel·lular i, novament als 2 dies de cultiu, la concentració d'oxigen torna a fer un salt clar de concentració fins al 80%, perdent definitivament l'estabilitat (la concentració d'oxigen va augmentant).

En el segon dels cultius representats (dreta), es pot observar un salt en la concentració just a l'acabar la segona OUR, arribant a un valor de 120% però sense que la mesura s'estabilitzi, de manera que de seguida va augmentant la mesura fins a valors de 145% per tornar al 120% d'oxigen dissolt als 2,5 dies de cultiu. A més, també es pot observar anteriorment en la figura 3.12 (dreta), on la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi va patint salts, primer del 100% a 150%, seguit d'un altre salt a 180% per tornar al cap de un dia als 150%, moment en el que la mesura es comença a influenciar per l'esgotament de l'electròlit.

El tercer dels efectes que afecten a la estabilitat de la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi a partir de sondes polarogràfiques és l'acumulació de restes de brutícia als sensors que creen una

deriva en la mesura. El fet de no poder realitzar neteges durant el seguiment del cultiu ja que es perdria el calibrat realitzat, fa que en cultius cel·lulars llargs com en el cas de cèl·lules animals adherents, aquest efecte pugui esdevenir significatiu per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt.

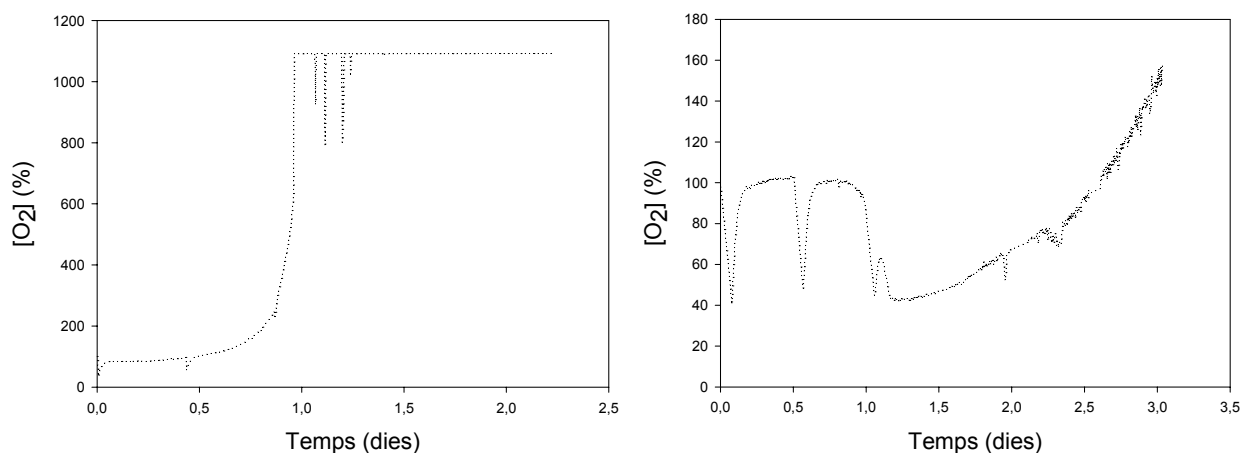


Figura 3.14 Perfils de concentració d'oxigen dissolt obtinguts mitjançant l'ús de sondes polarogràfiques per a dos cultius (repeticions) de cèl·lules *vero* efectuats en minibioreactors on s'observa l'efecte de l'acumulació de brutícia al sensor de mesura. Els cultius s'han realitzat a les mateixes condicions de cultiu que els anteriors (figura 3.11).

A la figura 3.14 es poden observar alguns d'aquests efectes de l'acumulació de dipòsits i impureses al sensor de mesura. Amb el primer dels cultius (esquerra), es pot observar que cap al final del primer dia de cultiu la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi augmenta exageradament fins a saturar-se la mesura. Aquest fet s'ha donat per una acumulació de brutícia (sals iòniques), suficient per tal de crear un curtcircuit en la mesura, fent que la intensitat sigui la màxima que pot donar el sistema. En el segon dels cultius (dreta), es pot observar com també s'ha acumulat brutícia en forma de sals iòniques, tot i que en aquest cas no són suficients per crear un curtcircuit en la mesura, tot i que la concentració és suficient per a que ja no es puguin realitzar mesures de concentració d'oxigen dissolt.

El quart i últim dels efectes que afecten a la estabilitat de la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi a partir de sondes polarogràfiques és la sensibilitat a determinats paràmetres de cultiu. Així, la mesura de la concentració d'oxigen pot variar segons l'agitació aplicada al medi de cultiu o poden reaccionar amb alguns components químics (etanol, àcid acètic...) entre altres. Tot i que aquests paràmetres es mantenen pràcticament constants al llarg del cultiu, el procediment de mesura de la OUR pot ocasionar variacions momentànies en la pressió rebuda per les sondes que emmascaren els valors trobats o, fins i tot, poden malmetre les membranes d'aïllament del medi de cultiu. Aquestes problemàtiques es poden traduir en pèrdues en l'estabilitat de la mesura i, fins i tot, en pèrdues de senyal quan les problemàtiques són més elevades.

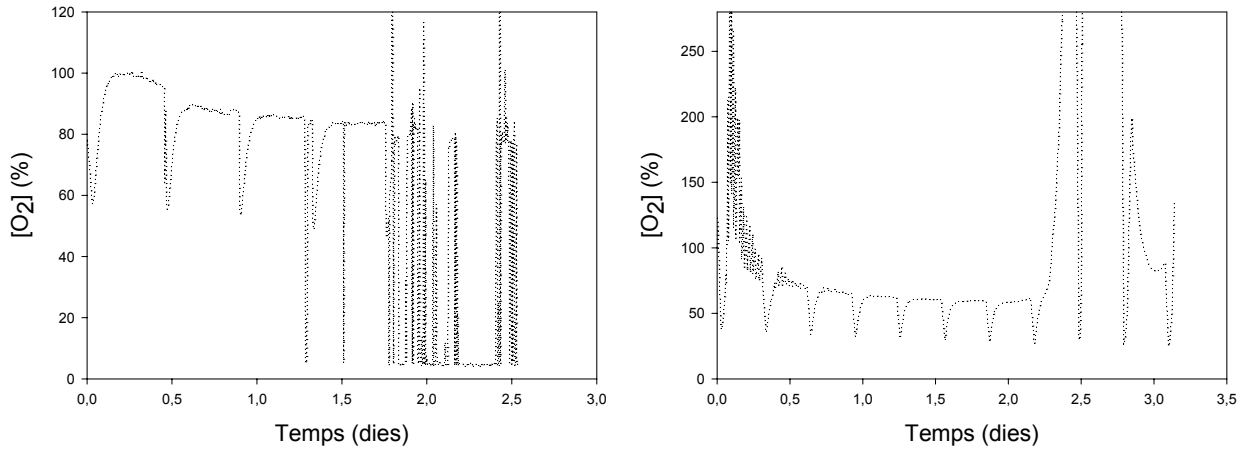


Figura 3.15 Perfils de concentració d'oxigen dissolt obtinguts mitjançant l'ús de sondes polarogràfiques per a dos cultius (repeticions) de cèl·lules *vero* efectuats en minibioreactors on s'observa l'efecte de truncaments en l'estabilitat de la mesura i de pèrdua de senyal. Els cultius s'han realitzat a les mateixes condicions de cultiu que els anteriors (figura 3.11).

A la figura 3.15 es poden observar alguns dels efectes provocats per canvis en la pressió rebuda per les sondes i la membrana d'aïllament. En el primer dels cultius (esquerra), es pot observar que la concentració d'oxigen dissolt evoluciona correctament al principi del cultiu, però a mesura que el cultiu avança, comença a haver-hi petites pèrdues de la senyal (cap als 1¼ i 1½ dies), indicant l'inici de problemes en la membrana d'aïllament, fins que al realitzar la cinquena OUR, la membrana ja no dona més de si i s'acaba per perdre totalment la estabilitat en la mesura.

Pel que fa al segon dels cultius (dreta), es pot observar que la primera de les OUR provoca una distorsió en la mesura de la concentració d'oxigen dissolt que dura aproximadament mig dia, moment en el que es recupera la estabilitat de la mesura. Als 2 dies i ¼ de cultiu, aquesta estabilitat de la mesura es torna a veure truncada al final d'una de les OURs realitzades, fent que la concentració d'oxigen prengui uns valors desorbitats quan el cultiu no es troba airejat contínuament.

Si a més dels aspectes més generals acabats de descriure, ens fixem en les pròpies sondes polarogràfiques miniaturitzades, tenim que existeixen altres factors específics que poden intensificar aquests factors inherents de les sondes polarogràfiques descrits i, per tant, que poden influenciar encara més a l'estabilitat de la mesura de l'oxigen dissolt.

El principal problema de les sondes polarogràfiques miniaturitzades és la dependència de la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi respecte el posicionament físic de la sonda al port polarogràfic. Aquest efecte, és el resultat de la construcció d'un port polarogràfic especial (figura 3.16), que evita la

invasió de la sonda al medi de cultiu i permet mantenir l'esterilitat del cultiu. La seva base és una membrana (permeable als gasos i impermeable a les solucions aquoses), on es col·loca l'electròlit necessari pel correcte funcionament de la sonda, així com un filtre que es situa entre aquesta membrana i la sonda per evitar que reaccionin entre ells.

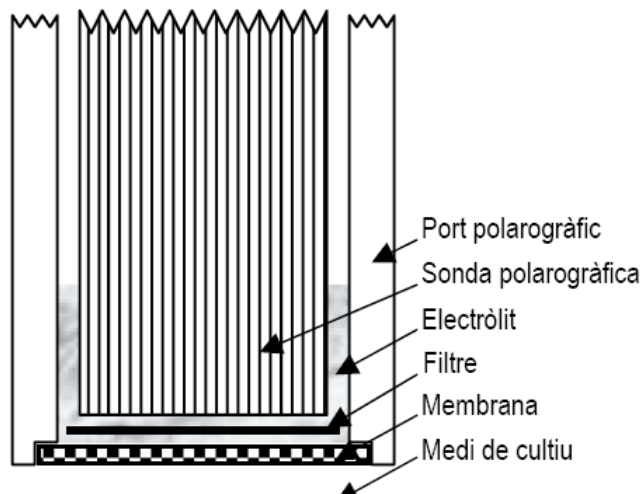


Figura 3.16 Esquema del port del minibioreactor dissenyat per a la utilització de sondes polarogràfiques miniaturitzades per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi.

Per tant, el senyal obtingut es veu influenciat per diferents factors com poden ser la distància de la sonda a la membrana o moviments varis de la pròpia sonda, provocats al no poder-se fixar completament per poder eliminar l'aire que es quedés entre la sonda i la membrana.

A més, aquesta problemàtica del posicionament físic de la sonda també augmenta la magnitud de les influències d'alguns dels factors més generals descrits anteriorment, com la pressió rebuda a la membrana sobre la mesura, ja que una variació en la pressió pot variar significativament la distància entre la membrana i la sonda polarogràfica, i les influències de les evaporacions de l'electròlit, ja que una evaporació de l'electròlit pot variar també la distància entre la sonda i la membrana, així com també pot induir a la creació de bombolles d'aire entre l'electròlit i la sonda.

Un altre dels problemes de les sondes miniaturitzades és l'envelliment més elevat de la sonda respecte a les comercials, intensificant la problemàtica del segon dels efectes generals exposats anteriorment. Aquest envelliment més pronunciat de les sondes miniaturitzades és el resultat del desenvolupament realitzat, que ha estat enfocat a obtenir un senyal amperomètric bastant superior al normal per a poder obtenir una mesura més sensible, però que significa també un augment en la quantitat de reacció que es duu a terme a la sonda i, per tant, en un envelliment més pronunciat de la mateixa.

En resum, tot i que l'ús de sondes polarogràfiques per a la mesura de l'oxigen dissolt en el medi permet el seguiment de diferents cultius cel·lulars tal i com s'ha mostrat en els experiments dels apartats 3.4 i 3.5, cal realitzar varis experiments per a obtenir-ne un de vàlid, ja que en la majoria dels seguiments realitzats de la concentració d'oxigen dissolt no es pot mantenir la estabilitat de la mesura al llarg de tot el creixement degut als inconvenients acabats d'exposar, fent que s'hagin de repetir contínuament els cultius realitzats.

Des de mitjans dels 80, es van començar a utilitzar sensors òptics per a la mesura de l'oxigen (Peterson *i col.* 1984), (Wolfbeis *i col.* 1987) i (Bacon i Demas 1987), obtenint sensors molt més robusts que els sensors polarogràfics. Des d'aleshores, ja s'han començat a utilitzar per a aplicacions biològiques (Preininger *i col.* 1994, Papkovsky 1995 i Rosenzweig i Kopelman 1995), així com per a l'ús en bioreactors d'un sol ús (Kostov i Rao 2003 i Arain *i col.* 2006), que van guanyant cada cop més terreny als sensors polarogràfics i poden aportar la mateixa informació que les sondes tradicionals (Hanson *i col.* 2007) però amb una mesura molt més robusta.

A més, la utilització de sondes òptiques, permetrà una evolució en el disseny dels minibioreactors cap a un sistema completament no invasiu (sense membranes d'aïllament sensibles a canvis en la pressió), atorgant més facilitat pel fixament d'aquestes sondes a l'interior del port corresponent, al trobar-se tancat i sense la influència ni necessitat d'altres components al seu interior.

3.7 BASES DE LA MESURA ÒPTICA D'OXIGEN

Tot i que existeixen diferents tècniques òptiques per a la determinació de la concentració de l'oxigen dissolt en el medi (l'espectroscòpia d'absorció en IR o en el visible, la refractometria i la fluorescència) la més emprada i estudiada es basa en la interferència dinàmica d'un fluoròfor sensible a l'oxigen (Wolfbeis 1991) i (Wise i Wingard 1991).

Alguns composts químics, anomenats fluoròfors o fosfòfors, produeixen emissions espontànies de llum quan aquests s'irradien mitjançant una ona electromagnètica. Tal i com es pot observar a la figura 3.17, on s'ha representat l'esquema energètic del procés d'emissió de fluorescència i fosforescència, a l'excitar aquests composts químics electromagnèticament (irradiació lumínica a una determinada longitud d'ona) des del seu estat energètic basal (S_0), els composts arriben a un estat d'energia superior (S_1 , S_2 ..., tot i que instantàniament hi ha una conversió interna (IC) de part de l'energia fins que la molècula es situa en l'estat

d'energia S_1). En aquest moment, la molècula retorna al seu estat basal emetent llum a una longitud d'ona superior a la d'excitació (ona electromagnètica de menor energia).

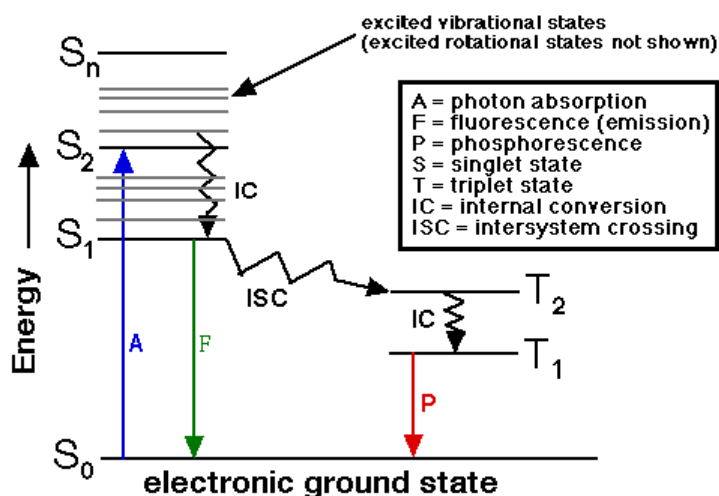


Figura 3.17 Esquema dels estats energètics del procés d'emissió de fluorescència o fosforescència d'una molècula.

Aquesta llum emesa, és designada fluorescència (F) quan no hi ha canvi en el sentit de gir dels electrons i es passa directament a l'estat d'energia basal de la molècula, mentre que es tracta de fosforescència quan prèviament a l'emissió de la llum amb el conseqüent retorn a l'estat basal de la molècula (P), una part de l'energia absorbida és utilitzada per a efectuar un canvi en el sentit de gir dels electrons (la molècula es situa en un estat energètic T_1 , d'energia inferior a l'estat S_1). D'aquesta manera, una molècula podrà emetre fosforescència si aquesta molècula disposa d'una estabilitat suficient quan es troba en aquest estat intermedi T_1 i, per tant, les emissions de fosforescència es caracteritzaran amb uns temps de vida superiors a les ones de fluorescència, així com per unes longituds d'ona més altes, al partir d'un estat energètic menor que S_1 . Tot i això, els composts químics que emeten fosforescència són més susceptibles a interaccionar amb altres molècules. En aquest treball no es farà cap diferència en el tractament segons el tipus de llum emesa.

El fet que aquests composts químics siguin interessants per a la mesura de l'oxigen dissolt, és degut a la interacció de l'oxigen en aquest procés d'emissió de fluorescència i fosforescència. Així, quan no hi ha presència d'oxigen en el medi, es pot mesurar tota l'energia transmesa en l'ona emesa obtenint un màxim en la intensitat i temps de vida d'aquesta ona, mentre que en presència de molècules d'oxigen en el medi, part de l'energia transmesa és absorbida per la molècula d'oxigen minvant-ne la intensitat i el temps de vida de l'ona emesa, essent la magnitud d'aquesta disminució funció de la concentració d'oxigen.

Així doncs, en una situació ideal, aquest procés de desactivació de la intensitat i del temps de vida de l'ona deguda a l'oxigen es pot correlacionar linealment, tal i com es pot observar a la figura 3.18, a través de l'equació d'Stern-Volmer (Fischkoff i Vanderkooi·1975), tal i com es mostra en l'equació 3.1.

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [O_2] \quad [\text{Eq. 3.1}]$$

on

I_0 i I són les intensitats de la llum emesa en absència i en presència d'oxigen respectivament,

τ_0 i τ són els temps de vida de la llum emesa en absència i en presència d'oxigen respectivament,

k_q és la constant de velocitat de desactivació que depèn de constants físiques del sistema,

$[O_2]$ és la concentració d'oxigen present en el medi.

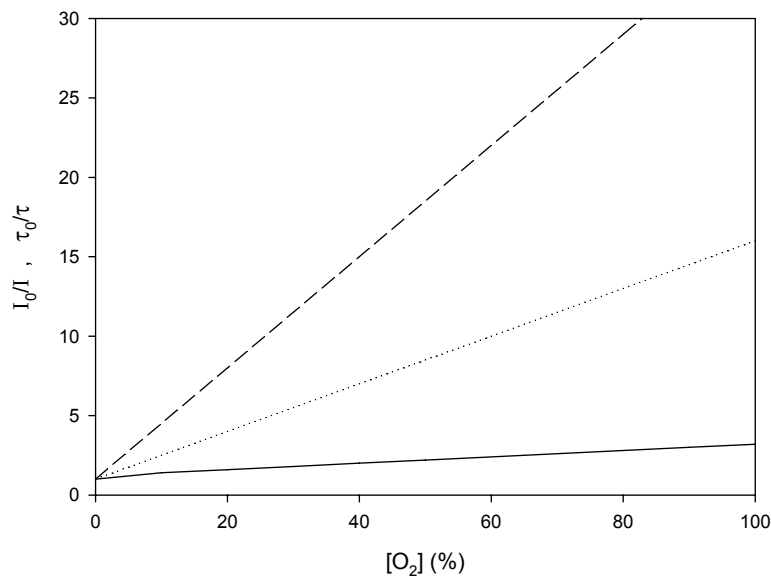


Figura 3.18 Modelització del comportament teòric de l'equació 3.1, utilitzant valors de 2,2, 15 i 35 pel factor $(k_q \cdot \tau_0)$. S'observa la disminució de la intensitat i del temps de vida de l'ona emesa segons la concentració d'oxigen present en el medi.

3.8 DESENVOLUPAMENT DE LA MESURA ÒPTICA D'OXIGEN

Queda palesa la possibilitat de determinar la concentració d'oxigen a partir d'una mesura de la intensitat o bé del temps de vida de l'ona electromagnètica emesa. Tant mateix, s'ha de tenir en compte que el mètode de detecció, juntament amb les tries del fluoròfor, de la matriu que el contindrà i el mètode de preparació de la membrana són factors crucials en el desenvolupament d'un sensor òptic per a la mesura d'oxigen (Ramasamy i Hurtubise·1983).

3.8.1 TIPUS DE FLUORÒFORS

Tal i com ja s'ha explicat anteriorment, un dels factors clau és la tria del fluoròfor que s'utilitzarà en el desenvolupament d'un sistema òptic de mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi. És necessari doncs, realitzar una bona tria d'un fluoròfor per a la mesura òptica de l'oxigen dissolt per poder partir d'una bona mesura inicial a l'hora d'optimitzar la membrana sensible a la concentració d'oxigen i poder minimitzar les possibles alternatives. Per realitzar aquesta selecció, cal estudiar el comportament dels possibles candidats prèviament descrits a la bibliografia.

Dins dels fluoròfors més comuns i utilitzats, els escollits per a realitzar-ne la caracterització es poden trobar a la taula 3.2 (amb les corresponents estructures moleculars a la figura 3.19), on es comparen les principals característiques per a la mesura de la fluorescència entre ells.

Taula 3.2 Tipus de fluoròfors segons la bibliografia per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi. Resum de característiques dels fluoròfors i comparació amb films comercials, on

$\lambda_{\text{Ex.}}$ i $\lambda_{\text{Em.}}$ (en nm) són les longituds d'ona òptimes per a l'excitació i d'emissió dels diferents fluoròfors,

$\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$ és el compost: Tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride,

$\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ és el compost: Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride,

PdOEp és el compost: 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-21H,23H-porphine palladium(II).

Fluoròfor	τ_o (μs)	$\lambda_{\text{Ex.}} / \lambda_{\text{Em.}}$	Cost film	Referències
$\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$	0.8	450 / 610	0,3 €/unitat*	(Carraway i col.·1991) (Kuncova i Fialova·1995)
$\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$	0.8	450 / 610	0,5 €/unitat*	(Bambot i col.·1994) (Amao·2003)
PdOEp	1400	546 / 670	0,4 €/unitat*	(Amao i col.·2001b) (Eaton i col.·2004)
Camphorquinone	≈ 1000	470 / 560	0,3 €/unitat*	(J. M. Charlesworth i Gan·1996) (John M. Charlesworth·1994)
Ocean Optics®	?	450 / 610	1 €/unitat	(Ocean Optics·)
Presens®	?	540 / 650	25 €/unitat	(Presens·)

*Els preus són els estimats per a la manufactura no industrial de les corresponents membranes (matèries primeres + mà d'obra).

També s'han inclòs a la taula dues membranes comercials per a la mesura d'oxigen dissolt amb característiques similars als fluoròfors escollits per a poder realitzar comparacions al llarg del desenvolupament de la membrana sensible a la concentració d'oxigen dissolt, com són el d'*Ocean Optics*, desenvolupat mitjançant $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ i, per tant, amb les característiques dels composts de Ruteni (i

amb característiques també similars a la Camforquinona), i el de *Presens*, de composició desconeguda però amb característiques similars als composts de porfirines com el PdOE_p.

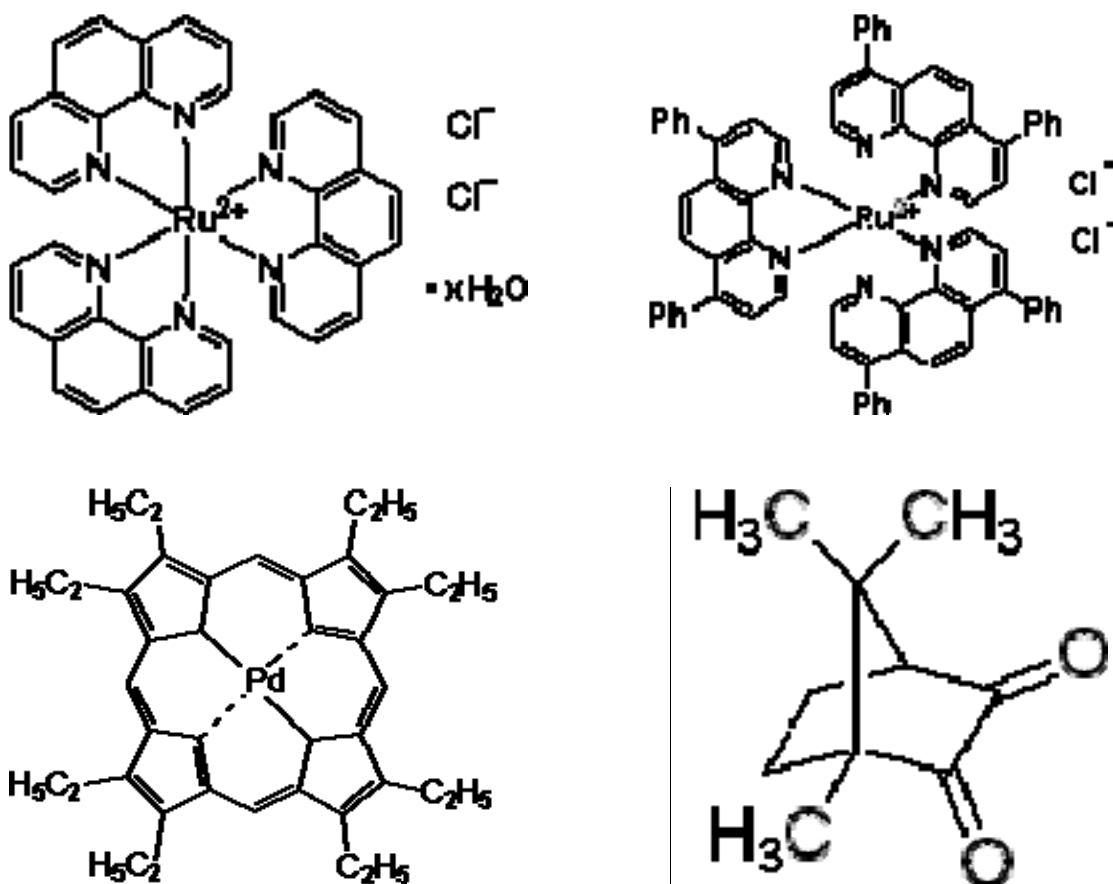


Figura 3.19 Estructura molecular dels diferents fluoròfors escollits bibliogràficament per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt. Per ordre d'esquerra a dreta i de dalt a baix, les estructures moleculars corresponen als fluoròfors de Ru(p₃)(ClO₄)₂, Ru(dpp)₃(ClO₄)₂, PdOE_p i Camforquinone.

Tot i que hi ha un gran ventall de possibles fluoròfors a ser utilitzats, com per exemple hidrocarburs policíclics aromàtics (Xu i col.:1995), composts de platí (Douglas i Eaton:2002; Lee i Okura:1998), d'iridi (Amao i col.:2001a) i composts d'osmi (Xu i col.:1996) entre molts altres, n'hi ha una gran majoria que presenten una sèrie de desavantatges, si es té en compte que el principal objectiu del propi desenvolupament de la membrana per a la mesura de l'oxigen dissolt és la seva utilització dins de la plataforma HexaScreen de cultiu en minibioreactors, i que aquestes membranes hauran de ser d'un sol ús.

Per tant, s'ha de tenir en compte factors com la facilitat d'obtenció del producte, el preu del fluoròfor i del sistema de mesura necessari, la complexitat de la producció de la membrana i la possible industrialització del procediment de muntatge. Tal i com es pot observar a la taula 3.2, els preus de les membranes comercials inhabiliten la possibilitat del seu ús en tecnologies d'un sol ús que, juntament amb els

problemes d'elevats temps d'entrega i de disponibilitat del producte, confirmen la necessitat del propi desenvolupament d'una membrana de mesura.

Cal tenir en compte també, que el temps de vida és inversament proporcional a la complexitat del sistema de mesura, necessitant realitzar mesures a freqüències més elevades quan el temps de vida de l'ona emesa és més curt. Per tant, la possibilitat de realitzar mesures de fluorescència mitjançant fluoròfors amb elevats temps de vida recau en l'abaratiment del sistema de mesura necessari per a la quantificació de fluorescència. Finalment, també es mostren les longituds d'ona d'excitació i d'emissió per tal de poder comparar-les amb les membranes comercials.

3.8.2 MESURES D'INTENSITAT EN FLUORÍMETRES COMERCIALS

Així doncs, per tal d'escollir el fluoròfor amb millors condicions per a la mesura de l'oxigen dissolt en el medi caldrà realitzar proves de funcionament fins que es pugui determinar quin dels fluoròfors escollits té unes millors propietats inicials de les que partir per aconseguir una mesura òptica òptima. El primer pas es basarà en la determinació de l'efecte de la concentració d'oxigen en els fluoròfors.

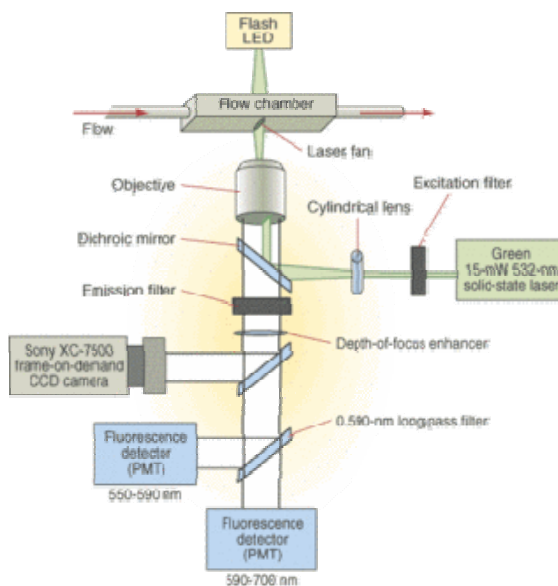


Figura 3.20 Esquema de funcionament d'un fluorímetre comercial.

Per a l'observació de l'efecte de la concentració d'oxigen a cada un dels fluoròfors escollits, i en cas necessari fer una primera selecció, s'han realitzat unes mesures mitjançant un fluorímetre comercial. Aquest fluorímetre, tal i com es pot observar a la figura 3.20, es basa en l'excitació mitjançant una llum monocromàtica (a una longitud d'ona concreta segons el fluoròfor a mesurar) d'una cubeta a on es troba el fluoròfor del que es vol observar el funcionament. A l'excitar el fluoròfor a la longitud d'ona corresponent, aquest emet una fluorescència que es recollida per un detector d'intensitat que determina la magnitud

lumínica (intensitat respecte un LED de referència intern) de l'ona de fluorescència, ja sigui a una longitud d'ona determinada o en un rang concret de longituds d'ona.

Així doncs, l'efecte de la concentració d'oxigen a cada fluoròfor, es determinarà amb el fluorímetre comercial (figura 3.21), tot comparant la variació de la fluorescència emesa en absència i presència d'oxigen pels diferents fluoròfors (a 0% i 100% d'oxigen dissolt en el medi) en un rang de longituds d'ona situat al voltant de la longitud d'ona òptima de mesura de l'emissió de cada fluoròfor. Les concentracions de 0% i 100% d'oxigen dissolt s'assoleixen mitjançant el bombolleig amb un cabal continu de 0,3 l/min de nitrogen i aire respectivament durant un mínim de 30 minuts, a la cubeta de mesura del fluorímetre amb la presència del fluoròfor corresponent.

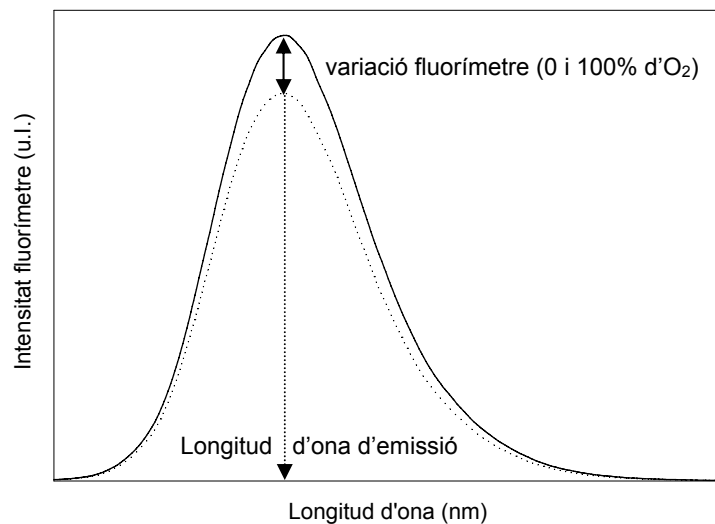


Figura 3.21 Perfils teòrics de la intensitat mesurada amb el fluorímetre respecte la longitud d'ona de mesura, obtinguts per a les mesures de fluorescència en presència (···) i en absència (—) d'oxigen dissolt en el medi. El rang de longituds d'ona de mesura es troba situat al voltant de la longitud d'ona d'emissió òptima per a cada fluoròfor (fletxa simple). La variació d'intensitat deguda a l'oxigen de cada un dels fluoròfors es mesura a partir de la comparació de les intensitats obtingudes en el màxim d'intensitat mesurada (fletxa doble).

Tot i que els fluorímetres es troben concebuts per a la mesura de solucions homogènies, la utilització dels fluoròfors solubilitzats en el medi de cultiu presenta un parell de problemàtiques significatives. Per una banda, el fet que sigui impossible la recuperació del fluoròfor utilitzat pels cultius de cèl·lules animals, juntament amb els continus recanvis de medi necessaris fan que els costos derivats de la utilització dels fluoròfors en solució sigui massa elevat (els fluoròfors tenen un cost elevat), de manera que la seva utilització en solució es troba desaconsellada. Per altra banda, la gran majoria de fluoròfors són unes molècules complexes, que solen comportar una toxicitat en cultius de cèl·lules animals, tal i com es mostra en la figura 3.22, on s'ha verificat la toxicitat del $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ en solució pels cultius de cèl·lules animals (hibridomes).

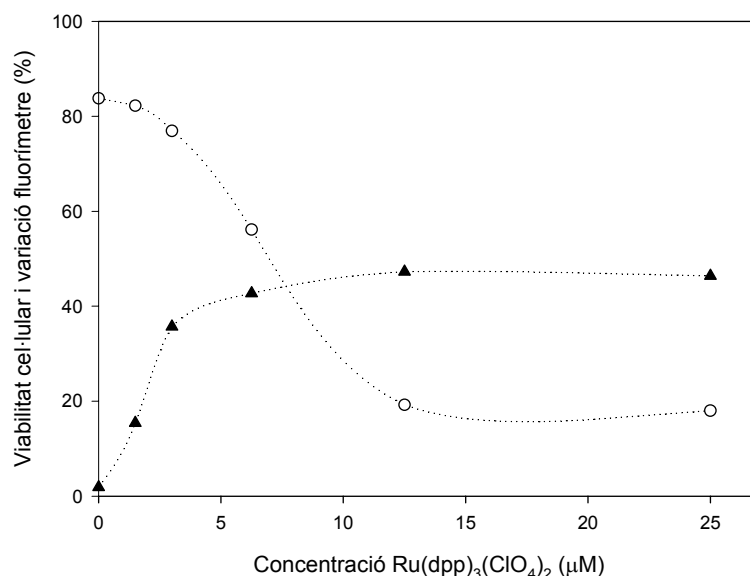


Figura 3.22 Toxicitat del $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ en solució per a cultius de cèl·lules animals (hibridomes). S'ha representat el perfil obtingut de la viabilitat cel·lular obtinguda al final de 74 hores de cultiu (símbol $\circ$ i línia $\cdots$), en funció de la concentració del compost present en el medi de cultiu. S'ha trobat interessant representar també la variació total d'intensitat del fluorímetre (símbol $\blacktriangle$ i línia $\cdots$), obtinguda entre les mesures en presència i absència d'oxigen dissolt, i en funció de la concentració del compost. Dades obtingudes de (Soley·2010).

Així doncs, s'ha mesurat la toxicitat d'aquest fluoròfor de ruteni en solució en funció de la concentració de fluoròfor dissolt en el medi (concentracions entre 0 μM , actuant com a control, i 25 μM), mitjançant la mesura de les cèl·lules viables i mortes i el càlcul de la viabilitat cel·lular corresponent al final de 72 hores de cultiu en presència de les diferents concentracions de fluoròfor escollits. Es pot observar amb el perfil de viabilitat obtingut, com aquesta va decreixent ràpidament, sobretot a partir d'una concentració de 2,5 μM , fins a estabilitzar-se a una concentració pràcticament ínfima a partir de la concentració de 12,5 μM . Amb aquest comportament, la viabilitat parteix del 85% en el cultiu sense presència de fluoròfor en el medi, passant pel 78% quan la concentració del compost de ruteni és de 2,5 μM i estabilitzant-se a una viabilitat de només 20% per a concentracions superiors a 12,5 μM .

S'ha trobat interessant complementar la figura amb el perfil de la variació de la intensitat mesurada amb el fluorímetre deguda a la presència d'oxigen (mesurada segons figura 3.21) en funció de la concentració de fluoròfor present en el medi, perfil en el que es pot observar que la variació de la intensitat deguda a l'oxigen no s'estabilitza fins a una concentració de fluoròfor d'aproximadament 10 μM , de manera que la utilització del fluoròfor a les concentracions en les que la toxicitat no és molt elevada (menor de 2,5 μM) fa que la variació de la intensitat deguda a l'oxigen no és trobi estabilitzada i, per tant, que comporti una gran variabilitat en la mesura de l'oxigen dissolt, mentre que la utilització de concentracions de fluoròfor a una

concentració suficientment elevada per a tenir una variació de la intensitat estable suposaria treballar amb una viabilitat del 20% en els cultius monitorats.

Així doncs, les preparacions dels fluoròfors per a aquestes mesures inicials per a la determinació de la variació de la intensitat mesurada en el fluorímetre deguda a la concentració d'oxigen dissolt en el medi es realitzaran seguint els protocols bibliogràfics per a la inclusió del mateixos en membranes (referències taula 3.2, protocols a l'apartat 8.7.4 de Materials i Mètodes). Es realitzaran mesures puntualment, per a cada fluoròfor, amb el fluorímetre comercial un cop acomplert el temps mínim de bombolleig per assegurar-ne les concentracions d'oxigen dissolt, mesures efectuades en un rang ampli de longituds d'ona al voltant de la longitud d'ona bibliogràfica corresponent per a cada fluoròfor (taula 3.2). Al tractar-se de mesures per determinar la funcionalitat dels diferents fluoròfors, no s'ha vist necessari realitzar aquestes mesures d'intensitat per les membranes comercials, on la seva funcionalitat ja ve demostrada pels diferents fabricants.

Els resultats obtinguts pels diferents fluoròfors escollits es poden observar a continuació a la figura 3.23, on s'han representat els perfils d'intensitat obtinguts en funció de la longitud de l'ona emesa en presència i absència d'oxigen dissolt (0 i 100% d'oxigen dissolt respectivament). Amb aquests perfils d'intensitat obtinguts es pot observar clarament, pels diferents fluoròfors mesurats, aquest comportament teòric corresponent a l'efecte d'inhibició de l'ona emesa produït per la presència de l'oxigen, inhibició que es tradueix en una disminució de la intensitat en les mesures obtingudes.

Si entrem en detall per a cada fluoròfor, es pot observar que pel $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$ (A), existeix un màxim d'intensitat a la longitud d'ona de 585nm, longitud d'ona on la mesura es veu inhibida quasi un 35% per la presència d'oxigen. Per l'altre compost de ruteni, el $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ (B), els resultats són molt similars, però obtenint el màxim a la longitud d'ona de 600nm i amb una corresponent inhibició de la intensitat d'aproximadament el 50%.

En el cas del PdOEp (C), es pot observar que existeixen dos màxims d'intensitat corresponents a les emissions de fluorescència ($\lambda=670\text{nm}$) i fosforescència ($\lambda=690\text{nm}$) del fluoròfor, obtenint una variació de la intensitat respecte la concentració d'oxigen més gran, i per tant més adequada per a la mesura de la concentració d'oxigen, per a l'emissió de fluorescència. Es pot comprovar que la longitud d'ona òptima per a la mesura de la concentració d'oxigen coincideix amb la bibliogràfica ($\lambda=670\text{nm}$), obtenint una inhibició de fins el 50% de la intensitat en absència d'oxigen.

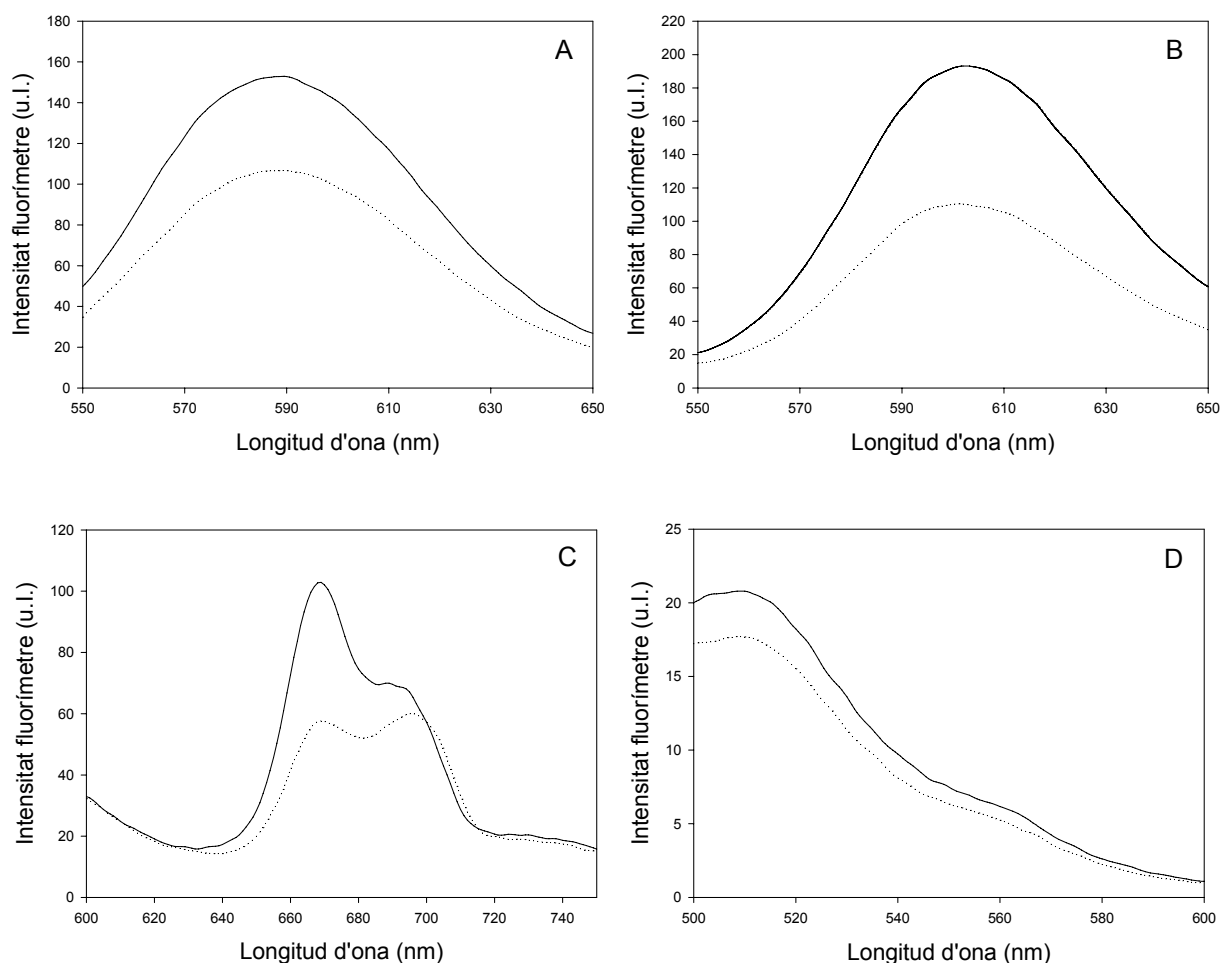


Figura 3.23 Representacions dels perfils d'intensitat de l'ona emesa en presència (···) i absència d'oxigen (—) per a diferents fluoròfors. Les intensitats s'han mesurat en un rang de longitud d'ona al voltant de la longitud d'ona bibliogràfica corresponent pels diferents fluoròfors, mitjançant el fluorímetre comercial. Els fluoròfors mesurats són $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$ (A), $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ (B), PdOEp (C) i Camphorquinone (D).

Finalment, per la Camforquinona, es pot observar com a la longitud d'ona bibliogràfica ($\lambda=560\text{nm}$) hi ha un petit pic de variació d'intensitat de la fluorescència però, al trobar-se superposat amb un altre pic situat a una longitud d'ona de 510 nm , s'obté una variació de la intensitat deguda a la presència d'oxigen molt petita, tant en valors absoluts com per a valors relatius, comportant una baixa sensibilitat i funcionalitat del fluoròfor per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt. A més, aquest pic situat a 510nm , es troba molt pròxim a les longituds de l'ona d'excitació (centrada a una $\lambda=470\text{nm}$) i, per tant, aquest també es troba influenciat per la mesura de la pròpia ona d'excitació.

Tot i que els resultats obtinguts en els perfils d'intensitat respecte la longitud d'ona de mesura en presència i en absència d'oxigen en el medi, ja semblen suficients per indicar que l'únic dels fluoròfors que no és adequat pel seguiment de la concentració d'oxigen dissolt és la Camforquinona, amb una variació de la intensitat molt baixa (aproximadament del 15%), s'ha trobat interessant complementar els resultats

obtinguts mitjançant el seguiment de la intensitat de l'ona emesa al llarg, mitjançant el fluorímetre comercial, d'un procés de reabsorció de l'oxigen a l'interior de la cubeta de mesura del fluorímetre comercial. Aquests perfils d'oxigen al llarg del procés de reabsorció de l'oxigen permetran comparar i analitzar la sensibilitat de la mesura d'oxigen dels diferents fluoròfors i d'aquesta manera, permetran confirmar i demostrar les funcionalitats suposades amb els resultats anteriors pels diferents fluoròfors.

Pel monitoratge d'aquest procés de reabsorció d'oxigen, s'efectua el desplaçament de l'oxigen mitjançant el bombolleig amb un cabal de 0,3 l/min de nitrogen a l'aigua amb el fluoròfor de l'interior de la cubeta de mesura durant un mínim de 30 minuts (temps mínim per assegurar una concentració d'oxigen aproximadament nul·la). Un cop passat aquest temps, el bombolleig s'atura i s'inicien les mesures cada 10 segons de la intensitat a la longitud d'ona òptima determinada anteriorment per a cada un dels fluoròfors.

Els perfils d'intensitat obtinguts de l'ona emesa al llarg del temps es troben representats a continuació a la figura 3.24, juntament amb els corresponents perfils normalitzats respecte la mesura sense presència d'oxigen dissolt (la primera mesura, equivalent al valor màxim d'intensitat) per, d'aquesta manera, poder realitzar una millor comparació dels diferents fluoròfors entre ells.

Teòricament, al tractar-se d'una reabsorció de l'oxigen en el medi, la intensitat de l'ona emesa s'ha de veure cada cop més inhibida a mesura que va passant el temps i la concentració d'oxigen dissolt va augmentant, dibuixant un perfil decaient amb una cinètica de primer ordre.

Aquest comportament teòric general, es pot observar per a tots els fluoròfors, però amb resultats diferents. Mentre que pel cas dels dos fluoròfors de ruteni i pel de pal·ladi, s'obté un perfil amb una sensibilitat adequada pel seguiment de l'oxigen, es pot observar que en el cas de la camforquinona, la sensibilitat de la mesura és molt baixa amb una variació de només 1,6 u.l., respecte les variacions de 35, 60 i 30 u.l. dels composts de $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$ (figura 3.24, A), $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ (figura 3.24, B) i PdOEp (figura 3.24, C) respectivament.

A més, amb la representació de la variació percentual al llarg de l'absorció de l'oxigen (línia – –), es pot comprovar per la camforquinona també dona una variació molt baixa, arribant només a una disminució del 11% de la intensitat al passar de 0 a 100% d'oxigen dissolt, mentre que pels altres fluoròfors s'obtenen variacions del 25, 31 i 41% dels composts de $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$ (figura 3.24, A), $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$ (figura 3.24, B) i PdOEp (figura 3.24, C) respectivament.

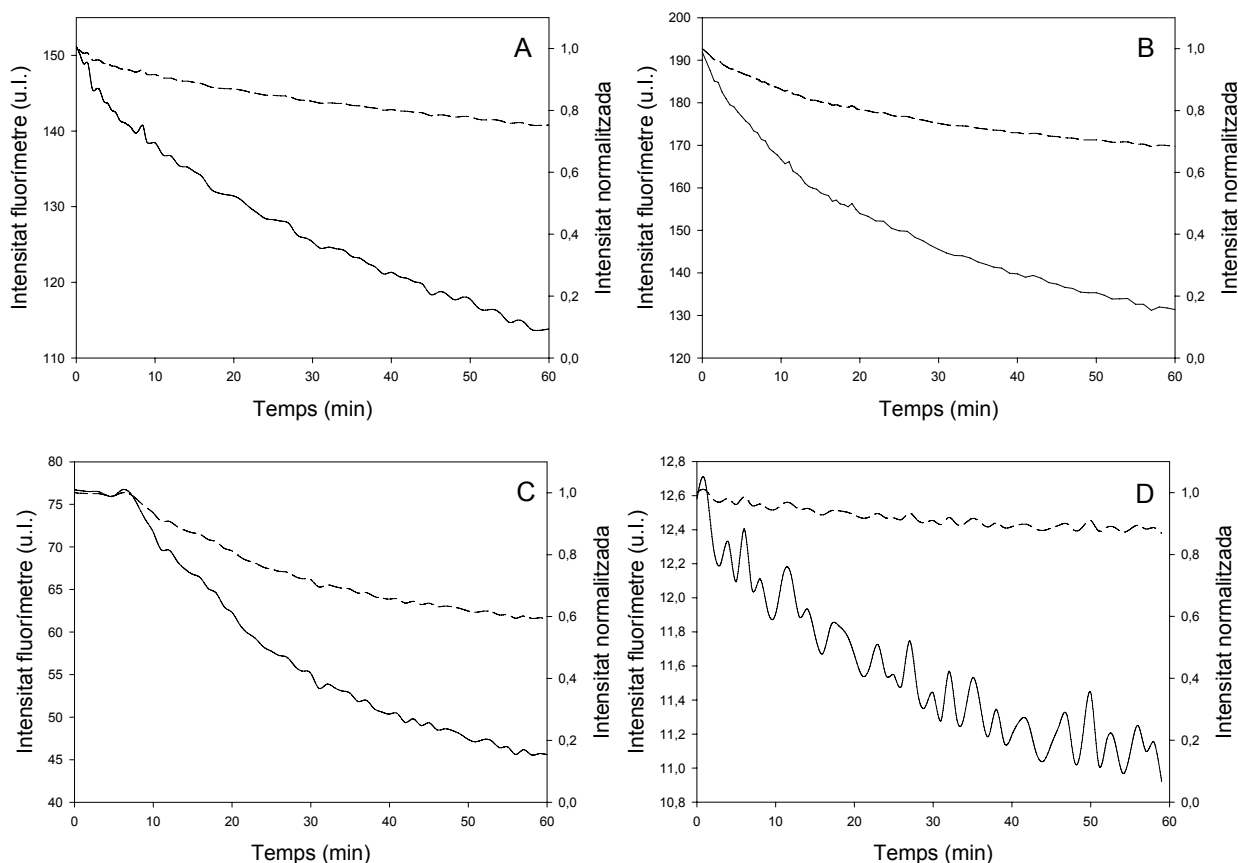


Figura 3.24 Perfils d'intensitat de l'ona emesa (—) i de la seva normalització (respecte la mesura inicial en absència d'oxigen dissolt en el medi, - -) al llarg del temps durant un procés de reabsorció de l'oxigen dissolt per a diferents fluoròfors, mesurats a les longituds d'ona òptimes corresponents. Els fluoròfors mesurats són $\text{Ru(p)}_3(\text{ClO}_4)_2$ (A), $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ (B), PdOEp (C) i Camphorquinone (D).

Així doncs, amb els perfils de les variacions de la intensitat degudes a la concentració d'oxigen dissolt en un rang de longituds d'ona al voltant del valor òptim bibliogràfic, juntament amb els perfils d'intensitat al llarg de l'absorció de l'oxigen en un medi aquós desplaçat mitjançant nitrogen gasos, es pot concloure que dels diferents fluoròfors escollits pel seguiment de la concentració d'oxigen dissolt en el medi, pot descartar-se la camforquinona, ja que a més de donar una variació molt petita al passar de 0 a 100% d'oxigen dissolt, la sensibilitat adquirida és molt més baixa que per a la resta, inhabilitant-la per a la mesura de l'oxigen dissolt en el medi.

Pel que fa als altres fluoròfors, no n'hi ha cap que sobresurti significativament, ja que tots tenen una variació relativa de la intensitat semblant (entre 35 i 50%) i les sensibilitats assolides en els perfils d'absorció de l'oxigen són molt semblants.

3.8.3 ELECCIÓ DEL MÈTODE DE DETECCIÓ

Per a poder avançar en la tria i optimització del fluoròfor per a la mesura d'oxigen dissolt, cal elegir quin serà el mètode de detecció per tal de poder escollir aquell fluoròfor que doni uns millors resultats en el sistema definitiu de mesura ja que les característiques i, per tant la seva funcionalitat i optimització, dependran d'aquesta elecció del mètode de detecció.

Tot i que la mesura de la intensitat de la llum emesa per el fluoròfor equival a la utilització un sistema de mesura més simple que la mesura del corresponent temps de vida, la mesura de la intensitat lumínica comporta diferents problemes d'atenuació i pèrdua de llum al llarg del sistema, així com el propi envelliment del fluoròfor (fotodescomposició), que situa a la determinació de la concentració d'oxigen a través de la mesura del temps de vida de l'ona emesa per sobre de la mesura de la seva intensitat pel seguiment de la concentració d'oxigen dissolt en cultius de cèl·lules animals, amb temps de cultiu elevats que intensifiquen les problemàtiques descrites (Berndt i Lakowicz·1992) i (Lakowicz·1983). Per tant, tot i els bons resultats obtinguts en les mesures d'intensitat de l'ona emesa, aquestes problemàtiques qüestionen la mesura de la intensitat de l'ona emesa pel seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents.

El mètode de detecció més adequat per a la mesura del temps de vida del fluoròfor, és la desmodulació coherent per a l'obtenció de la fase d'una modulació de l'amplitud de les ones electromagnètiques emeses respecte l'ona d'excitació, fase relacionada amb el temps de vida de l'ona emesa segons l'equació 3.2, mostrada a continuació:

$$\tau = \frac{\tan(-\phi)}{2\pi f_0} \quad [\text{Eq. 3. 2}]$$

on

τ és el temps de vida del fluoròfor en presència o absència d'oxigen,

ϕ és la fase mesurada de l'ona emesa, i

f_0 és la freqüència de màxima interferència de l'oxigen en el temps de vida del fluoròfor.

Amb aquesta equació es podrà trobar el temps de vida de les ones emeses a partir de les mesures de fase realitzades a través de la sonda i, mitjançant la realització d'un calibrat de l'equació d'Stern-Volmer (equació 3.1), es podrà trobar el valor de la concentració d'oxigen dissolt en el medi.

L'equip de mesura basat en la desmodulació coherent utilitzat per a la caracterització de la mesura d'oxigen i tria del tipus de fluoròfor, que ha estat desenvolupat pel Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC i es pot observar a continuació a la figura 3.25, consta de l'analitzador d'impedàncies HP4192A utilitzat en aquest cas com a analitzador de resposta en freqüència, amb capacitat per a la mesura de la relació de fases, un ordinador per a l'enregistrament de les dades, una sonda de doble fibra òptica (una fibra per a portar l'ona d'excitació i una per recollir l'ona d'emissió) que s'acoba al port òptic d'un minibioreactor, una font d'alimentació per a crear la part contínua de l'ona d'excitació i una caixa de connexions entre l'analitzador i les fibres òptiques, que conté el LED d'excitació, els filtres a les longituds d'ona adequades per a cada fluoròfor, així com el fotodetector i els circuits d'excitació i de detecció.

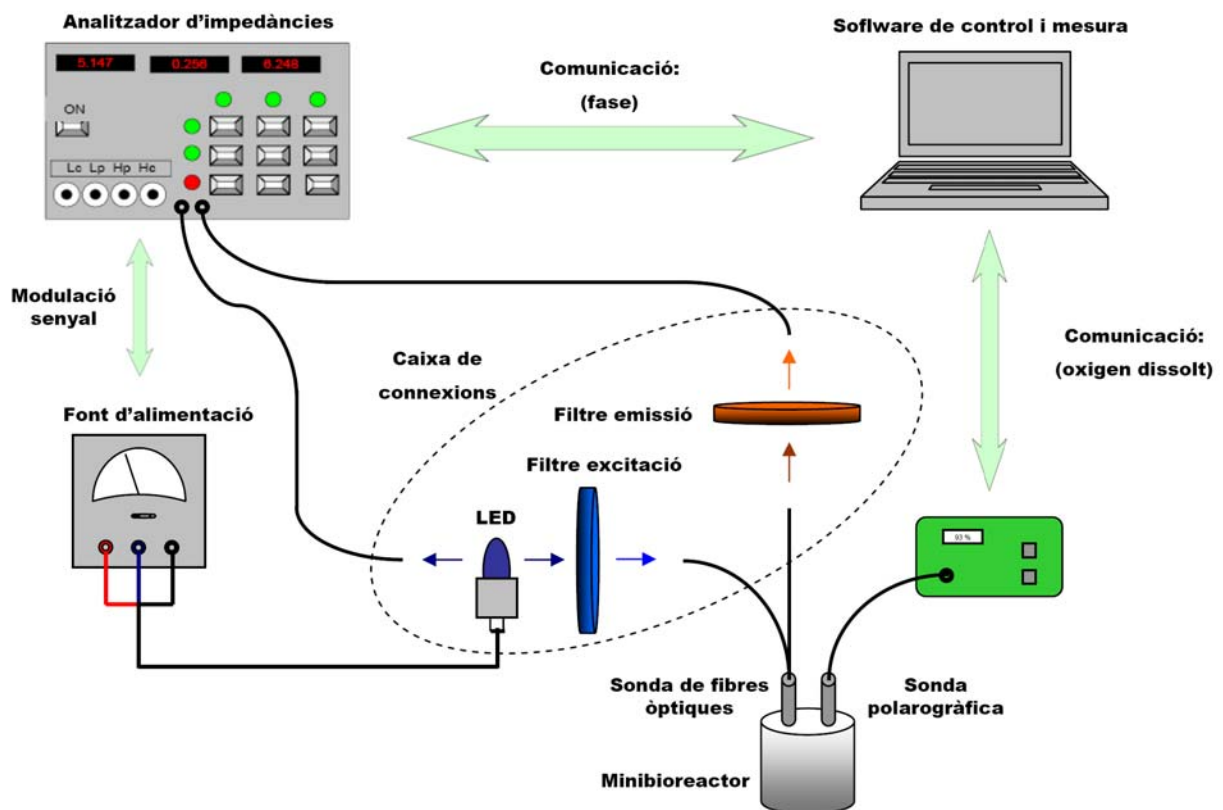


Figura 3.25 Esquema de l'equip necessari per a la caracterització de la mesura de la concentració d'oxigen dissolt basada en la variació de fase mitjançant la desmodulació coherent de les ones electromagnètiques d'excitació i emissió, junt amb el sistema polarogràfic de mesura de la concentració d'oxigen dissolt (mesura de referència).

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, aquest sistema òptic basat en la desmodulació coherent de les ones d'excitació i emissió és el sistema de mesura de l'oxigen dissolt més adequat, gràcies a la menor influència d'efectes externs a la mesura com l'atenuació de la llum al llarg del sistema òptic o la fotodescomposició del fluoròfor entre altres. Tot i això, per a poder tenir un funcionament òptim del sistema de mesura, el fet de ser un sistema basat en la desmodulació coherent entre les dues ones d'excitació i

emissió implica unes necessitats mínimes. Per a que la mesura no tingui un error massa elevat, cal que la relació entre les intensitats de les ones d'emissió i d'excitació sigui suficientment elevada per a permetre la seva comparació per a la conseqüent mesura de la variació de fase obtinguda entre les dues ones.

Així doncs, caldrà trobar un fluoròfor amb el que s'obtingui una suficientment bona relació d'intensitats entre les ones per a poder mesurar l'oxigen dissolt amb una bona sensibilitat. Una altra possibilitat per aconseguir augmentar suficientment la relació entre les intensitats de les ones d'emissió i excitació d'un fluoròfor que no disposés d'una relació prou elevada, seria mitjançant la implementació d'un amplificador per a l'ona d'emissió, però amb la problemàtica que aquesta solució també implicaria un encariment massa elevat del sistema de mesura. Per tant, es comprovarà primerament si els fluoròfors escollits disposen d'una bona relació d'intensitats entre les ones d'emissió i excitació.

3.8.4 MESURES DE VARIACIÓ DE FASE EN L'EQUIP DE MESURA

Un cop s'ha escollit el sistema de detecció i es disposa de l'equip de mesura corresponent, ja es pot reprendre la comparació entre els diferents fluoròfors per tal de poder determinar quins dels diferents fluoròfors són aptes pel seguiment de la concentració d'oxigen dissolt mitjançant desmodulació coherent i, d'aquesta manera, poder escollir-ne el fluoròfor amb millors resultats per a realitzar-ne la seva optimització per a la mesura de fluorescència.

Per a realitzar aquesta comparació s'ha efectuat, per a cada un dels diferents fluoròfors, el seguiment de la variació de la fase entre les ones d'emissió i d'excitació al llarg d'un procés de desorció de l'oxigen dissolt. La mesura de la fase es duu a terme en un rang de freqüències situat al voltant de la freqüència de màxima interferència deguda a la presència d'oxigen, freqüència que queda determinada a partir del temps de vida del fluoròfor teòric (valors de temps de vida a la taula 3.2, relacionats amb la freqüència f_0 a través de l'equació 3.2).

A més, els valors de la variació de la fase entre les ones d'emissió i excitació (a partir d'ara només s'utilitzarà la paraula fase) es normalitzen respecte els valors de la mesura inicial efectuada en presència d'una concentració d'oxigen dissolt del 100% i, per tant, a un temps de vida curt de l'ona emesa. Aquesta normalització fa que, tal i com es mostra a la figura 3.26, a mesura que es va desplaçant l'oxigen dissolt de l'aigua ultrapura, el temps de vida de l'ona emesa es va allargant fent disminuir el valor de la fase per a una mateixa freqüència. Així els perfils de fase al llarg de la freqüència s'han d'anar tornant cada vegada més negatius fins a assolir un valor mínim corresponent a una concentració nul·la d'oxigen dissolt.

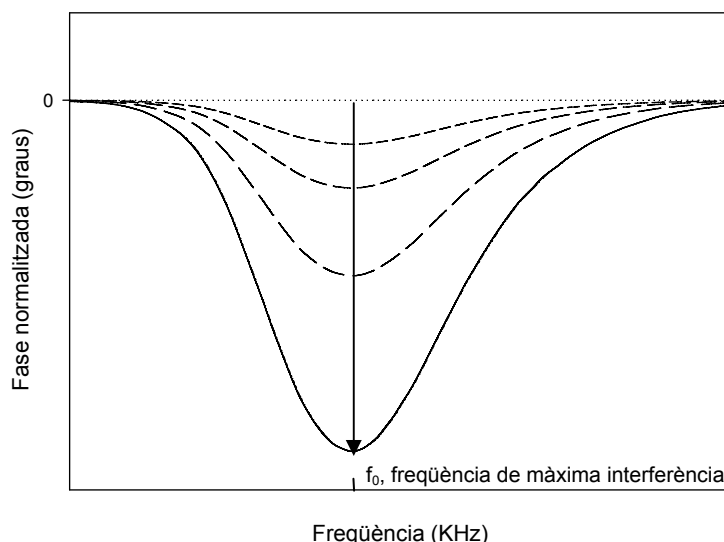


Figura 3.26 Perfils teòrics de la fase mesurada en un rang de freqüències al voltant de f_0 , efectuats al llarg d'un procés de desorció de l'oxigen dissolt (evolució temporal indicada mitjançant la fletxa), disminuint d'una concentració d'oxigen dissolt inicial del 100% (línia ---) al 0% d'oxigen dissolt present al final de l'experiment (línia —).

Per a realitzar aquest experiment, s'han mesurat els perfils de fase en un minibioreactor amb 13 ml d'aigua ultrapura, a la que s'ha aplicat un cabal continu de 0,3 l/min de nitrogen per l'espai de capçal del minibioreactor, on les membranes dels diferents fluoròfors, que han estat preparats seguint els mateixos protocols que en l'apartat 3.8.2, s'han adherit al port òptic de la tapa d'un minibioreactor mitjançant una cola òptica (Nordland optical adhesive).

Aquesta cola òptica, tot i ser tòxica pels cultius cel·lulars (segons el fabricant) i per tant, no es podria utilitzar pel seguiment de la concentració d'oxigen en cultius cel·lulars, sí que és útil per a les caracteritzacions dels fluoròfors quan aquestes membranes no es troben associades a un creixement cel·lular, ja que al ser una cola de qualitat òptica, elimina les possibles variacions relacionades amb l'adhesió de la membrana, permetent centrar-se només en les variacions degudes als fluoròfors. Per finalitzar, s'han comparat els resultats adquirits pels diferents fluoròfors amb els obtinguts per a les membranes comercials.

A la figura 3.27 representada a continuació, s'han superposat el global dels perfils de fase al llarg del procés de desplaçament de l'oxigen dissolt pels diferents fluoròfors amb resultats diversos. Aquests perfils de fase s'han obtingut per a un rang de freqüències situat al voltant de la freqüència òptima de mesura del corresponent fluoròfor monitorat.

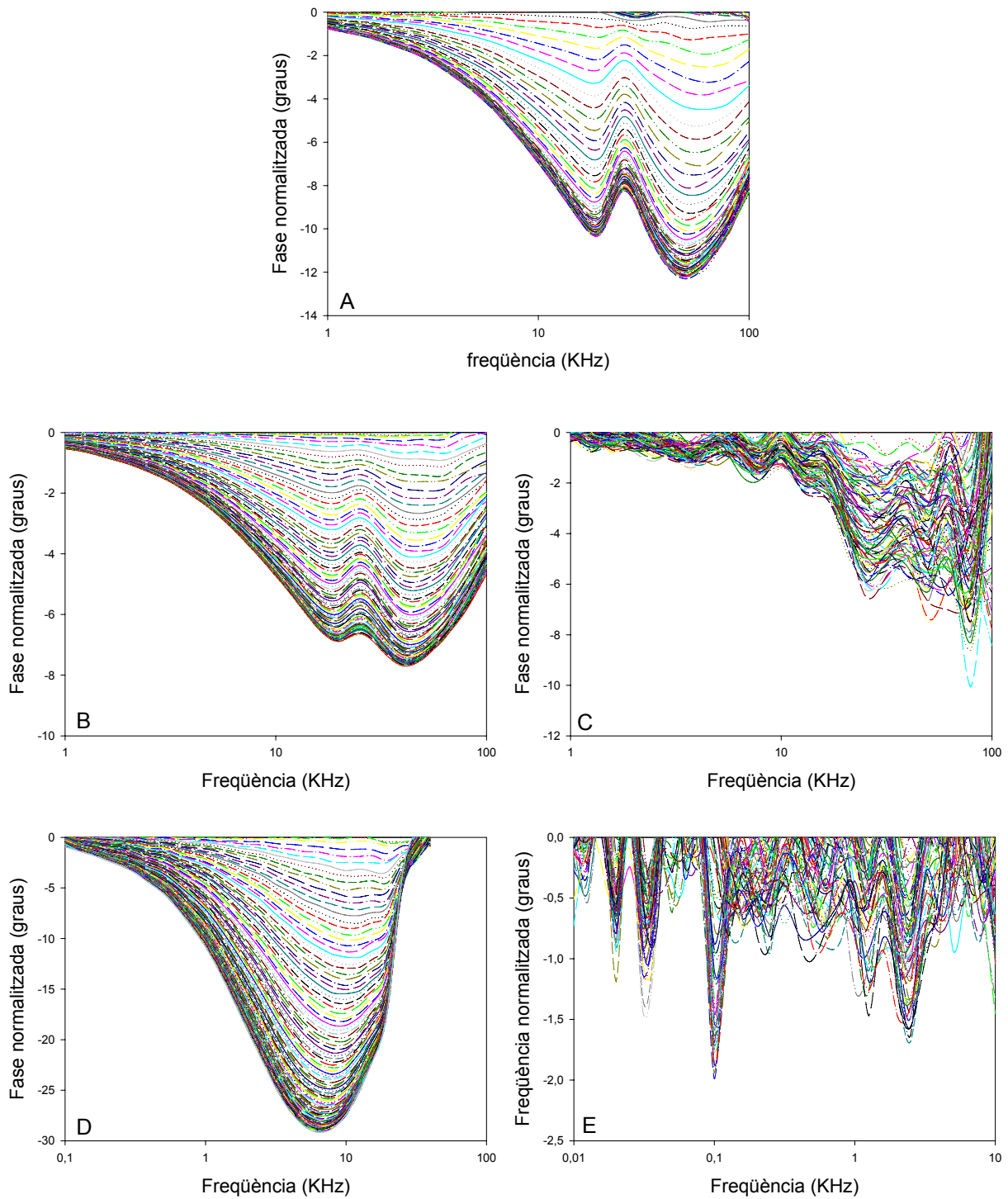


Figura 3.27 Evolució dels perfils de fase (normalitzada respecte la mesura inicial a una concentració d'oxigen del 100%) en funció de la freqüència al llarg d'un procés de desorció de l'oxigen dissolt en aigua ultrapura. Les membranes monitorades són la comercial d'Ocean Optics (A), la de Ru(dpp)₃(ClO₄)₂ (B), la de Ru(p)₃(ClO₄)₂ (C), la comercial de Presens (D) i la de PdOEp (E).

Si observem els perfils de fase obtinguts per a la membrana comercial d'Ocean Optics (gràfica A), la tendència diminutiva teòrica de la fase al llarg del procés de desorció és molt visible obtenint dues

freqüències amb màxims de variació, a 30 i 50 KHz aproximadament, essent més gran la variació de fase obtinguda per a la freqüència de 50 KHz. A més a més, si es miren els valors de la fase abans de normalitzar-los, s'obté que aquests ronden els -90° a 30 KHz i per tant, es troben molt propers a una indeterminació i font d'error per a l'obtenció del temps de vida de l'ona emesa ($\tau \propto \tan(-\phi)$, equació 3.2), essent segurament la causant d'aquest màxim en la variació de fase. Així, la freqüència òptima pel seguiment de la concentració d'oxigen dissolt en composts de ruteni és de 50 KHz.

Si comparem els perfils obtinguts per a les dues membranes dels fluoròfors de ruteni, es poden observar dues tendències ben diferents. Mentre que els perfils obtinguts amb el $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ (gràfica B) segueixen la mateixa tendència que la membrana comercial d'una manera ben definida, pel $\text{Ru(p)}_3(\text{ClO}_4)_2$ (gràfica C), tot i que els perfils de fase al voltant de la freqüència de 50 KHz són cada cop més negatius al llarg del procés de desorció i els valors de variació de fase són similars en magnitud, es pot observar com la definició d'aquests perfils és molt baixa i es troba plena de variacions i errors en la mesura.

Per altra banda, si observem els perfils de fase obtinguts per a la membrana comercial de Presens (gràfica D), s'obté una tendència diminutiva molt ben definida amb un màxim de variació de fase als 8 KHz de freqüència, freqüència òptima aproximada pels composts de porfirines. Si s'observen però els perfils obtinguts pel PdOEp, s'obté que és impossible pràcticament la visualització de cap freqüència amb un màxim de variació de fase en tot el rang, ja que si es té en compte que aquest compost és el de major temps de vida dels composts de la mateixa família, la freqüència màxima hauria de situar-se una mica per sota dels 8 KHz trobats per a la membrana comercial.

Tot i que si es comparen les dues membranes comercials entre elles, la variació de fase màxima obtinguda per a la de Presens és més de dues vegades superior a la variació de fase màxima assolida per la d'Ocean Optics i que a més a més es troba a una freqüència de mesura més baixa (tot i que la petita variació de freqüències obtinguda no es tradueix en un sistema de mesura gaire més senzill), amb el sistema de mesures de fase per desmodulació coherent, s'obté que l'únic fluoròfor que dona uns resultats inicials similars, prèvia optimització de la fabricació, als resultats obtinguts a través de la membrana comercial corresponent és el $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$.

Tal i com passava anteriorment, tot i que el fluoròfor definitiu per a la seva optimització ja ha quedat prou definit, s'ha vist interessant complementar la figura anterior amb el tractament dels resultats obtinguts per l'obtenció dels perfils de la fase normalitzada al llarg del temps en el procés de desorció de l'oxigen, efectuats a les freqüències òptimes de mesura corresponents per a cada un dels fluoròfors. D'aquesta

manera, es podrà observar també la sensibilitat en la mesura per a cada un dels fluoròfors com també per a les membranes comercials. Els perfils resultants es troben representats a la figura 3.28

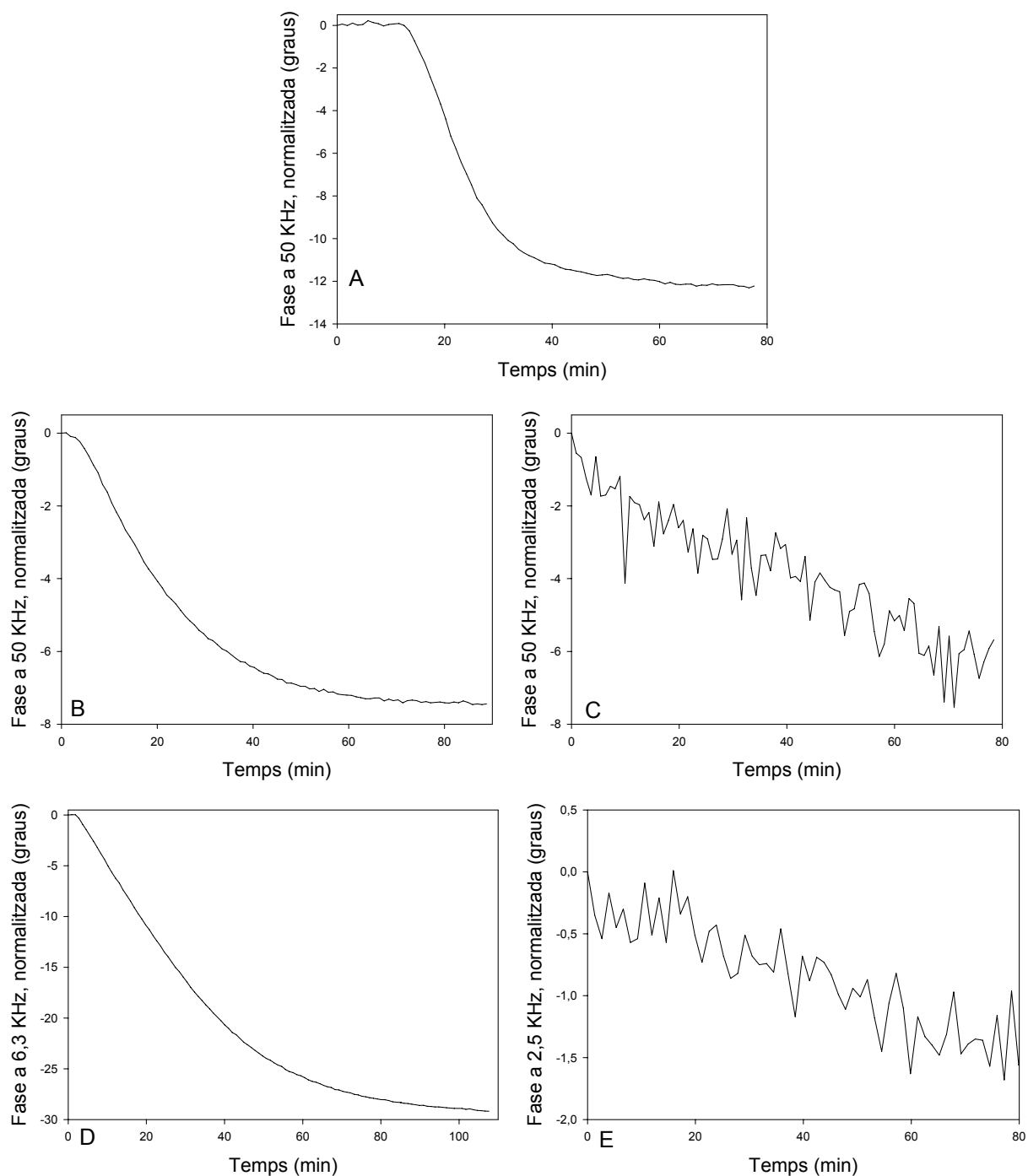


Figura 3.28 Evolució de la fase òptima de mesura (normalitzada respecte la mesura inicial a una concentració d'oxigen del 100%) al llarg d'un procés de desorció de l'oxigen dissolt en aigua ultrapura. Les membranes monitorades són la comercial d'Ocean Optics (A), la de $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ (B), la de $\text{Ru(p)}_3(\text{ClO}_4)_2$ (C), la comercial de Presens (D) i la de PdOEp (E).

Amb aquests perfils de desorció mesurats a la fase de màxima variació, queden confirmats els resultats anteriors a l'obtenir una bona sensibilitat en la mesura de la fase (i per tant de concentració d'oxigen

dissolt) tant per a les membranes comercials com per les de $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$, que tot i no arribar a la mateixa variació de fase que en la membrana comercial (8 graus respecte 12 graus de la comercial), les sensibilitats aconseguides són força similars.

S'ha de tenir en compte que tot i que la sensibilitat obtinguda és molt bona per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi, les membranes es troben adherides al port òptic mitjançant una cola òptica i que el sistema físic de detecció de la fase utilitzat per a la caracterització dels fluoròfors és complex (analitzador d'impedàncies HP4192A) i s'haurà de substituir per un circuit electrònic per a la mesura de la variació de fase un cop caracteritzat el film definitiu, on la resolució obtinguda pot ser menor que la obtinguda a través d'aquest sistema físic de mesura.

Per tant, per a poder obtenir una mesura estable amb el temps, amb prou sensibilitat, amb un temps de resposta adient per a la mesura d'OURs en cultius cel·lulars i sense efectes de toxicitat entre altres característiques necessàries, es necessitarà optimitzar la matriu d'immobilització del $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$, així com el sistema d'adhesió al port òptic del minibioreactor.

3.8.5 TIPUS DE MATRIUS I PROTOCOLS DE FABRICACIÓ

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, la matriu o polímer que conté el fluoròfor juntament amb el mètode de preparació de la membrana resultant tenen un efecte molt important en la forma com el fluoròfor reaccionarà a l'ona d'excitació i, per tant, en l'ona d'emissió.

Aquests possibles efectes queden reflectits en el diagrama d'Stern-Volmer (equació 3.1) tal i com es mostra a la figura 3.29, on s'han representat esquemàticament un conjunt de corbes del percentatge de disminució del temps de vida (o de la intensitat) en front la concentració d'oxigen per a diferents matrius amb el mateix fluoròfor immobilitzat.

D'aquesta manera, els efectes produïts per la variació de la matriu d'inclusió del fluoròfor poden afectar paràmetres molt importants per a la mesura i seguiment de la concentració d'oxigen dissolt com per exemple la sensibilitat de la mesura, que depèn del grau d'inhibició de la fluorescència degut a la concentració d'oxigen, el rang de mesura, que depèn de la concentració d'oxigen dissolt de saturació de la inhibició o bé el tram de linealitat de la mesura.

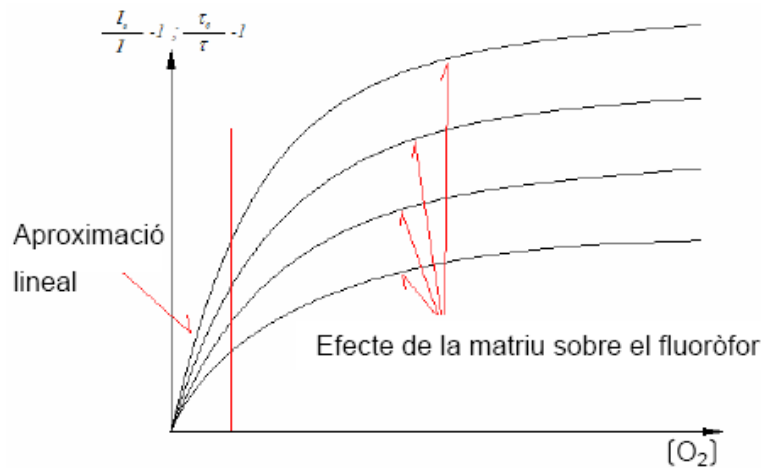


Figura 3.29 Possibles efectes de la matriu sobre la resposta a l'ona d'excitació d'un fluoròfor en funció de la concentració d'oxigen dissolt. Aquests efectes es reflecteixen tant en el tram lineal de la resposta com en el percentatge màxim d'inhibició.

A més, la matriu també afecta a altres paràmetres no relacionats amb el fluoròfor com el temps de resposta del sistema, que depèn de la difusió de l'oxigen a través de la matriu. Per tant, s'haurà de buscar una matriu (juntament amb un protocol) que permeti obtenir unes propietats adequades per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en cultius de cèl·lules animals adherents.

Bibliogràficament, aquest compost de ruteni s'ha immobilitzat en molts tipus de matrius usades per a aplicacions en el seguiment de la concentració d'oxigen dissolt, com per exemple en silicones (Klimant i Wolfbeis·1995; Li i col·1993), en silica-gel (Choi i Xiao·2000), en polímers (Miyashita i col·1999; Preininger i col·1994) i sol-gels (Ingersoll i Bright·1997; Shahriari i col·1994).

De tots els tipus de matrius possibles se n'han escollit tres candidats: la silicona Elastosil E43 per la simplicitat de fabricació de les membranes de silicona i concretament aquesta degut a la seva compatibilitat biològica, el poli(clorur de vinil) (o PVC) per ser la matriu amb que s'han obtingut millors resultats bibliogràfics i l'etil cel·lulosa (o EC) per la versatilitat del seu ús en diferents fluoròfors.

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, no només la tria de la matriu és importat per a l'optimització de la membrana sensible a la concentració d'oxigen dissolt, sinó que també s'ha d'escollir un protocol de fabricació i adhesió adequat segons les característiques de les matrius a fabricar i els corresponents protocols de solubilització (protocols exposats a l'apartat 8.7.4 de Materials i Mètodes). Així doncs, les diferents possibilitats de fabricació de les membranes i d'adhesió d'aquestes al port òptic dels minibioreactors es poden observar a la figura 3.30.

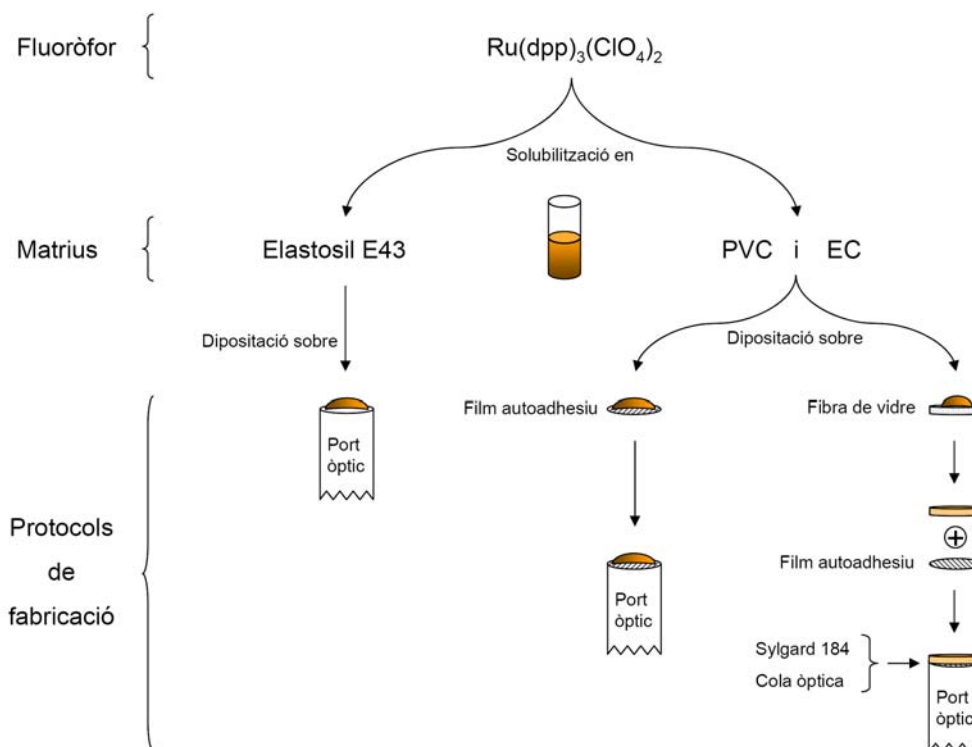


Figura 3.30 Esquema dels diferents protocols possibles de fabricació de les membranes de $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ i d'adhesió al port òptic dels minibioreactors, segons les diverses matrius escollides; la silicona (Elastosil E43), el poli(clorur de vinil) (PVC) i l'Etil cel·lulosa (EC).

Per una banda, els dissolvents utilitzats per a la solubilització de la silicona Elastosil E43 no són suficientment forts per a la reacció amb el propi material del port òptic i, per tant, les membranes de silicona es poden fabricar directament, dipositant directament la solució de silicona amb el fluoròfor sobre el port òptic del minibioreactor.

Per altra banda, per a les membranes de PVC i d'EC s'utilitzen dissolvents més forts que reaccionen amb el propi material del port òptic del minibioreactor i, per tant, s'han de tenir en compte protocols de fabricació i d'adhesió diferents a la silicona. Pel que fa als protocols de fabricació tant per l'EC com pel PVC, tal i com es pot observar a la figura 3.30, la solució del fluoròfor i el polímer es pot aplicar a sobre la cara no adhesiva d'un film acrílic autoadhesiu per a que actuï com a base de la matriu corresponent, o bé es pot aplicar a sobre un filtre de fibres de vidre de manera que aquest filtre mateix actuï com a suport, juntament amb la matriu corresponent.

Pel que fa a l'adhesió de les matrius al port òptic, en el cas de utilitzar el film acrílic autoadhesiu com a base de la matriu, aquest mateix també serà l'encarregat de l'adhesió al port òptic mitjançant la seva part adhesiva, mentre que en cas de usar fibres de vidre, es pot utilitzar el mateix film acrílic per a l'adhesió de

la membrana a la cara adhesiva del film i utilitzar una silicona biocompatible i que no reaccioni amb el material del port òptic (silicona Sylgard 184) per unir la cara no adhesiva del film acrílic amb el port òptic del minibioreactor. En aquest cas, cal evitar el contacte entre el polímer amb el fluoròfor immobilitzat i els dissolvents de la silicona, ja que aquests afectarien negativament al grau de resposta de la matriu obtinguda i al seu temps de resposta.

Finalment, com a controls de funcionalitat s'utilitzaran membranes comercials d'Ocean Optics, que s'adheriran al port òptic dels minibioreactors de la mateixa manera que les membranes de fibra de vidre, mentre que com a controls d'adhesió, s'utilitzarà la cola òptica utilitzada anteriorment tot i que aquesta no sigui una alternativa vàlida a causa de la seva toxicitat en cultius cel·lulars.

Un cop detallades totes les possibilitats de fabricació i d'adhesió de les membranes de $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$ per a les diferents matrius, ja es pot procedir a la comparació de les corresponents funcionalitats a l'hora de mesurar variacions en la concentració d'oxigen dissolt. Així doncs, el paràmetre de comparació entre els diferents protocols i matrius d'immobilització del fluoròfor que es tindrà en compte serà la variació de la fase a 50 KHz (valor corresponent a la freqüència de màxima variació de fase per a les membranes de $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$) entre les concentracions de 0 i 100% d'oxigen. En aquest experiment però, a diferència dels experiments realitzats anteriorment, es realitzaran les mesures en fase gasosa, passant d'una atmosfera d'aire fins a una atmosfera de nitrogen a partir d'un cabal de nitrogen gas constant de 0,7 l/min.

D'aquesta manera es podrà obtenir el valor del grau màxim d'inhibició per a cada fluoròfor amb més exactitud, en el mateix rang de concentració d'oxigen i en menor temps que si es realitzés en medi líquid, ja que la concentració màxima d'oxigen en fase gasosa (100%), tot i ser superior a la concentració màxima d'oxigen dissolt, no depèn de cap paràmetre variable com per exemple l'agitació o el volum de medi, mentre que la concentració mínima d'oxigen (0%) és més fàcil i ràpid d'assegurar en un medi gasós que en un medi líquid.

Els resultats es presenten a la figura 3.31, on s'inclou la variació de fase assolida amb la corresponent desviació estàndard per a un número determinat de membranes fabricades amb les diferents matrius i protocols escollits. Per una banda, es pot observar que la membrana d'Ocean Optics és la que dona una major variació de fase, sigui quin sigui el protocol d'adhesió i aconseguint a més a més, amb el canvi de la cola òptica pel film autoadhesiu enganxat al port mitjançant la silicona, un augment en la variació de la fase en aproximadament un 15%.

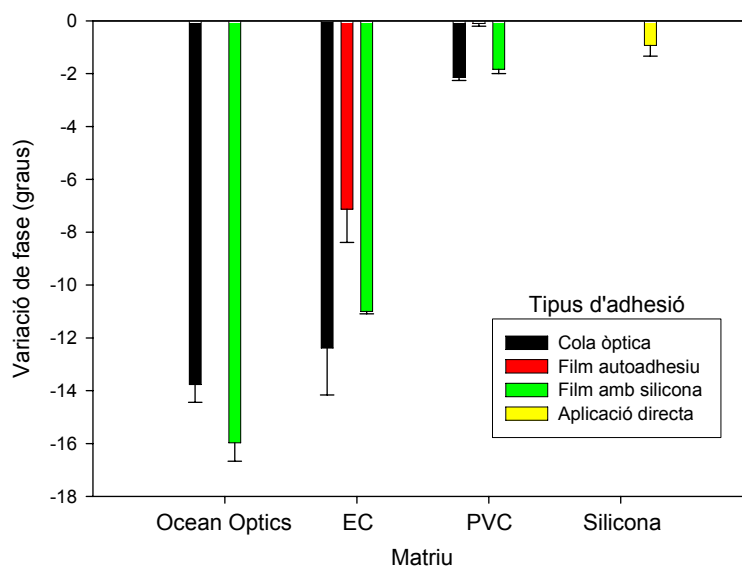


Figura 3.31 Comparació de la màxima variació de fase assolida en fase gas (entre el 100% i el 0% d'oxigen) per a les diferents membranes fabricades, classificades segons la matriu i el protocol utilitzats.

Per altra banda, amb les membranes no comercials, es pot observar com el tipus de matriu utilitzada té molta més influència en la variació màxima de fase que el protocol d'adhesió de la membrana al port òptic, de manera que la matriu que dona uns millors resultats és la d'Etil cel·lulosa (EC) amb una variació superior als 10 graus en 2 dels tres tipus de protocols d'enganxament realitzats, mentre que les membranes de PVC donen unes variacions màximes de fase molt petites, amb un màxim de variació en 2 graus de variació i finalment les membranes de silicona mostren que pràcticament no hi ha variació de la fase i molt poca repetibilitat.

A part dels resultats obtinguts, cal tenir en compte també els costos de fabricació de les membranes (taula 3.2). Mentre que el cost de la membrana comercial d'Ocean Optics és de 1€ per unitat, el cost de fabricació de les altres membranes no comercials a partir del compost de ruteni, és aproximadament de 0,5€, cost que disminuiria considerablement quan aquesta fabricació es trobi industrialitzada.

Si entrem més en detall en els resultats obtinguts per a la millor de les matrius d'immobilització pel fluoròfor de ruteni, la matriu d'EC, el primer que es pot observar és que la fabricació del polímer amb el fluoròfor directament a la superfície del film autoadhesiu comporta una baixada dràstica de la variació màxima de fase i, per tant, es pot descartar l'alternativa.

Un altre resultat que es pot observar és que en aquest cas el canvi de la cola òptica pel conjunt del film autoadhesiu i la silicona sylgard per a l'adhesió de la matriu ha resultat en una disminució

d'aproximadament un 10% de la senyal. Tot i això, s'obté una variació bastant gran de la fase per permetre una mesura correcta de la concentració d'oxigen dissolt en el medi.

3.8.6 ESTABILITAT DE LA MEMBRANA D'ETIL CEL·LULOSA EN FIBRA DE VIDRE AMB ADHESIÓ MITJANÇANT FILM AUTOADHESIU I SYLGARD

Un cop s'ha escollit la matriu d'immobilització del fluoròfor de ruteni amb una variació de fase adequada per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi, cal efectuar la comprovació que es compleixen la resta de necessitats i, entre elles l'estabilitat de la mesura de la concentració d'oxigen dissolt al llarg d'un cultiu. La determinació de l'estabilitat de la mesura es realitzarà també amb una membrana comercial d'Ocean Optics adherida mitjançant el film autoadhesiu i la silicona sylgard per a poder comparar els resultats obtinguts amb la membrana fabricada.

Per a realitzar aquesta comprovació, s'efectua el seguiment del valor de la fase a 50 KHz, que es troba proporcionalment relacionada amb el temps de vida de l'ona emesa i de la concentració d'oxigen dissolt en el medi, al llarg d'una setmana en un minibioreactor amb la membrana fluorescent adherida al port òptic i omplert amb 13 ml d'aigua ultrapura. Per a obtenir un seguiment més complert de l'estabilitat de la mesura, s'ha anat canviant regularment l'atmosfera del capçal del minibioreactor entre aire i nitrogen (per aconseguir el 100% i 0% respectivament d'oxigen dissolt) a través d'un cabal constant del gas corresponent de 0,3 l/min.

Per contrastar els resultats obtinguts mitjançant el sistema de mesura de la fase per desmodulació coherent, s'ha addicionat una sonda polarogràfica comercial per a realitzar una segona mesura de la concentració d'oxigen dissolt en l'aigua per a poder comparar aquest perfil de la concentració d'oxigen amb el perfil de fase obtingut amb el sistema de mesura òptic. S'ha escollit una sonda comercial en comptes de les sondes polarogràfiques miniaturitzades per a la comparació ja que té una robustesa i estabilitat superiors.

A la figura 3.32, es poden observar els perfils de fase a 50 KHz assolits amb el sistema òptic de mesura i les corresponents comparacions amb els perfils d'oxigen dissolt mesurades amb una sonda polarogràfica comercial. En el cas de la membrana comercial d'Ocean Optics adherida amb el film autoadhesiu i la silicona sylgard (gràfica superior esquerra), es pot observar una pèrdua de fase progressiva, molt forta al primer dia i més lleugera durant els següents 3-4 dies, moment a partir del qual la mesura es manté estable amb una variació de fase de uns 8 graus pels salts de la concentració d'oxigen dissolt entre 0 i 100%. Al finalitzar les mesures s'ha observat un esblanqueïment del film autoadhesiu, que podria ésser el

causant d'aquesta pèrdua de fase juntament amb un possible envelliment del fluoròfor degut a la incidència constant de la llum d'excitació al llarg dels 8 dies.

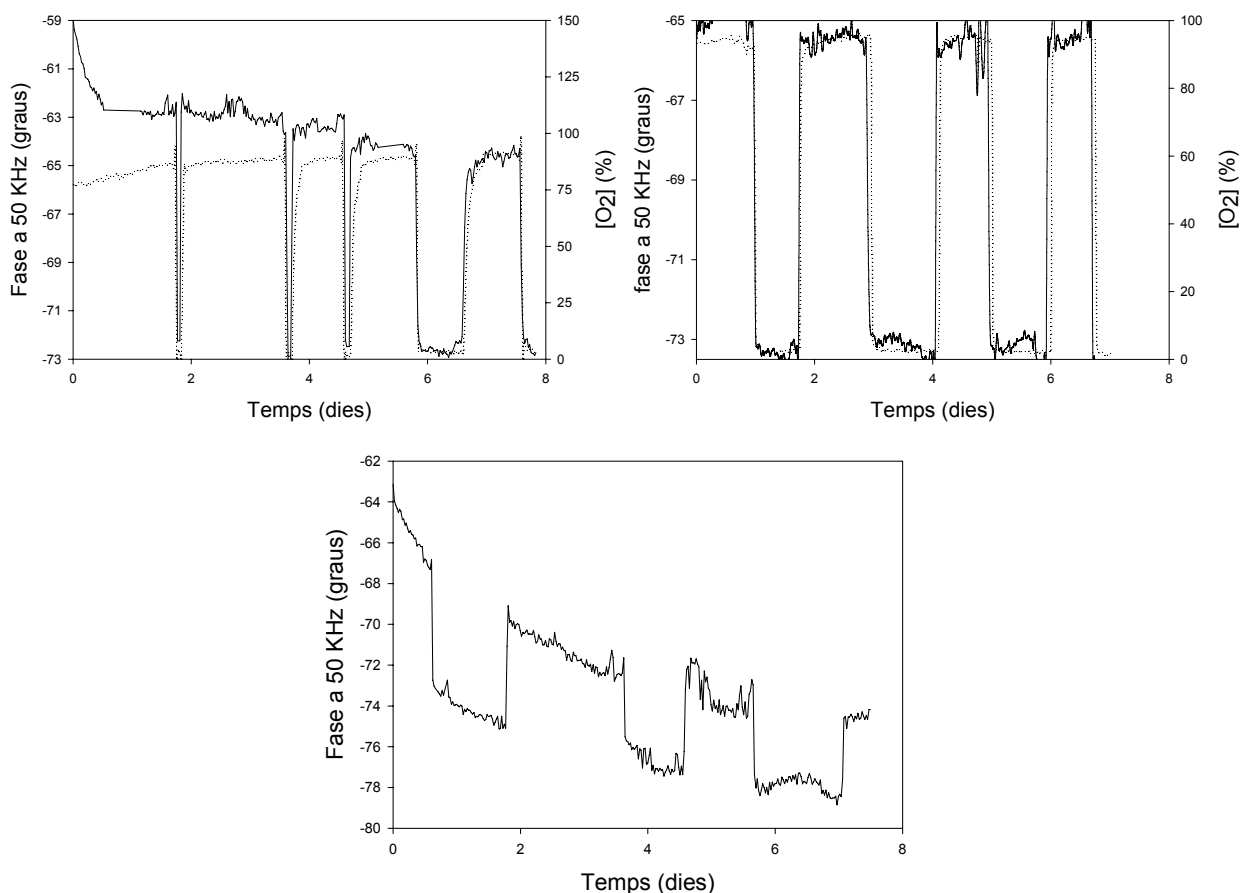


Figura 3.32 Seguiment de l'estabilitat de la mesura òptica d'oxigen (fase a 50 KHz, —) en aigua ultrapura, de les membranes d'Ocean Optics (superior esquerra), d'Ocean Optics un cop estabilitzada la senyal durant 5 dies (superior dreta) i d'EC en fibra de vidre (inferior). Comparació amb els perfils de concentració d'oxigen dissolt obtinguts a partir de sondes polarogràfiques comercials (···), perfil omès pel seguiment de la membrana d'EC.

El fet que aquesta pèrdua de fase es doni per a concentracions de 100% d'oxigen dissolt, i en canvi el valor de fase a la que s'arriba cada cop que es baixa a la concentració de 0% d'oxigen dissolt es manté aproximadament constant, indica que predomina el fet de l'emblanquiment del film autoadhesiu, tal i com es pot comprovar si es realitza el seguiment de la membrana un cop aquesta ja es troba esblanqueïda (5 dies en aigua ultrapura, gràfica superior dreta) i en la que no es veu cap pèrdua de fase significativa. Si es comparen els dos perfils de fase i concentració d'oxigen dissolt, es pot observar com hi ha una bona correlació entre les dues i una bona estabilitat per a la mesura òptica d'oxigen, encara que aquesta conté un soroll bastant elevat en la mesura.

Per altra banda, si ens fixem en el perfil de fase a 50 KHz obtingut per a la membrana d'EC en fibra de vidre adherida amb el film autoadhesiu i la silicona sylgard (gràfica inferior), es pot observar que hi ha una pèrdua de fase important al llarg dels 8 dies de cultiu, no només per a la concentració de saturació de l'oxigen dissolt, sinó que també hi ha una davallada de la fase per a la mesura corresponent a la concentració nul·la d'oxigen, obtenint una variació de fase deguda a la concentració d'oxigen de uns 4 graus.

S'ha considerat oportú ometre el perfil de la concentració d'oxigen dissolt mitjançant la sonda polarogràfica comercial al no aportar informació rellevant extra, ja que en cap moment s'arriba a estabilitzar la mesura al llarg dels 8 dies i, la variació de fase deguda a la concentració d'oxigen dissolt obtinguda en aquest moment ja és inadequada pel seguiment òptic de l'oxigen dissolt. Per la mateixa raó no s'ha realitzat cap altre seguiment a partir d'un temps més avançat en la mesura, tal i com s'havia efectuat amb la membrana d'Ocean Optics. L'observació final de la membrana monitorada presentava un esblanqueïment del film autoadhesiu, a més a més d'una marca descolorida a la zona d'incidència de la llum d'excitació, indicant que aquesta disminució de la fase és deguda a l'augment de la turbidimetria de la llum al pas de la part esblanqueïda del film i a l'envelliment de la membrana d'EC.

Tot i que per a la membrana comercial, descartada per motius econòmics, s'arriba a un estat d'estabilitat de la mesura encara que s'obtingui una pèrdua de la variació de fase d'un 50% i, per tant, es podria utilitzar aquesta membrana amb un rentat previ de 5 dies de durada en contacte amb aigua, per a la membrana d'EC en fibra de vidre i adherida amb el film autoadhesiu i la silicona sylgard no s'arriba a cap etapa d'estabilitat abans que disminució de la variació de fase deguda a la concentració d'oxigen dissolt la inhabiliti per a la mesura de l'oxigen dissolt.

Per tant, tot i obtenir inicialment una variació de fase adequada per a la membrana d'EC, el protocol escollit d'adhesió de la membrana al port òptic del minibioreactor impossibilita el seguiment de la concentració d'oxigen dissolt al llarg d'un cultiu cel·lular. Això fa que es necessiti un ventall nou de protocols per a l'adhesió de membranes al port òptic.

3.8.7 ADHESIÓ DE LES MEMBRANES MITJANÇANT SILICONES

Les alternatives de fabricació de la membrana directament sobre el film autoadhesiu o bé enganxar la membrana fabricada sobre el filtre de fibra de vidre amb el film autoadhesiu com a mesures per evitar el contacte directe entre el dissolvent de les silicones amb la membrana, per que aquests reaccionarien dissolent la membrana i barrejant el fluoròfor amb la silicona canviant-ne les propietats i fent que la variació

de fase es minimitzi (inferior a -5 graus de variació) mentre que el temps de resposta de la membrana augmenta considerablement (temps de resposta de minuts en comptes de segons en fase gas), no han prosperat al no disposar d'unes propietats adequades per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt.

Per tant, es necessiten nous protocols d'adhesió directa mitjançant silicones de les membranes al port òptic del minibioreactor, però minimitzant aquests efectes negatius. Les silicones escollides per a l'adhesió de la membrana són les silicones E43 i sylgard, ja que ambdues presenten propietats biocompatibles descrites pels fabricants, mentre que el protocol d'adhesió per minimitzar els efectes dels dissolvents (apartat 8.7.5 de Materials i Mètodes) es basen en aplicar un temps d'espera suficient entre l'aplicació de la silicona al port òptic del minibioreactor i la col·locació de la membrana a la silicona, per tal d'evaporar la majoria del dissolvent sense perdre les propietats adhesives abans del contacte amb la membrana. Aquests temps d'espera són de uns 30 minuts aproximadament, tant per a la silicona E43 com per a la silicona sylgard.

Tot i que durant la tria de la matriu efectuada anteriorment s'havien descartat les membranes de PVC al no donar una variació de fase suficient per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt, s'ha de tenir en compte que l'aplicació de nous protocols d'adhesió pot comportar diferents efectes segons el tipus de matriu i, per tant, els nous protocols d'adhesió de la membrana es testaran també per a la membrana de PVC. Per a poder tenir una comparació més completa dels resultats obtinguts, també es realitzaran les mesures pels diferents protocols per a la membrana comercial d'Ocean Optics per a tenir una referència, així com mesures de les diferents membranes amb el protocol d'adhesió mitjançant el film autoadhesiu amb silicona sylgard per a poder observar la millora d'estabilitat pels nous protocols d'adhesió.

Tal i com s'ha comprovat anteriorment, l'estabilitat de la membrana és molt important per a poder aconseguir una bona mesura òptica de la concentració d'oxigen dissolt, de manera que la comparació dels nous protocols d'adhesió es realitzarà directament a partir de la mesura d'estabilitat en aigua ultrapura al llarg del temps. Tenint en compte que les membranes poden veure's afectades per un efecte d'envelliment i que les membranes no es veuran constantment irradiades durant el seguiment d'un cultiu cel·lular, la mesura de l'estabilitat es realitzarà mitjançant mesures puntuals diàries en fase gas, de manera que un cop les membranes es troben assecades de les restes de l'aigua ultrapura, es mesura la variació de la fase a 50 KHz assolida per el sistema en qüestió en fase gasosa des d'una atmosfera d'aire fins a una atmosfera de nitrogen, mantingudes a l'interior del minibioreactor per un cabal de gas constant de 0,7 l/min.

Els resultats obtinguts per a les diferents membranes i protocols d'adhesió es troben representats a la figura 3.33, on s'han graficat, per a les membranes d'Ocean Optics (superior esquerra, ●), d'EC (superior dreta, ▲) i de PVC (inferior, ■), els diferents perfils d'estabilitat assolits amb les diferents silicones a més del perfil assolit mitjançant la utilització del film autoadhesiu, mantenint la mateixa escala per a poder comparar més fàcilment els resultats entre les diferents membranes.

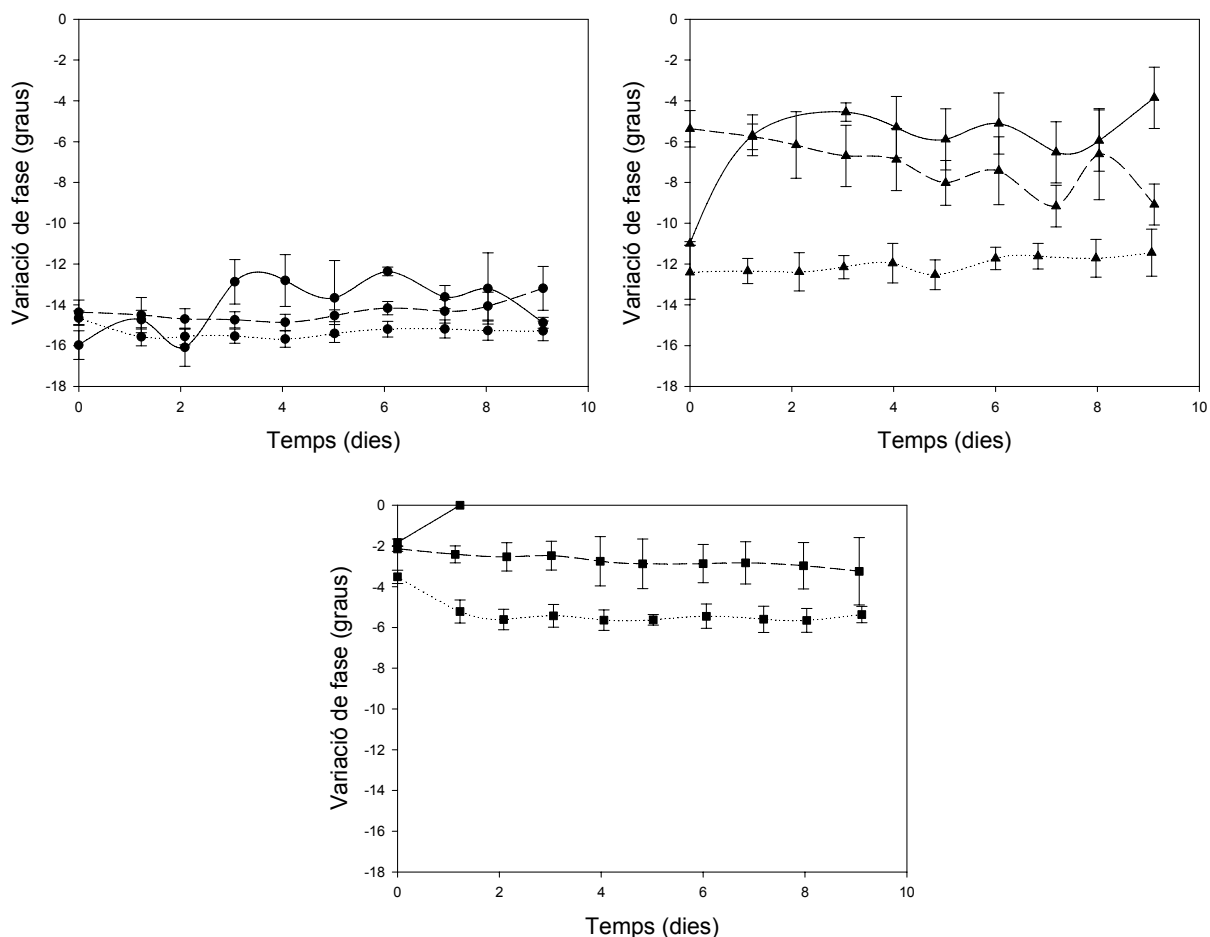


Figura 3.33 Determinació de l'estabilitat de la mesura de fase en aigua ultrapura per a les membranes d'Ocean Optics (superior esquerra, ●), d'EC (superior dreta, ▲) i de PVC (inferior, ■). Comparació dels perfils de variació de fase a 50 KHz entre presència (aire) i absència d'oxigen (N_2) en fase gas al llarg del temps, per a les diferents membranes amb l'adhesió al port òptic del minibioreactor mitjançant el film autoadhesiu (—), la silicona E43 (---) i la silicona sylgard (···).

Si comparem els resultats de les diferents membranes, sense tenir en compte els diferents protocols d'adhesió utilitzats, es pot observar que la diferència entre les diferents membranes es continua produint, amb les variacions de fase més elevades per a la membrana comercial, amb uns valors lleugerament inferiors per a la membrana d'EC, i amb unes variacions molt baixes per a les membranes de PVC.

Per altra banda, si ens fixem amb els diferents protocols d'adhesió de les membranes, es pot observar que la utilització de silicones directament com a interfase entre la membrana i el port òptic del minibioreactor,

en general, atorga a la mesura una estabilitat bastant elevada tant per a la silicona E43 com per a la sylgard, millorant sobradament amb aquests nous protocols l'estabilitat obtinguda amb el film autoadhesiu.

Si es comparen les dues silicones entre elles, es pot observar que per a la membrana comercial d'Ocean Optics, ambdues silicones obtenen una bona estabilitat de la mesura. Tot i això, la silicona sylgard triga 24 hores en estabilitzar-se, obtenint però millors resultats finals, ja que el valor de variació de fase a la que s'estabilitza la mesura és lleugerament superior al valor obtingut per a la silicona E43. Si es comparen els resultats obtinguts mitjançant les membranes fabricades, es pot observar que per a les membranes de PVC, tot i no arribar a una variació de fase suficient amb cap dels diferents protocols efectuats pel seguiment de la concentració d'oxigen dissolt en un cultiu cel·lular, es manté el mateix patró en la estabilitat que per a les membranes comercials, però obtenint una disminució del 50% en la variació de fase per a la silicona E43.

En canvi, per a la membrana d'EC, s'obté tant una bona estabilitat des de l'inici de les mesures amb la silicona sylgard com una variació de fase adequada encara que es pot observar una lleugera disminució del senyal al llarg del temps, mentre que per a la silicona E43 parteix d'una variació de fase bastant reduïda i, tot i que aquesta va augmentant al llarg del temps, la mesura es va inestabilitzant cada cop més obtenint unes variacions elevades per a les repeticions mesurades. Aquests fets indiquen una reacció major del dissolvent amb la membrana pel protocol d'adhesió amb la silicona E43.

Amb els resultats obtinguts, la membrana de PVC queda totalment descartada sigui quin sigui el protocol d'adhesió utilitzat, mentre que per a la membrana d'EC es pot descartar la membrana enganxada mitjançant la silicona E43 ja que no dona ni prou variació de fase, ni s'estabilitza al llarg del temps de cultiu.

Per altra banda, la membrana d'EC amb el protocol d'adhesió mitjançant la silicona sylgard té una variació de fase suficient per a una mesura correcta de la concentració d'oxigen dissolt, a més a més de disposar d'una bona estabilitat, ja que tot i que es pot observar una lleugera disminució de la variació de fase al llarg del temps, aquesta disminució representa menys d'un 1% diari de la mesura (8% en 9 dies), essent doncs una bona candidata per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi sempre i quan compleixi amb la resta de propietats necessàries, com són el temps de resposta, el rang de mesura i la manca de toxicitat de la membrana.

3.8.8 CÀLCUL DEL RANG DE CONCENTRACIONS D'OXIGEN DISSOLT

Un cop es disposa d'una membrana adequada per a la mesura de la concentració de l'oxigen dissolt en cultius de cèl·lules animals, amb una variació de fase suficient per a obtenir una mesura estable i fiable i, amb un temps de resposta adequat per a la realització de l'OUR pel seguiment de l'activitat en un cultiu de cèl·lules animals adherents, ja es pot procedir a la realització del calibrat de la mesura de la fase (que depèn del temps de vida de l'ona emesa) respecte la concentració real d'oxigen dissolt. D'aquesta manera, es podrà determinar quin és el rang de mesura d'oxigen dissolt per a la membrana desenvolupada així com si la mesura es troba a dins el rang de linealitat en el diagrama de Stern-Volmer, fet que permetria realitzar el calibrat de la sonda d'oxigen amb una simple mesura de la fase a la concentració de saturació de l'oxigen dissolt al inici d'un cultiu, o bé es troba en la fase no lineal de del diagrama de Stern-Volmer, fet que obligaria a la realització d'un mínim de dues mesures de la concentració d'oxigen dissolt (a la concentració de saturació i a la concentració de 0% d'oxigen dissolt).

Per a la realització d'aquest calibrat, s'ha efectuat el monitoratge d'un procés de desorció de l'oxigen en un minibioreactor, mitjançant el seguiment de la variació de fase obtinguda (respecte la mesura inicial a una concentració d'oxigen dissolt del 100%) a partir de la sonda òptica i la membrana desenvolupada al llarg del capítol, i s'ha comparat amb el seguiment realitzat en el propi minibioreactor de la concentració d'oxigen dissolt mitjançant les sondes polarogràfiques miniaturitzades descrites anteriorment en l'apartat 3.3.2. Els resultats es poden observar a continuació a la figura 3.34.

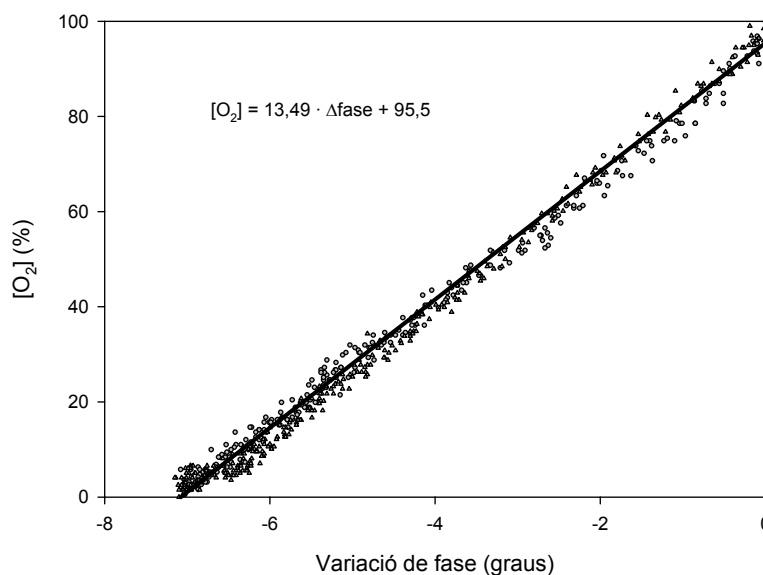


Figura 3.34 Calibrat, per a la membrana d'EC desenvolupada al llarg del capítol, de la concentració d'oxigen dissolt en un minibioreactor en funció de la variació de fase respecte la mesura de fase a una concentració de saturació d'oxigen dissolt. S'han sobreposat les mesures obtingudes per a dues membranes fabricades amb el mateix protocol.

Un altre fet que es pot observar amb el calibrat realitzat, és que en aquest experiment, la variació de fase total obtinguda al passar d'una concentració de 100% d'oxigen dissolt a 0% només és d'uns -7 graus (respecte els -9,5 graus obtinguts anteriorment). Aquesta variació respecte els experiments anteriors és deguda que fins ara només s'havia mesurat la variació total de fase en fase gasosa per, d'aquesta manera, obtenir resultats amb més rapidesa, mentre que en aquest cas ja es realitzen les mesures en fase líquida i, per tant, la concentració real quan es realitza el calibrat del 100% d'oxigen a l'inici de l'experiment és menor que en les mesures en fase gasosa (relacionats mitjançant la llei de Henry) fent que el recorregut del 100% al 0% d'oxigen dissolt sigui menor.

Així doncs, ja es disposa d'una membrana encapsulant un fluoròfor de ruteni amb la que la sonda òptica de mesura de la variació de fase és capaç d'efectuar mesures de concentració d'oxigen dissolt en un cultiu cel·lular amb una precisió i fiabilitat bones mitjançant un únic calibrat de la concentració de saturació d'oxigen dissolt previ a la realització del seguiment del cultiu cel·lular.

3.8.9 DETERMINACIÓ DE LA TOXICITAT DE LA MEMBRANA D'ETIL CEL·LULOSA ADHERIDA MITJANÇANT LA SILICONA SYLGARD

Un cop es disposa d'una membrana amb les propietats optimitzades per a una mesura fiable de la concentració d'oxigen dissolt, s'ha de comprovar que aquesta no provoqui cap efecte tòxic en un cultiu cel·lular, i així determinar si es pot utilitzar directament la membrana amb el protocol d'adhesió desenvolupat, o bé es fa necessària l'aplicació i optimització d'una capa externa d'un material biocompatible i permeable a gasos.

Per a la determinació d'una possible toxicitat en cultius de cèl·lules animals deguda a la presència de la membrana amb el fluoròfor de ruteni es realitzarà, tal i com ja s'ha efectuat anteriorment per a la determinació de la toxicitat del fluoròfor en solució a l'apartat 3.8.2, la mesura de la concentració cel·lular al final d'un cultiu de cèl·lules animals de 72 hores de durada en un minibioreactor al que se l'hi ha adherit al port òptic una de les membranes desenvolupades al llarg del capítol i s'ha comparat amb la mesura de la concentració cel·lular al final d'un cultiu de cèl·lules animals de 72 hores de durada en un minibioreactor sense la presència de la membrana per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt.

La línia cel·lular utilitzada per a la determinació de la toxicitat és la línia de les cèl·lules vero i el cultiu s'ha efectuat a condicions estàndards. Al cap de 72 hores de cultiu, aquest s'atura i es procedeix al recompte cel·lular dels cultius amb presència i absència de la membrana del fluoròfor de ruteni. Els resultats es poden observar a continuació, a la taula 3.3.

Taula 3.3 Comparació de les concentracions al final dels cultius de cèl·lules *vero* amb i sense presència de les membranes desenvolupades al llarg del capítol per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt. S'ha afegit els valors de la desviació estàndard obtinguts en els cultius (n=4), amb el corresponent % d'error entre parèntesis.

Cultiu	Concentració final (cèl·l./cm ²)	Desviació estàndard (cèl·l./cm ²)
sense membrana	3,8E+05	0,08E+05 (2%)
amb membrana	3,9E+05	0,16E+05 (4%)

Tal i com es pot observar, no existeixen diferències significatives en la concentració cel·lular al final de les 72 hores de cultiu entre els cultius efectuats en minibioreactors en presència de la membrana per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt i els cultius efectuats en minibioreactors sense la presència de la membrana de mesura. Aquest fet, indica que la membrana desenvolupada al llarg del capítol no presenta activitat tòxica pels cultius de cèl·lules animals i, per tant, que ja pot ser utilitzada directament sense cap espècie de recobriment pel seguiment de cultius cel·lulars.

3.9 SEGUIMENT DE L'ACTIVITAT EN CULTIUS DE CÈL·LULES ANIMALS

Així doncs, per tal de comprovar-ne l'estabilitat al llarg de cultius de cèl·lules animals, s'ha procedit al monitoratge de la concentració d'oxigen dissolt amb les corresponents mesures de les OURs en dos cultius de cèl·lules animals diferents.

El primer dels cultius monitorats és un cultiu de cèl·lules animals que creixen en suspensió, els híbridomes. El cultiu s'ha efectuat a condicions estàndards amb un inòcul inicial de $2 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml (concentració estàndard per a cultius d'híbridomes) i s'ha dut a terme a l'interior d'un minibioreactor en el que s'ha monitorat la concentració d'oxigen dissolt mitjançant la sonda òptica i la membrana d'EC desenvolupada anteriorment adherida al port òptic corresponent, tot realitzant mesures d'OUR cada aproximadament 12 hores de cultiu.

A més del monitoratge de la concentració d'oxigen dissolt i, aprofitant que es poden utilitzar sistemes ja desenvolupats anteriorment pel seguiment de la concentració cel·lular en línia com per exemple el seguiment de la densitat òptica o absorbància, tal i com ja s'ha comentat anteriorment a l'apartat 1.2.1.1, s'ha realitzat també el seguiment de l'absorbància del mateix cultiu a partir d'una segona sonda òptica per a poder obtenir una mesura de la concentració cel·lular present en el minibioreactor monitorat que ens serveixi com a contra-mesura de la mesura d'activitat cel·lular a partir del monitoratge de la OUR. Els

resultats obtinguts es poden observar a continuació a la figura 3.35, on s'han representat els perfils de la concentració d'oxigen dissolt, de la OUR i de la concentració cel·lular (mesurada a partir de l'absorbància) al llarg del cultiu.

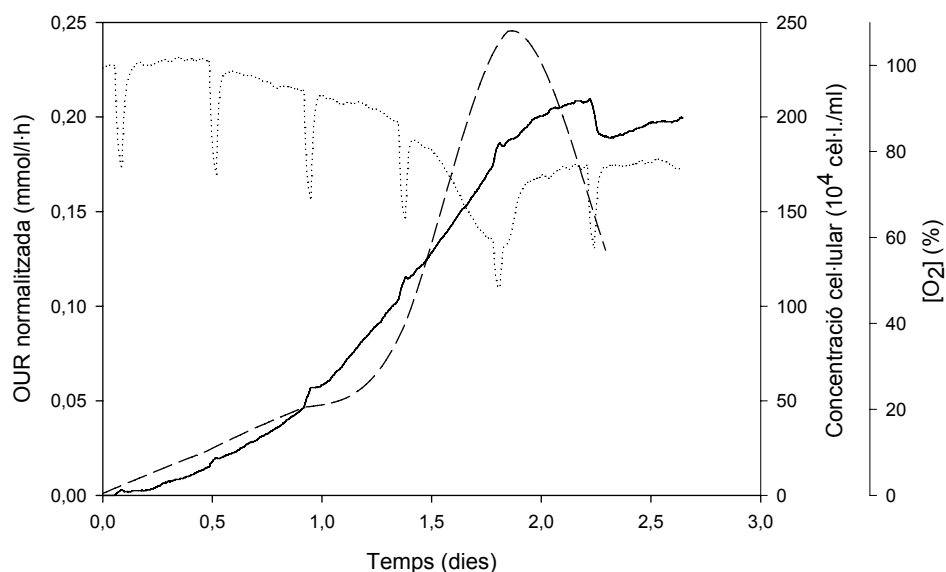


Figura 3.35 Perfils de l'activitat cel·lular normalitzada (a partir de mesures d'OURs, - -), de la concentració cel·lular (a partir de mesures d'absorbància, —) i de la concentració d'oxigen dissolt en el medi de cultiu (mitjançant la membrana desenvolupada, ···) en un cultiu de cèl·lules animals no adherents, els híbridomes.

Tal i com es pot observar amb els perfils obtinguts, el perfil de concentració d'oxigen dissolt obtingut al llarg del cultiu presenta unes molt bones estabilitat i robustesa (les baixades en la concentració d'oxigen correspon a les realitzacions de les OURs), començant a una concentració aproximada del 100%, la qual va disminuint a mesura que el cultiu avança i la concentració cel·lular augmenta (i, per tant també augmenta el consum d'oxigen) fins el moment en el que el cultiu comença a aturar-se, fent que la demanda d'oxigen dissolt disminueixi i, per tant, que la concentració d'oxigen dissolt augmenti significativament.

Amb el seguiment de la OUR obtingut, s'ha pogut monitorar correctament l'evolució del cultiu al llarg del temps, permetent l'estimació de la concentració cel·lular i, al ser una mesura de l'activitat cel·lular (relacionada amb la concentració de cèl·lules viables en el cultiu), ha permès predir amb certa antelació el moment en que el cultiu s'atura, tal i com es pot veure amb els perfils de l'OUR i la concentració cel·lular a partir de l'absorbància, on els valors d'OUR arriben al seu màxim aproximadament amb $\frac{1}{2}$ dia d'antelació al màxim en l'absorbància (mesura de concentració cel·lular relacionada amb la concentració de cèl·lules totals en el cultiu).

El segon dels cultius monitorats és un cultiu de cèl·lules animals adherents, les cèl·lules *vero*. El cultiu s'ha efectuat a condicions estàndards amb un inòcul de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² i, igual que en l'experiment anterior, s'ha dut a terme a l'interior d'un minibioreactor en el que s'ha monitorat la concentració d'oxigen dissolt mitjançant la sonda òptica i la membrana d'EC desenvolupada anteriorment adherida al port òptic corresponent, tot realitzant mesures d'OUR cada aproximadament 12 hores de cultiu.

En aquest cultiu, com a mesura de la concentració cel·lular al llarg del cultiu per a poder-la comparar amb la mesura de l'activitat cel·lular, s'ha procedit a la realització de recomptes de concentració cel·lular en cultius paral·lels efectuats en plaques de 6 pous cultivades a condicions estàndards. Els resultats obtinguts es poden observar a continuació a la figura 3.36, on s'han representat els perfils de la concentració d'oxigen dissolt, de la OUR i de l'absorbància al llarg del cultiu.

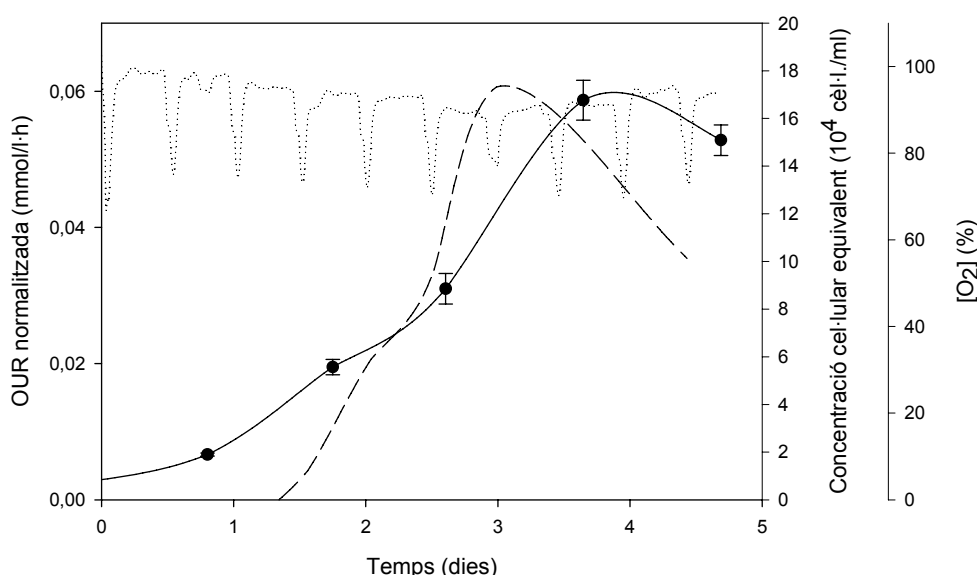


Figura 3.36 Perfils de l'activitat cel·lular normalitzada (a partir de mesures d'OURs, - · -), de la concentració cel·lular equivalent (cèl·lules totals entre volum de medi, —) i de la concentració d'oxigen dissolt en el medi de cultiu (mitjançant la membrana desenvolupada, ···) en un cultiu de cèl·lules animals adherents, les cèl·lules *vero*.

Tal i com passava amb el cultiu anterior, en aquest cultiu de cèl·lules animals adherents també es pot observar una bona sensibilitat i estabilitat de la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi de cultiu. En aquest perfil, també es pot observar una davallada a mesura que el cultiu avança i la concentració cel·lular augmenta, tot i que en aquest cas, al tractar-se de cèl·lules animals adherents, fa que aquesta disminució sigui bastant més petita (baixant fins a un mínim de la concentració d'oxigen dissolt d'aproximadament 90% respecte la baixada fins a un valor mínim del 60% en el cultiu anterior d'hibridomes). Aquest fet es dona al tractar-se d'una quantitat total de cèl·lules bastant inferior a la quantitat total de cèl·lules presents en cultius de cèl·lules animals que creixen en suspensió (passant

d'unes 200 a unes $17 \cdot 10^4$ cèl·lules/ml, unes 12 vegades més pel cultiu en suspensió), mentre que les velocitats específiques de consum d'oxigen són unes 3 vegades superiors per a les cèl·lules *vero* ($350 \text{ pmolO}_2/10^6 \text{ cèl·lules} \cdot \text{h}$, respecte els $117 \text{ pmolO}_2/10^6 \text{ cèl·lules} \cdot \text{h}$ obtingut pels híbridomes). Per tant, el consum d'oxigen obtingut en els cultius de cèl·lules animals en suspensió (híbridomes) és 4 vegades superior al consum obtingut en els cultius de cèl·lules animals adherents (*vero*), fent que la sensibilitat obtinguda per aquests cultius de cèl·lules animals adherents baixi significativament.

Aquest fet queda clar amb les mesures obtingudes amb el seguiment de la OUR, tot i que aquest ha permès altre cop avançar-se amb antelació al final del cultiu cel·lular, arribant al màxim en el perfil de les OURs aproximadament amb un dia d'antelació respecte la concentració cel·lular. Així aquest consum inferior en el cultiu de cèl·lules *vero* ha fet que no es pugui observar cap canvi en la mesura de la OUR fins pràcticament 1,5 dies de cultiu, indicant-ne una falta de sensibilitat de la mesura per a les concentracions cel·lulars baixes amb les que es sol treballar en cultius de cèl·lules animals adherents.

Tot i que a partir d'aquests 1,5 dies de cultiu es pot observar com els perfils de la OUR i de la concentració cel·lular segueixen uns camins similars (amb la ja esmentada antelació en la mesura de l'activitat cel·lular) i per tant, la sensibilitat de la mesura millora significativament, si es compara amb els perfils obtinguts pel cultiu d'híbridomes en la que s'obté una variació total en la mesura de la OUR de $0,25 \text{ mmols/l} \cdot \text{h}$ (respecte els $0,06 \text{ mmols/l} \cdot \text{h}$ en el cultiu de cèl·lules *vero*), es pot observar que aquest seguiment no és capaç d'aportar una informació molt quantitativa de la concentració cel·lular a la que es troba el cultiu.

Així doncs, tot i millorar la estabilitat i fiabilitat de la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en el medi de cultiu amb el desenvolupament de la mesura òptica, el fet de que en els cultius de cèl·lules animals adherents es treballi a unes concentracions de cèl·lules molt baixes, fa que aquesta mesura aportï una informació bàsicament qualitativa de l'estat fisiològic en el que es troben els cultius cel·lulars, però no dóna una informació molt quantitativa per a una estimació fiable de la concentració cel·lular al llarg de tot el cultiu.

3.10 LA MESURA DE L'ACTIVITAT CEL·LULAR

Amb la miniaturització de les sondes polarogràfiques per a la seva implementació en el sistema de cultiu per minibioreactors s'ha aconseguit efectuar mesures de la concentració d'oxigen dissolt en el medi de cultiu i ha permès realitzar seguiments de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals que creixen en

suspensió i en adherència. Tot i això, s'han observat i determinat diverses problemàtiques pel que fa a la sensibilitat i robustesa de la mesura de la concentració .

Per tal de solucionar aquestes problemàtiques s'ha procedit al desenvolupament d'una mesura de la concentració d'oxigen dissolt basada en la detecció, a partir de mètodes òptics, de la interferència dinàmica en la fluorescència emesa per un fluoròfor sensible a la concentració d'oxigen. Com a resultat d'aquest desenvolupament s'ha obtingut una membrana d'etil cel·lulosa i fibra de vidre que porta inclòs en el seu interior un fluoròfor de ruteni (el $\text{Ru(dpp)}_3(\text{ClO}_4)_2$) i que s'adhereix al port òptic dels minibioreactors i que permet efectuar el seguiment de la concentració d'oxigen dissolt al llarg d'un cultiu de cèl·lules animals, tant creixent en suspensió com en adherència amb una fiabilitat i estabilitat molt bones.

Amb aquest sistema de mesura de la concentració basat en mesures òptiques s'ha pogut obtenir unes mesures de les velocitats de consum d'oxigen (OURs) més fiables que en el sistema de mesura polarogràfic. Tot i això, quan s'ha utilitzat el sistema desenvolupat per a realitzar el seguiment de cultius cel·lulars animals per a cèl·lules adherents i no adherents, s'ha observat una falta de sensibilitat de la mesura de les OURs per a concentracions cel·lulars baixes que, tot i millorar a mesura que el cultiu avança i la concentració cel·lular augmenta, no donen una informació gaire quantitativa per a una estimació fiable de la concentració cel·lular.

Així doncs, tot i que la mesura de l'activitat cel·lular obtinguda és útil per a la determinació qualitativa de l'estat del cultiu cel·lular monitorat, caldrà dotar al sistema de cultiu en minibioreactors d'un sistema de mesura o estimació en línia de la concentració cel·lular suficientment robust i quantitatiu que permeti realitzar el monitoratge de cultius de cèl·lules animals adherents en tot el seu rang de concentracions de treball. Per tant, el següent pas a realitzar en aquest treball, es basarà en el desenvolupament d'una mesura en línia que ens permeti obtenir una informació totalment quantitativa de la concentració cel·lular present en cultius de cèl·lules animals adherents.

CAPÍTOL 4

MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR: ESPECTROSCÒPIA D'IMPEDÀNCIA

Fins ara s'ha vist la problemàtica del seguiment de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules adherents, on la poca concentració cel·lular que s'assoleix impedeix que hi hagi una sensibilitat adequada. A més a més, tot i l'evolució desenvolupada de les sondes polarogràfiques cap a sondes òptiques, no s'ha obtingut una millora significativa pel seguiment de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents. D'aquesta manera, la mesura de l'activitat cel·lular a partir del càlcul de la velocitat de consum d'oxigen en cultius de cèl·lules adherents, tot i que dóna informació qualitativa de l'estat de les cèl·lules, no aporta una informació amb la exactitud requerida de la concentració cel·lular que existeix en el cultiu. Queda clara doncs, la necessitat de construcció d'un sistema per el monitoratge en línia de la concentració cel·lular robust i quantitatiu. Per a dotar-lo al sistema, es desenvoluparà seguidament, amb la direcció del grup d'Espectroscòpia i Tomografia d'Impedància Elèctrica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC, un sistema de mesura de la concentració cel·lular basat en la espectroscòpia d'impedància en material biològic, és a dir, la bioimpedància.

4.1. INTRODUCCIÓ A LA BIOIMPEDÀNCIA

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el monitoratge de la bioimpedància elèctrica és un mètode de mesura emergent per a la recerca i la pràctica biomèdica basat en les propietats elèctriques passives dels teixits biològics. Aquestes propietats han estat l'objecte d'estudi des de que Luigi Galvani (1737 – 1789) va descobrir que podia moure els músculs d'una granota a l'aplicar estímuls elèctrics focalitzats en un nervi de la granota, mitjançant una màquina electrostàtica. No va ser fins a finals de segle XIX (McAdams i

Jossinet·1995, *review*) que aquestes propietats es varen començar a mesurar gràcies al desenvolupament d'una nova instrumentació i de l'exposició de la teoria del camp elèctric per James Clerk Maxwell (1831 – 1879). L'ús pràctic del monitoratge d'aquestes propietats elèctriques passives dels teixits biològics va començar a mitjans del segle XX, derivant cap a una ampla col·lecció de mètodes de mesura per diferents aplicacions (Grimnes i Martinsen·2000; Bourne *i col.*·1996 i Scharfetter H.·1999, *reviews*). Alguns exemples són:

- Mesures cel·lulars: recomptes cel·lulars en una solució, mesures d'hematòcrits a la sang en analitzadors comercials, monitoratge en bioreactors industrials (Bragós *i col.*·1999) i per a l'estudi de la resposta cel·lular a agents externs.
- Canvis de volum (Geddes·1996): pletismografies (volum de sang en les extremitats per detectar oclusions en les venes), cardiografies (volum de sang cardíaca) i pneumografia (volums d'aire pulmonar).
- Composició corporal: composició de fluids (determinació del total de l'aigua corporal entre altres) i percentatge de greix (càlcul de l'índex de grassa corporal).
- Classificació tissular: recerca (Walker *i col.*·2000) i equips comercials (TransScan_Medical·2002) en la detecció de teixits cancerígens.
- Monitoratge tissular: monitoratge de la isquèmia cardíaca (Casas *i col.*·1999; Casas *i col.*·1996), assaigs de viabilitat pel transplantament d'òrgans i monitoratge de processos de rebuig en òrgans trasplantats.

De totes les aplicacions existents ens centrarem dins de les mesures cel·lulars, en la determinació de la concentració cel·lular per a cultius de cèl·lules adherents.

4.2 LA MEMBRANA CEL·LULAR

Per a poder entendre el funcionament i mecanismes de la bioimpedància, cal entrar en l'estructura de la membrana cel·lular des del punt de vista elèctric. Les cèl·lules presenten una membrana cel·lular que actua bàsicament com a aïllant entre un fluid iònic extracel·lular i un fluid iònic intracel·lular que conté diversos orgànuls, adquirint una funció important dins de la bioimpedància.

Les membranes cel·lulars (figura 4.1) estan formades per molècules que contenen una llarga cadena grassa amb un grup carregat (normalment fosfats) en un dels extrems atorgant-li solubilitat a l'aigua. Aquestes molècules s'orienten espontàniament en una solució formant la coneguda bicapa fosfolípida amb les cadenes hidrofòbiques a la part interior de la bicapa, de manera que es pot torçar fins a tancar-se, aïllant de la solució un fluid al seu interior.

Aquesta estructura marca les propietats difusives per a les molècules existents en els fluids intracel·lulars i extracel·lulars, essent permeable a petites molècules apolars com ara O_2 i N_2 , així com a molècules polars no carregades com la urea o etanol i lleugerament permeable a l'aigua, però per altra banda essent completament impermeable a grans molècules polars no carregades com la glucosa, a molècules polars carregades com ATP i a ions com K^+ i Cl^- (Lodish *i col.* 1995).

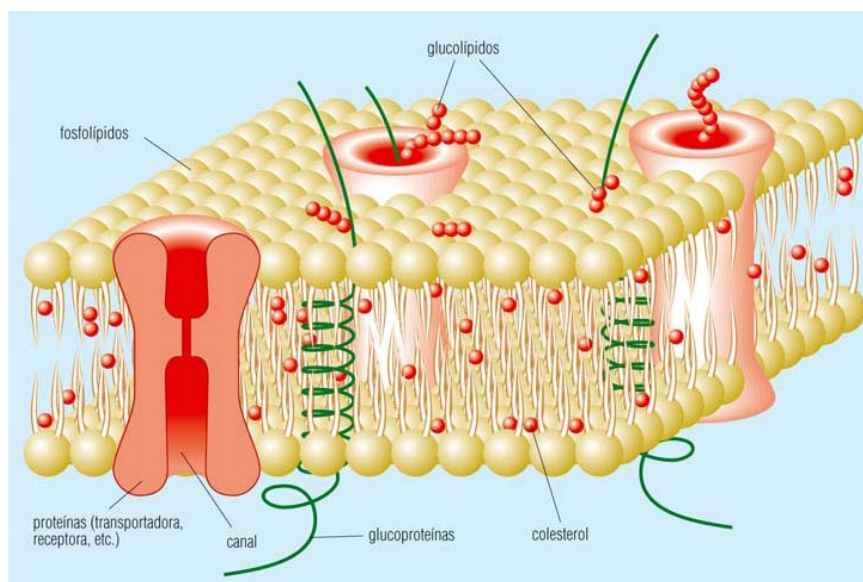


Figura 4.1 Esquema de la membrana cel·lular i els components corresponents.

A aquesta membrana base se li afegeix una xarxa de proteïnes que dóna rigidesa i forma a la cèl·lula i permeten els controls del seu moviment, de l'adhesió a superfícies, de la comunicació amb el seu medi extern i del transport de molècules a través de la membrana. Aquesta última funció es duu a terme a través de canals formats per aquestes proteïnes, de manera que poden estar sempre oberts (com el de K^+) o bé poden estar regulats a través del potencial transmembrana, fent que la cèl·lula es trobi en un estat elèctric estàtic, on les forces químiques i elèctriques que actuen en els ions a través de la membrana es troben en equilibri tot i els fluxos constants d'ions a través de la membrana. Aquest fet li dóna a la membrana unes característiques bàsicament capacitives amb una lleugera part resistiva, normalment menyspreada en front a la part capacitiva, tal i com es té en compte en aquest estudi.

Aquestes característiques permeten descriure el comportament cel·lular com un model electrònic on el pas del corrent a través de la membrana cel·lular pot equivaldre al pas del corrent a través d'un condensador, mentre que el pas del corrent a través dels medis iònics intracel·lular i extracel·lular equivalen al pas del corrent a través d'unes resistències. Un d'aquests models n'és el de Fricke, que es troba representat a la figura 4.2, i en el que es té en compte que el corrent pot circular o bé a través del medi extracel·lular o bé pot circular a través de la cèl·lula, és a dir, de la membrana cel·lular i del medi intracel·lular.

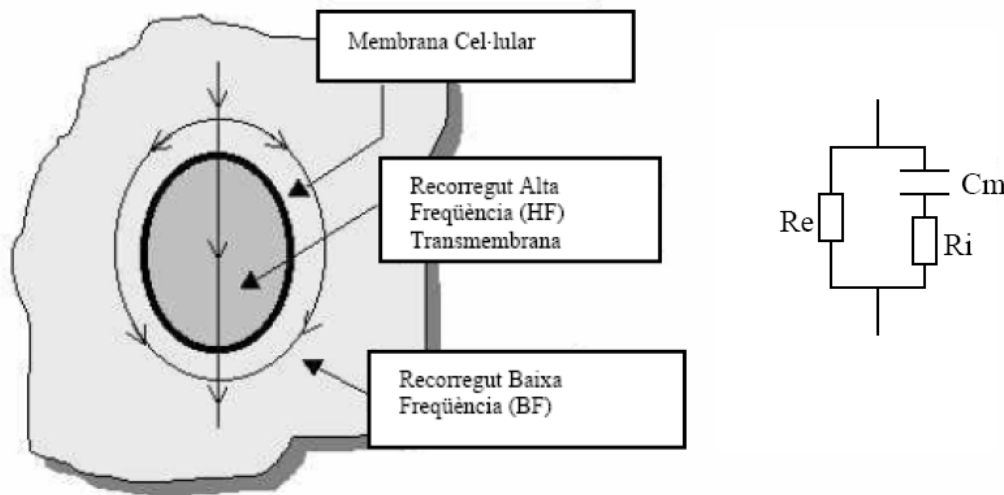


Figura 4.2 Les línies de flux de corrent a través de la cèl·lula en un cultiu cel·lular (esquerra) es transformen, dins el model de circuit electrònic (dreta), en resistències al passar a través dels medis intracel·lular (R_i) i extracel·lular (R_e) i en capacitàncies (C_m) al travessar la membrana cel·lular (Fricke·1932).

D'aquesta manera el circuit electrònic resultant equival a dues branques de corrent situades en paral·lel que contenen una resistència per a la branca corresponent al pas del corrent a través del medi extern i el conjunt d'un condensador (s'han agrupat en un sol condensador les dues capacitats corresponents als dos creuaments de la línia de flux per la membrana) i una resistència col·locats en sèrie per a la branca corresponent a la circulació del corrent a través de la cèl·lula.

4.3 LA BIOIMPEDÀNCIA

La impedància es pot definir com a l'oposició que presenta un material, que en el nostre cas es tracta de material biològic, és a dir, de les pròpies cèl·lules animals adherents, a la injecció d'un corrent sinusoidal en règim permanent a una determinada freqüència. Això implica que un cultiu cel·lular tingui associada una impedància amb una forta dependència freqüencial i una forta dependència a les propietats elèctriques passives del cultiu (conductivitat i permitivitat), proporcionades per l'efecte de la membrana cel·lular a l'aïllar dos medis iònics, quedant relacionades segons la formula següent:

$$Zi = \frac{1}{\sigma + j\omega\epsilon\epsilon_0} \quad [\text{Eq. 4.1}]$$

on

Zi és la impedància a una determinada freqüència i a una determinada concentració cel·lular,

ω és la freqüència del corrent altern,

σ és la conductivitat del cultiu cel·lular mesurada en S/cm,

ϵ és la permitivitat relativa del cultiu cel·lular (sense unitats),

ϵ_0 és la permitivitat del buit i té el valor de 8.8×10^{-14} F/cm, i

j és la unitat indicativa de la part imaginària dels números complexos: $(-1)^{1/2}$.

Es pot observar doncs, que la freqüència és important en el valor de la impedància en un cultiu cel·lular, de manera que per entendre com l'afecta, cal analitzar el que passa quan s'apliquen corrents alterns a altes i a baixes freqüències. Per poder observar aquest efecte de la freqüència, H. P. Schwan va examinar la permitivitat i la conductivitat de cultius cel·lulars al llarg de la freqüència (Schwan·1957), mostrant tres regions característiques a tenir en compte al mesurar la impedància en materials biològics, tal i com es pot observar a continuació en la figura 4.3. La transició monòtona que es produeix en aquestes regions característiques s'anomenen relaxacions.

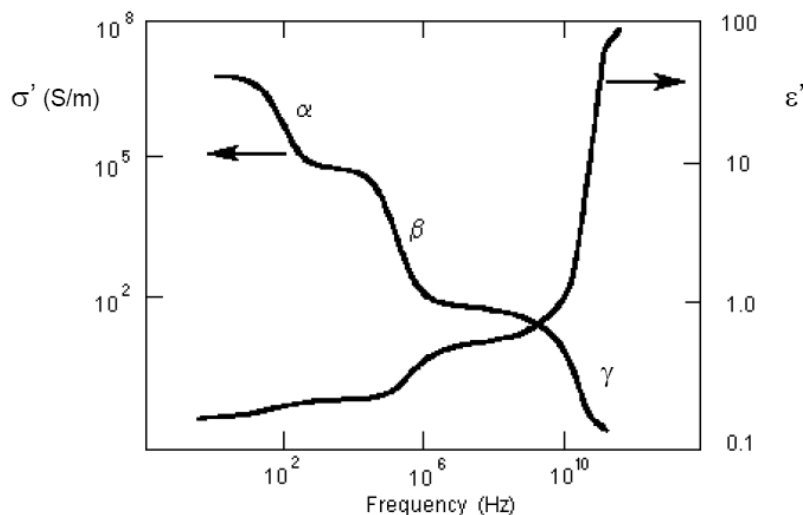


Figura 4.3 Evolució dels mòduls de conductivitat (σ') i permitivitat (ϵ') en un cultiu cel·lular en funció de la freqüència del corrent aplicat. Obtenció de les tres relaxacions obtingudes (α , β i γ). (Drago i col·1984)

La relaxació situada a la zona de les freqüències més baixes, que es troba situada a freqüències una mica inferiors a 1 KHz, s'anomena relaxació α i és deguda fonamentalment a la polarització de l'atmosfera

iònica que envolta cada cèl·lula (Schwarz·1962). Tot i estar relacionada amb la concentració de cèl·lules presents en el cultiu, la relaxació es troba situada en un rang de freqüències a on l'equip de mesura no té una precisió suficient i, per tant, s'obtidrien mesures d'impedància amb un error elevat. Aquest fet, inhabilita aquesta relaxació per a realitzar el seguiment de la concentració cel·lular.

La segona de les relaxacions, que es troba situada entre 50 KHz i 10 MHz i s'anomena relaxació β , és la relaxació causada per l'efecte de polarització de la membrana cel·lular segons es demostra fent que la relaxació pràcticament desapareixi al trencar o permeabilitzar la membrana cel·lular (Asami *i col.*·1977). Aquesta relaxació es troba situada dins una zona fiable de mesures i, per tant, és adequada pel seguiment de la concentració cel·lular en cultius. La tercera i última relaxació, que es troba situada per sobre dels 10 GHz i s'anomena relaxació γ i és deguda per la reorientació de les molècules d'aigua presents en el medi (Hasted·1973). Això fa que no sigui adequada per a la mesura de concentració cel·lular en cultius.

Essencialment, a baixa freqüència els dipols tenen temps d'orientar-se (ϵ elevada), mentre que quan la freqüència és alta no tenen suficient temps (ϵ petita). Així doncs en els cultius cel·lulars, tal i com es mostra a continuació a la figura 4.4, quan el corrent aplicat és de baixa freqüència la intensitat es veu forçada a passar pel medi extracel·lular fent que el camí a recórrer sigui major i, per tant, que augmenti la impedància, mentre que si el corrent aplicat és d'alta freqüència, la intensitat pot circular lliurement per tot el sistema, fent que la impedància sigui petita.

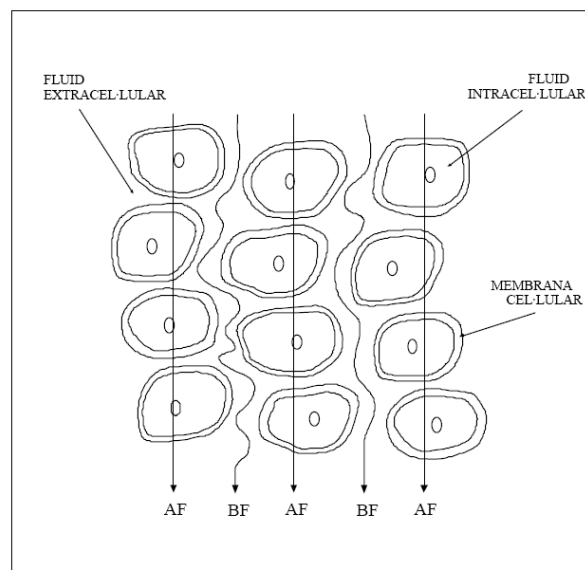


Figura 4.4 Esquema de les línies de flux de corrent obtingudes en un cultiu cel·lular a l'aplicar potencials a altes i a baixes freqüències (AF i BF respectivament).

Així, pel càlcul de la concentració cel·lular en cultius, de les diferents relaxacions que hi ha en el material biològic ens centrarem amb la relaxació β , la més indicada per a la mesura de la bioimpedància. Al 1941, els germans Cole (Cole i Cole-1941) varen trobar una expressió, anomenada equació de Cole-Cole, per a la caracterització de la permitivitat complexa, que té el seu equivalent (Eq. 4.2) en la expressió de la impedància en la zona de la relaxació β :

$$Z = R_{\infty} + \frac{R_0 - R_{\infty}}{1 + \left(j \frac{\omega}{\omega_c} \right)^{1-\alpha}} \quad [\text{Eq. 4.2}]$$

on els quatre paràmetres que la descriuen són

R_0 és el valor teòric de la impedància a freqüència 0,

R_{∞} és el valor teòric de la impedància a freqüència infinita,

ω_c és la freqüència central de relaxació,

α és el grau de dispersió de la relaxació respecte la freqüència central i indica la idealitat capacitiva de la membrana cel·lular, agafant el valor de 0 per a un condensador ideal. Per tant, modela el fet que hi hagi dispersions en les freqüències a les que es produeix la relaxació, degut a la dispersió de mides i formes de les cèl·lules.

4.4 LA MESURA D'IMPEDÀNCIA

Un cop situats dins de l'espectroscòpia d'impedància, a nivells pràctics, el valor de la impedància a una freqüència determinada s'obté de la relació entre la tensió mesurada al material i el corrent aplicat, tal i com es mostra a l'equació 4.3. Com que, tant el voltatge mesurat i la intensitat aplicada es troben formada per dues parts, el mòdul (valors de voltatge i intensitat) i la fase (retard entre voltatge i intensitat), aquesta relació s'obté per ambdós parts obtenint la mesura de la impedància.

$$Z(\omega) = \frac{V(\omega)}{I(\omega)} \quad [\text{Eq. 4.3}]$$

4.4.1 EQUIP DE MESURA DE LA IMPEDÀNCIA

Aquest estil de mesura puntual per a cada freqüència implica que, per a poder mesurar el perfil de la relaxació β , s'ha de fer un escombrat de mesures a diferents freqüències al llarg de la relaxació. Per a efectuar la mesura puntual de la impedància a una rang determinat de freqüències, es necessita realitzar el muntatge d'un equipament de mesura específic, que ha estat desenvolupat pel Departament

d'Enginyeria Electrònica de la UPC, i es troba format per 4 components bàsics que es descriuen breument a continuació, amb les connexions entre els diferents components esquematitzades a la figura 4.5.

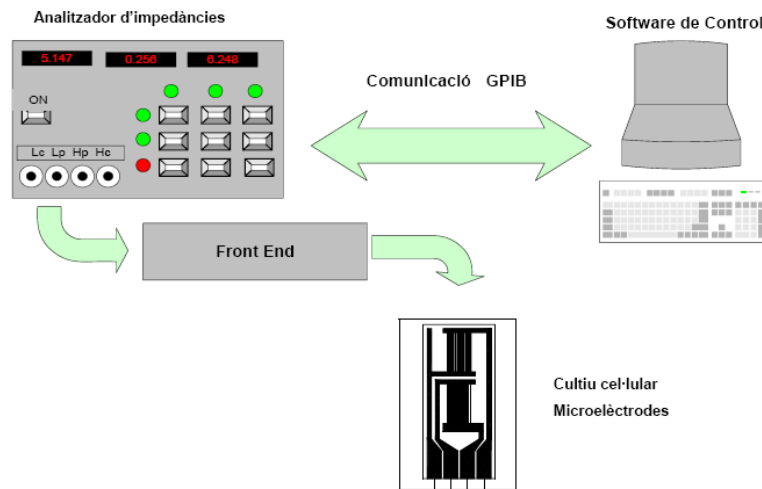


Figura 4.5 Esquema de connexions entre els diferents components de l'equip de mesura de la impedància elèctrica.

- El primer component és l'analitzador comercial d'impedàncies HP4192A i és l'encarregat d'aplicar un corrent altern conegut a una determinada freqüència entre dos borns de sortida i de mesurar el voltatge rebut entre dos altres borns d'entrada, els que relaciona mitjançant l'equació 4.3 per a la obtenció dels valors del mòdul i la fase de la impedància.
- El segon component de l'equip de mesura de la impedància són les parelles d'elèctrodes pels que s'aplica el corrent i es mesura la caiguda de potencial corresponent. Tot i que hi ha moltes tipologies d'elèctrodes, tal i com s'exposa més endavant a l'apartat 4.4.2, en aquest treball s'utilitzaran els microelèctrodes interdigitats (IMEs), que es col·loquen a l'interior del cultiu cel·lular i actuen d'elèctrodes per a l'aplicació del corrent i per a la mesura de la tensió obtinguda a través d'unes xarxes de microelèctrodes que es troben dipositats a la superfície d'un tros de vidre de borosilicat i que a la vegada també actua de superfície de creixement per a les cèl·lules animals adherents.
- Així, per a poder mesurar la impedància en un cultiu s'han de connectar les entrades i sortides corresponents als microelèctrodes. Aquesta connexió es realitza a través de cables coaxials i d'una etapa frontal remota (Front End), desenvolupada pel Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC i encarregada de minimitzar les influències provocades per les impedàncies externes a la del cultiu cel·lular que s'expressarien en forma d'errors en la mesura d'impedància. (Bragós·1997)

- Finalment, pel control de les configuracions de l'analitzador d'impedàncies, en les que s'inclouen el rang de freqüències i la quantitat de mesures entre altres paràmetres, es disposa d'un ordinador amb un programa d'adquisició corresponent, també desenvolupat pel Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC. (Bragós·1997)

4.4.2 EVOLUCIÓ DELS ELÈCTRODES CAP A MICROELÈCTRODES

Tal com es pot observar, aquests elèctrodes juguen una funció bastant important en la mesura de la impedància. Tot i que en l'actualitat s'utilitzen xarxes de microelèctrodes comercials per a la mesura de la impedància que permeten la configuració de la mesura en els diferents sistemes de mesura exposats anteriorment, aquestes xarxes de microelèctrodes només s'utilitzen des de fa unes dècades, ja que històricament, les propietats elèctriques de cultius cel·lulars s'ha estudiat mitjançant l'ús d'elèctrodes de microcable (cable metàl·lic) o micropipeta (amb punta metàl·lica).

Mitjançant micromanipuladors, es posicionaven els elèctrodes de mesura de diferents maneres. Per a la mesura directa del potencial a la pròpia membrana (mesura intracel·lular), es col·locaven els elèctrodes a través de la membrana cel·lular. Aquesta tècnica però, incloïa una gran quantitat de problemàtiques com la fragilitat de la mesura i el dany fet a la cèl·lula de mesura (Breckenridge *i col.*·1995). Una altra metodologia de mesura es basava en posar la micropipeta en contacte amb la membrana sense travessar-la (mesura de contacte cel·lular), però amb una lleugera succió per mantenir el contacte, servint per a la mesura de diverses característiques cel·lulars (Nicholls *i col.*·2001) però compartint la majoria de problemàtiques que l'anterior sistema.

Finalment, una altra tècnica utilitzant aquest tipus d'elèctrodes, es basava en la col·locació del microcable en proximitat a la cèl·lula de mesura (extracel·lular), evitant els efectes negatius en les cèl·lules però disminuint dràsticament el potencial de mesura i per tant la sensibilitat.

Totes aquestes problemàtiques, amb la impossibilitat de les mesures de llarga durada, han derivat cap a portar les pròpies cèl·lules al sensor de mesura mitjançant la utilització d'aquestes xarxes de microelèctrodes dipositats sobre un suport de vidre, utilitzats satisfactòriament per a la mesura de potencials en cultius cel·lulars des de principis dels anys 70. Existeixen altres sistemes no invasius pel monitoratge de l'activitat elèctrica, però comporten una gran quantitat de limitacions que han fet que es descartessin (Bousse·1995). Com es pot comprovar, la mesura no és fàcil i, per tant, caldrà veure si es pot adaptar a les necessitats de cada bioprocés.

4.4.3 SISTEMES DE MESURA I MODELITZACIONS

Tal i com ja s'ha exposat a la introducció general, existeixen diversos sistemes per realitzar mesures d'espectroscòpia d'impedància. El primer sistema de mesura d'impedàncies desenvolupat i encara el més utilitzat i conegut avui dia, s'anomena "sistema de mesures a 2 fils", ha estat àmpliament utilitzat pel seguiment del creixement cel·lular tant de procariotes, (Asami *i col.*·1999) i (Radke i Alócilja·2004), com de cèl·lules animals, (Giaever i Keese·1986), (Kowolenko *i col.*·1990), (Mitra *i col.*·1991), (Lo *i col.*·1995) i (De Blasio *i col.*·2004) i fins i tot ha estat incorporat en un sistema comercial per a la mesura contínua de cultius cel·lulars (Wolf *i col.*·1998). Aquest sistema està basat en la utilització de la mateixa parella d'elèctrodes amb els que s'injecta el corrent sinusoidal i amb els que simultàniament es mesura la caiguda de tensió assolida pel cultiu cel·lular situat entre els elèctrodes, tal i com es pot observar en l'esquema de la figura 4.6.

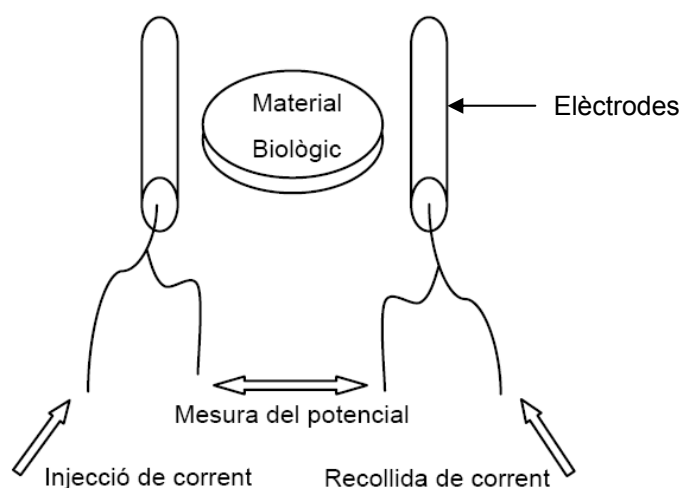


Figura 4.6 Esquema dels elèctrodes pel sistema clàssic de mesura a 2 fils.

Tot i ser el sistema majoritàriament utilitzat, el sistema de mesures a 2 fils presenta una sèrie de problemàtiques que provenen del fet que per tal d'evitar la degradació dels microelèctrodes així com possibles reaccions redox amb el propi cultiu cel·lular, s'utilitzen microelèctrodes de metalls nobles, com ara platí o or. Aquest fet, potencia un efecte capacitiu dels propis microelèctrodes i, per tant, una impedància pròpia que depèn de l'àrea dels microelèctrodes així com d'altres factors com podrien ser la temperatura, els continguts iònics del cultiu, l'adhesió de proteïnes cel·lulars i d'altres efectes poc estudiats que aporten varies indeterminacions a la mesura d'impedància en cultius cel·lulars.

Aquest fet, juntament amb el fet d'utilitzar els mateixos dos elèctrodes per injectar un corrent sinusoidal i per mesurar simultàniament la caiguda de tensió del cultiu cel·lular, implica que les impedàncies dels dos

elèctrodes també siguin mesurades, com si es trobessin col·locades en sèrie amb la impedància del cultiu cel·lular (suma d'impedàncies). Això atorga a la mesura de la impedància a 2 fils una gran sensibilitat al grau de recobriment dels propis elèctrodes així com de la resta d'efectes descrits anteriorment, i per tant comportant un error elevat en la mesura de la impedància.

Aquests efectes de la pròpia impedància dels elèctrodes, de l'àrea dels microelèctrodes ocupada per les cèl·lules o bé l'adhesió de les cèl·lules a la superfície dels microelèctrodes es poden observar a la següent figura (figura 4.7), a on es troba representat el model de circuit electrònic per a la mesura d'impedància a 2 fils en un cultiu cel·lular.

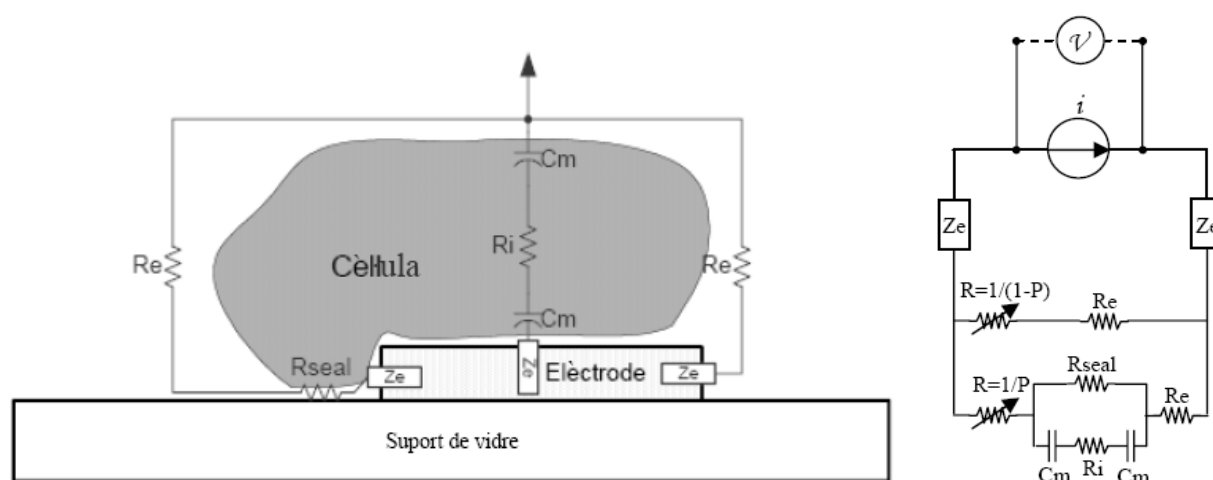


Figura 4.7 Representació dels fluxos d'intensitat en l'esquema cèl·lula-microelèctrode (esquerra), juntament amb el model de circuit electrònic corresponent al sistema d'impedància per microelèctrodes configurats per a la mesura a 2 fils (dreta). R_e i R_i són les resistències del medi extracel·lular i intracel·lular, C_m són les capacitàncies associades a la membrana cel·lular, Z_e és la impedància dels propis elèctrodes, R_{seal} és la resistència al pas del corrent per sota la cèl·lula adherida i P és el grau de recobriment dels microelèctrodes (valor entre 0 i 1 per l'absència de cèl·lules i cultius confluents respectivament). Finalment, i i v representen les zones d'inserció del corrent i de mesura del voltatge respectivament.

Es pot observar doncs amb la figura 4.7 (dreta), que a l'utilitzar els mateixos elèctrodes tant per a la injecció del corrent com per a la mesura del voltatge, fa que no només s'estigui mesurant el material biològic (la branca més inferior), sinó que la mesura també es veu influenciada per la pròpia impedància dels elèctrodes, a més del grau de recobriment dels microelèctrodes i de l'adherència de les cèl·lules, efectes variables al llarg del cultiu i que es troben poc estudiats.

Tot i que s'han desenvolupat altres models on s'inclou el grau de recobriment dels elèctrodes (Huang *i col.* 2004), així com configuracions de tres elèctrodes per a la mesura de la impedància (Kinouchi *i col.* 1997), aquests o depenen de factors com la geometria o encara continuen estant influenciats per

l'adhesió de les cèl·lules, per la impedància dels microelèctrodes, encara que a menor grau que en la mesura a 2 fils, i per altres efectes poc estudiats actualment.

Es per això que es desenvolupà el sistema de mesura d'impedància a 4 fils, on el corrent s'injecta al sistema mitjançant una parella d'elèctrodes mentre que la caiguda de tensió resultant es mesura amb una altra parella d'elèctrodes situats en el pas del corrent, tal i com es pot observar en l'esquema de la figura 4.8 (esquerra).

Aquest mètode, tot i que no elimina totalment els errors de la mesura (capacitàncies entre microelèctrodes...) (Pallas-Areny i Webster 1993), fan que la magnitud d'aquests errors sigui molt més petita en les mesures d'impedància a 4 fils que en les mesures a 2 fils, (Rosell i col·l·1988) i (Kijlstra i col·l·1994). El model de circuit electrònic resultant per a les mesures d'impedància a 4 fils es troba a la figura 4.8 (dreta) on es pot observar la menor influència d'altres efectes externs al cultiu cel·lular.

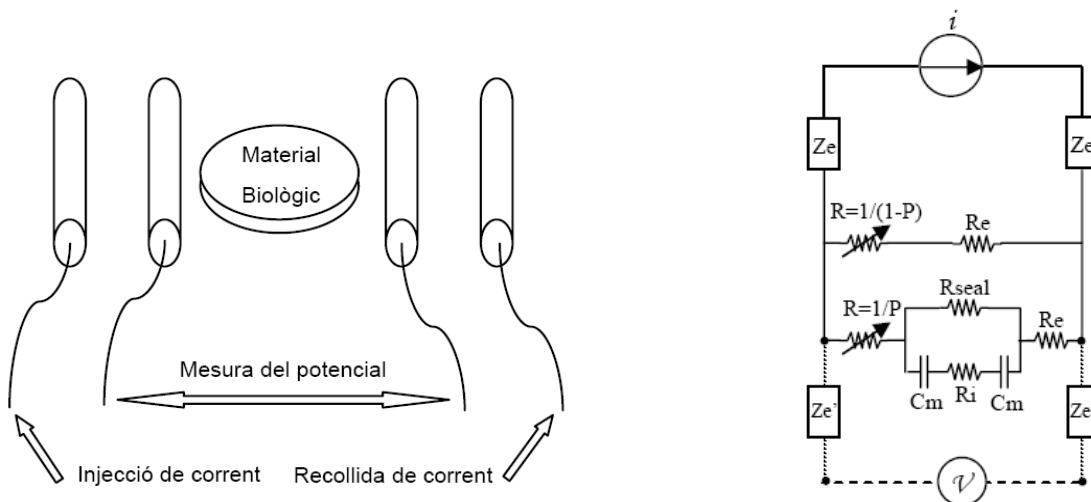


Figura 4.8 Esquema dels elèctrodes per a la mesura d'impedància d'un cultiu cel·lular mitjançant microelèctrodes pel sistema de mesures a 4 fils (esquerra), juntament amb el model de circuit electrònic corresponent al sistema d'impedància per microelèctrodes configurats per a la mesura a 4 fils (dreta).

Es pot observar doncs que poder utilitzar una parella de microelèctrodes diferents per a la mesura del voltatge (diferent situació de v respecte la mesura configurada a 2 fils) permet la mesura de la impedància del material biològic tal i com mostra el circuit tancat de mesura del voltatge a través del material biològic (branca $R(P)-C_m-R_i-C_m-R_e$), rebent només les influències de les impedàncies dels microelèctrodes de mesura del voltatge (menors que a 2 fils al no passar-hi intensitat) i, en menys grau, de la resta de factors presents al sistema de mesura.

4.4.4 CONFIGURACIONS DELS MICROELÈCTRODES A 2 I 4 FILS

Per a poder comparar les mesures d'impedància realitzades amb els sistemes de 2 i 4 fils, cal fer el disseny de les connexions entre l'IME i l'analitzador d'impedàncies per tal de poder realitzar tant mesures d'impedància a 2 fils com a 4 fils, però a més a més, que aquestes siguin comparables al realitzar canvis entre ambdós sistemes de mesura, és a dir, es necessita que les zones de mesura del potencial i d'aplicació del corrent siguin les mateixes, sigui quin sigui el sistema de mesura. Per a aconseguir-ho, s'ha de tenir en compte les entrades i sortides de l'analitzador d'impedàncies així com la disposició de les diferents xarxes de microelèctrodes presents en els IMEs.

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, l'analitzador d'impedàncies té 4 borns de connexió al frontal de l'aparell, dels quals dos estan destinats per a les connexions amb els elèctrodes pels quals s'ha d'injectar i recollir el corrent i que s'anomenen "High Current" (abreviat HC) i "Low Current" (abreviat LC) respectivament, mentre que els altres dos estan destinats a les connexions amb els elèctrodes per a la mesura del potencial resultant d'aplicar el corrent, anomenats "High Potential" i "Low Potential" (HP i LP respectivament). Tot i realitzar-se les connexions de l'analitzador a l'IME a través del Front End, aquests 4 borns, així com el seu ordre, es conserven a la sortida del Front End.

Per altra banda, els IMEs escollits per a la mesura de la impedància que permeten tant les configuracions de mesura a 2 fils i a 4 fils, estan formats per 4 xarxes de microelèctrodes agrupades en dues parelles i amb els microelèctrodes alternats un a un, tal i com es pot observar a la figura 4.9, on la finalitat descrita pel fabricant recau en poder definir dues regions on poder efectuar mesures diferenciades, una com a control i l'altra com a mesura (Abtech Scientific).

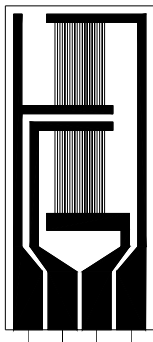


Figura 4.9 Esquema de les xarxes de microelèctrodes (pistes centrals fines) amb les corresponents pistes mare (les 4 pistes gruixudes) presents en un IME.

Cada una d'aquestes xarxes es troba connectada a una pista mare d'un gruix superior, amb els 4 finals situats a un cantó del vidre de borosilicat al que es troben dipositats els microelèctrodes, amb la concepció

d'afavorir les connexions dels IMEs amb el corresponent analitzador d'impedàncies o, en el nostre cas, amb l'etapa frontal remota que actua de etapa intermèdia entre els microelèctrodes i l'analitzador d'impedàncies.

Així doncs, per tal de poder mesurar la impedància dels cultius cel·lular d'una manera comparable tant a 2 fils com a 4 fils, cal analitzar les possibles connexions d'aquestes pistes mare amb les entrades de l'analitzador d'impedàncies. A la figura 4.10 situada a continuació, es poden observar aquests esquemes de connexions entre l'analitzador i els 4 microelèctrodes de l'IME, tant pel cas del sistema de mesura a 4 fils (esquerra) com pel sistema de mesura a 2 fils, amb dues possibilitats de connexió (centre i dreta).

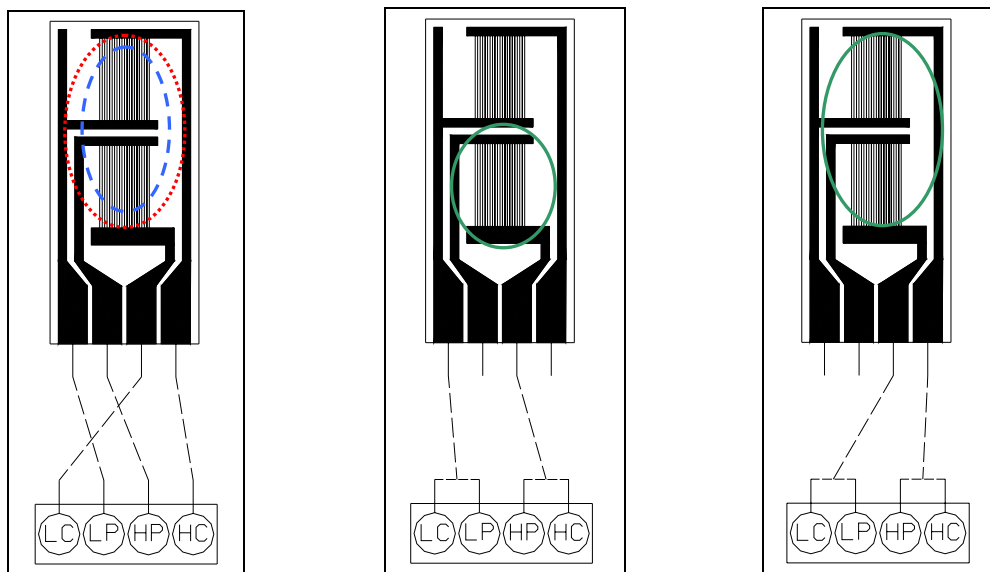


Figura 4.10 Esquemes dissenyats per a les connexions entre l'analitzador d'impedàncies i els microelèctrodes per a la mesura de la impedància a 2 i 4 fils. Encerclades de color blau (- -) i de color vermell (•••) respectivament es troben la zona activa de lectura del potencial i la zona activa d'aplicació de corrent per a la mesura a 4 fils (esquerra). Per a la mesura de la impedància a 2 fils (centre i dreta), la zona activa de lectura del potencial, que coincideix amb la zona d'aplicació de corrent, es troba encerclada amb color verd (—).

Tal i com es mostra a la figura, pel cas de les connexions per a la mesura d'impedància en el sistema de 4 fils (esquerra), només hi ha una configuració possible, on el corrent s'injecta i es recull de l'IME (HC i LC) a través de les xarxes de microelèctrodes més externes, és a dir les que queden situades a la part més superior i inferior de l'IME. Aquestes dues connexions podrien ésser bescanviades sense influir en la impedància mesurada. Per altra banda, la mesura de potencial (és a dir, el potencial entre HP i LP) es realitza entre les xarxes de microelèctrodes més internes, situades a la part central de l'IME, quedant al mig del pas del corrent injectat i, per tant, obtenint una mesura de la impedància a 4 fils. Amb aquesta configuració, s'obté que l'àrea de mesura de potencial sigui quasi igual que la d'aplicació de la corrent, però amb la utilització d'uns elèctrodes diferents i per tant sense obtenir una mesura influenciada per la seva pròpia impedància.

En el cas de les connexions per a la mesura d'impedància a 2 fils, tenim que existeixen vàries possibles configuracions de les quals se'n mostren dues (figura 4.10, centre i dreta). En les mesures a 2 fils, es realitza la compartició d'elèctrodes per a la injecció de corrent i per a la mesura de tensió (parelles HP-HC i LP-LC), fent que qualsevol configuració utilitzada obtingui una mesura real a 2 fils.

Per a que siguin comparables però amb la mesura a 4 fils dissenyada, les xarxes de microelèctrodes a utilitzar per a la mesura a 2 fils han d'estar situades una al grup de dues xarxes situat a la part superior de l'IME, mentre que l'altra s'ha de trobar situada al grup de xarxes inferior, acomplerta per ambdós exemples. D'aquesta manera obtindrem una mesura amb una àrea de mesura igual que per a la mesura de 4 fils. Per que sigui totalment comparable però, és convenient que s'utilitzin els mateixos elèctrodes per a fer la injecció del corrent que per a la mesura de la impedància a 4 fils i, per tant, s'han d'utilitzar la configuració representada més a la dreta.

Per a poder observar les diferències obtingudes en la mesura de la impedància per a les tres configuracions esmentades, s'ha efectuat un escombrat del mòdul de la impedància al llarg d'un rang de freqüències entre els 10 KHz i 10 MHz per a una solució salina estàndard (0,9% de NaCl). Per a poder realitzar aquestes mesures, s'ha construït un muntatge (protocol a l'apartat 8.7.6 de Materials i Mètodes), que es pot observar a la figura 4.11, on l'IME s'ha inserit a l'interior d'una placa petri, amb el costat on coincideixen els finals de les pistes mare sortint pel lateral de la placa a través d'un forat realitzat prèviament.

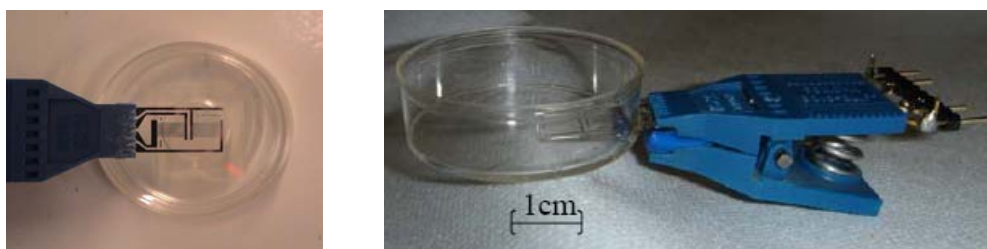


Figura 4.11 Fotografies inferior (esquerra) i de perfil (dreta) del muntatge experimental per a la realització de mesures d'impedància a l'interior d'una placa petri.

Per a mantenir la estanquitat del sistema, s'ha afegit una silicona biocompatible per a tancar el forat. Per a les connexions de les pistes mare amb el Front End, s'ha utilitzat un connector de pinça que mitjançant la pressió efectuada per la molla, manté el contacte de les pistes mare amb 4 pues conductores que travessen la pinça on es troben soldades a un connector de pintes (situat a la dreta de la imatge).

Amb aquest muntatge, ja es poden dur a terme les diferents connexions dissenyades per a les mesures de la impedància a 2 fils i a 4 fils entre les pintes de sortida i les pintes d'entrada del Front End, mitjançant 4 cables conductors soldats a dues pintes femella per a cada una de les connexions. Per obtenir doncs els perfils del mòdul de la impedància al llarg de la freqüència, s'ha omplert la placa petri amb 3 ml de solució salina i s'ha mantingut a temperatura ambient mentre es realitzaven les mesures amb l'analitzador d'impedàncies (utilitzant la configuració estàndard de l'analitzador, exposada a l'apartat 8.5.2.2 de Materials i Mètodes) per a cada una de les tres configuracions dels microelèctrodes diferents, exposades anteriorment. Els resultats obtinguts es poden observar a continuació a la figura 4.12.

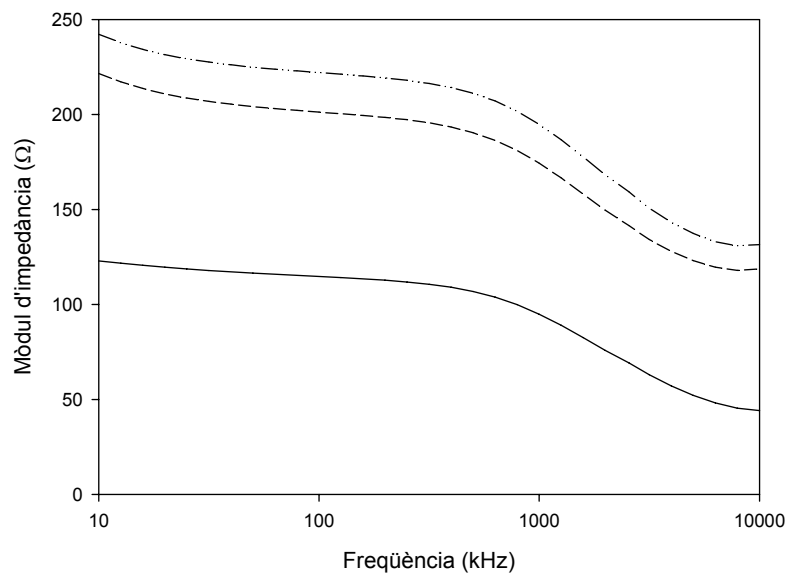


Figura 4.12 Perfils del mòdul de la impedància al llarg de la freqüència per a les diferents configuracions de les connexions entre l'analitzador d'impedàncies i els microelèctrodes. Les configuracions analitzades són les utilitzades pel sistema de mesura a 4 fils (—) i a 2 fils, tant per a la configuració no comparable (---) com per a la comparable en àrea i en elèctrodes utilitzats (-·-).

Amb els resultats obtinguts es poden observar les diferències esmentades a l'apartat 4.4.3 entre les mesures a 2 i 4 fils, on s'exposa que el sistema de mesura de la impedància a 2 fils es veu influenciada per la pròpia impedància dels elèctrodes de mesura en major grau que pel sistema de mesura a 4 fils. Aquest efecte queda corroborat a l'obtenir, per a la mesura de la impedància amb la configuració de mesura a 4 fils, uns mòduls d'impedància inferiors que per a la configuració de mesura a 2 fils al llarg de tot el rang de freqüències estudiat.

Pel que fa a les dues configuracions a 2 fils, es pot observar com són bastant semblants entre elles al mesurar pràcticament la mateixa superfície, però com que la mesura a 2 fils es troba fàcilment influenciada per la impedància dels elèctrodes amb els que es mesura, el fet d'utilitzar diferents elèctrodes per a les dues mesures a 2 fils fa les corresponents impedàncies d'aquests també ho siguin, el que provoca una

major dispersió en els valors pel mòdul de la impedància. Aquest fet indica no només que l'efecte de la impedància dels elèctrodes de mesura és bàsicament additiu, sinó que aquest depèn de factors externs a la mesura, variables i desconeguts. A més, amb la mesura del mòdul de la impedància realitzada amb les configuracions a 2 fils, es pot observar, a la zona de baixes freqüències, una tendència del mòdul de la impedància a augmentar a mesura que disminueix la freqüència del corrent aplicat. Aquesta tendència, que no s'observa amb les mesures efectuades amb la configuració de mesura a 4 fils per a valors de freqüència superiors a 10 kHz, s'intensifica a valors més petits de freqüència i és deguda a l'efecte capacitiu dels propis elèctrodes de mesura.

Per tant, tot i que es continuaran realitzant mesures a 2 fils per a seguiments de cultius cel·lulars, tant com a contramesures de les realitzades a 4 fils com per a aportar informació addicional dels cultius cel·lulars, per a poder minimitzar els diferents efectes desconeguts i variables que afecten a la mesura de la impedància i, per tant, per a optimitzar-ne la qualitat de la mateixa, aquesta s'haurà de realitzar a 4 fils.

Dels resultats obtinguts però, se'n pot observar un altre fet. Com que en aquest experiment no s'ha mesurat cap tipus de material biològic, no hauria d'existir cap tipus de relaxació de la mesura deguda a la presència de membranes cel·lulars, sinó que s'hauria d'observar un descens continu del mòdul de la impedància a l'augmentar la freqüència de mesura, equivalent a un comportament normal obtingut per a qualsevol fluid conductiu. En canvi, es pot observar una davallada més pronunciada en el perfil del mòdul d'impedància quan aquesta arriba a una freqüència d'aproximadament 1 MHz. Aquest fet indica que, per a aquestes altes freqüències, la mesura de la impedància es veu influenciada per altres factors, com ara el propi error de l'analitzador d'impedàncies a l'acostar-se a valors elevats del rang de mesures, fonamentalment degut a limitacions de l'amplificador del front-end (tenint en compte que una bona part d'aquest error és pot calibrar).

4.4.5 INFLUÈNCIA DE LES PISTES MARE

Tot i que inicialment aquesta influència de la mesura a altes freqüències podria no suposar una gran problemàtica al poder-se realitzar mesures del mòdul de la impedància entre 10 i 1000 KHz, en mesures de la impedància per a materials biològics aquest rang podria no ser suficient per a la determinació del mòdul de la impedància per a freqüències que es trobin situades en la relaxació del material o a la zona de freqüències més elevades, que podrien estar situats des de 50 KHz fins a varis MHz (Bourne *i col.* 1996). Per tant, es fa necessària la minimització d'aquestes influències del sistema per tal de maximitzar el límit superior d'aquest rang de freqüències per a la mesura de la impedància.

Per a poder minimitzar aquestes influències, cal entendre la seva procedència. Tot i que l'analitzador d'impedàncies es pot trobar influenciat per diferents factors a altes freqüències, segons les especificacions de l'equip utilitzat, aquestes no haurien de ser visibles per sota de 5-10 MHz. Per tant, s'han d'analitzar els resultats obtinguts anteriorment (figura 4.12), juntament amb el muntatge experimental i la zona activa per a la mesura de la impedància, determinada per les zones de microelèctrodes, per les connexions entre l'analitzador d'impedància i els IMEs i les configuracions de mesura utilitzades (figura 4.13, esquerra).

Si tenim en compte els resultats anteriors, tenim que per a freqüències altes hi ha una disminució exagerada del mòdul de l'impedància. Aquest efecte podria venir donat per un efecte de lliure circulació del corrent injectat a través de qualsevol punt de la superfície de l'IME. Aquest efecte significa que, al trobar que el pas del corrent per la superfície teòricament no activa de l'IME no es troba confinat, aquest corrent injectat pot trobar camins alternatius al seu pas a través de les pistes mare en comptes de dirigir-se cap a les xarxes de microelèctrodes.

Aquest fet, que és més fàcil d'obtenir com més elevada sigui la freqüència, on el corrent aplicat és molt dinàmic, mentre que per a les mesures situades a la zona de baixes freqüències és més difícil d'obtenir, ja que el corrent aplicat és força més estable, disminuiria el corrent real que circula a través de la zona de mesura de la baixada de tensió i, per tant, la baixada de tensió seria menor a la esperada realment, de manera que s'obtingria un error variable i sense cap tipus de control.

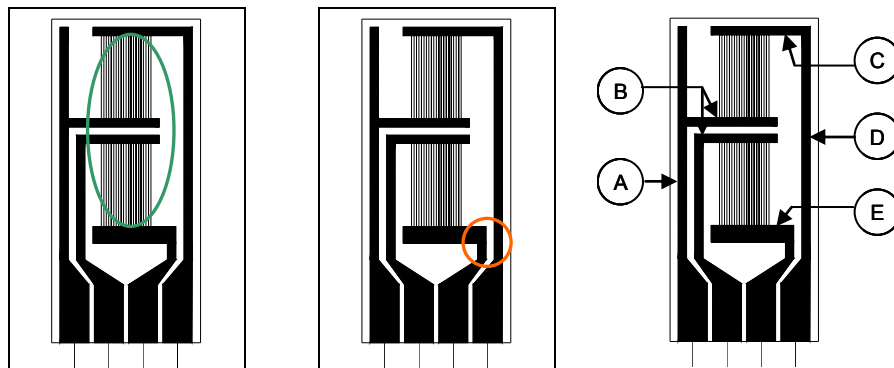


Figura 4.13 Determinació de les zones teòriques d'interferències a la mesura de la impedància, causades per les interaccions entre les diferents pistes base de la xarxa de microelèctrodes (pistes amples). Zona teòrica activa de mesura de la impedància (esquerra). Una de les zones de màxima interferència entre pistes base per a la mesura de la impedància (centre). Numeració de les pistes base del sistema de microelèctrodes (dreta).

Per tal de confirmar les suposicions i intentar evitar aquesta lliure circulació de corrent, cal analitzar la zona activa per a la mesura de la impedància. Si es tenen en compte els elèctrodes pels quals s'injecta i es recull el corrent, es pot observar que existeix una zona de l'IME per la que passen molt a prop les dues pistes mare (figura 4.13, centre) que, al tenir una superfície més elevada que les xarxes de

microelèctrodes, la converteix en una de les zones amb més possibilitats d'interferències per a la mesura de la impedància. Aquest efecte però, no només es pot trobar en aquesta regió esmentada, sinó que es pot donar al llarg de totes les pistes mare, ja que disposen d'un gruix significatiu.

Per a poder evitar aquest efecte no desitjat, es fa necessari l'aïllament d'aquestes pistes mare mitjançant un material no conductor de corrent, efectuat mitjançant la mateixa silicona utilitzada pel muntatge dels IMEs. Per tal d'avaluar les zones de màxima influència i la magnitud d'aquestes interferències, s'han analitzat els perfils del mòdul de la impedància resultants a l'aïllament gradual de les pistes mare de l'IME, numerades a la figura 4.13 (dreta) i començant per la zona de màxima possibilitat detectada anteriorment.

Per a dur-ho a terme, s'ha utilitzat el mateix muntatge que en l'experiment anterior, és a dir, la placa petri amb els microelèctrodes inserits en el seu interior, on se li ha afegit 3 ml de solució salina, tot mantenint la temperatura ambient controlada mentre es realitzaven les mesures corresponents amb l'analitzador d'impedàncies (configuració estàndard) configurat per a realitzar les mesures a 4 fils. Els resultats obtinguts es poden observar a la figura 4.14, a on es troben representats els perfils d'impedància per a les diferents pistes aïllades.

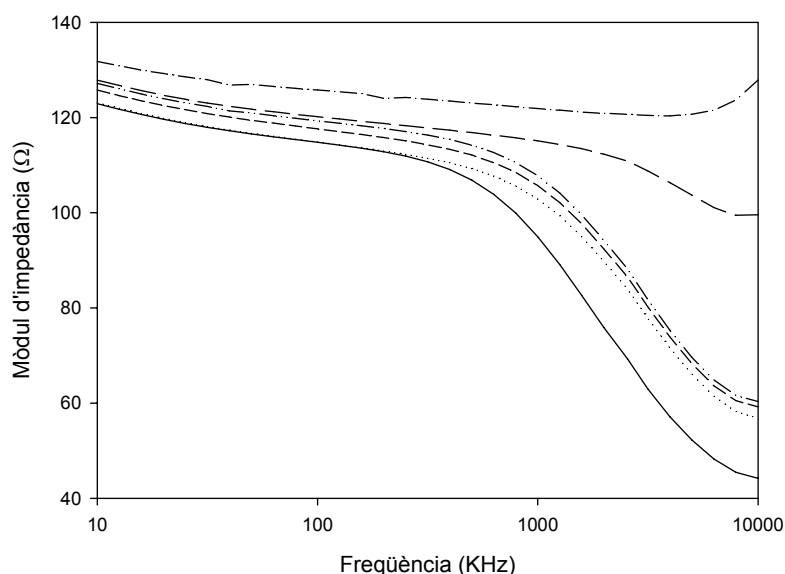


Figura 4.14 Evolució del mòdul de la impedància al llarg de la freqüència per a les diferents configuracions de pistes base. Les configuracions analitzades corresponen a microelèctrodes sense cap pista base aïllada (—), aïllant la pista base D (···), aïllant les pistes base DE (---), aïllant les pistes base CDE (- - -), aïllant les pistes base ACDE (— · —) i aïllant totes les pistes base (ABCDE, - · -).

El primer fet que es pot observar és que efectivament existeix l'efecte de la lliure circulació de corrent, ja que el fet de tancar les diferents pistes mare repercuteix en un augment de la linealitat de la mesura i, per tant, un augment del límit superior del rang adequat per a la mesura d'impedància. Tal i com s'havia

observat anteriorment, per a la mesura sense cap pista mare aïllada, s'obté una disminució exagerada del mòdul de la impedància a mesura que la freqüència s'acosta a 1 MHz, disminució que va augmentant a mesura que s'augmenta la freqüència. A mesura que les pistes mare es van aïllant, s'observa que repercuteix en un augment del rang de linealitat, sobretot en el cas de les pistes mare D [pas de (—) a (···)] i A [pas de (---) a (— —)], apuntant-les com a les pistes més importants per on s'escapa i es recull el corrent injectat perdut. Amb l'aïllament d'aquestes pistes, el límit superior del rang de mesura de la impedància arriba fins a 2-4 MHz, mentre que si es realitza l'aïllament de totes les pistes, el límit es situa cap als 6-8 MHz, valor de freqüència més normal segons les especificacions de l'analitzador d'impedàncies utilitzat.

L'altre factor que s'obté de l'aïllament de les pistes mare és un augment en el mòdul de la impedància, augment independent del valor de la freqüència de mesura. Aquest augment ve donat per la facilitat de l'aïllament de la pista respecte la proximitat de les xarxes dels microelèctrodes de mesura, de manera que l'aïllament de la pista mare A, que es troba molt separada de les xarxes, es pot aïllar completament sense que en quedi aïllada cap zona de la xarxa de microelèctrodes i, per tant, no existeix cap mena d'augment del mòdul de la impedància. Per altra banda, quan la pista mare a aïllar es troba situada prop de les xarxes de microelèctrodes, com per exemple la pista B [pas de (···) a (— —)], s'acaba per aïllar també una petita zona de la xarxa de microelèctrodes que quedarà inutilitzada, disminuint l'àrea de pas del corrent i, per tant, augmentant el mòdul de la mesura d'impedància. Tot i que aquest fet només representa un canvi en la constant de cel·la del conjunt i, per tant, es tracta d'un factor calibrable, el fet que la part de l'àrea de la xarxa de microelèctrodes que queda aïllada no sigui ni coneguda ni controlada fa que no sigui un factor reproduïble, fent que aquesta última modificació no sigui adequada per a la mesura de la impedància.

En resum, les pistes que s'han de tancar són les que proporcionen un augment del rang lineal de la mesura significatiu sense provocar un augment substancial del mòdul de la impedància. Si observem l'efecte de l'aïllament de les diferents pistes mare, podem observar que les pistes D, A i B són les que més efecte tenen sobre la linealitat de la mesura, tot i que en el cas de la pista mare B, aquest augment va acompanyat d'una variació encara més elevada del mòdul de la impedància, essent un fet lògic si es té en compte que aquesta pista mare es troba situada justament entremig i en contacte amb les dues xarxes de microelèctrodes. Per altra banda, l'aïllament de les pistes C i E no provoquen cap millora pel que fa a la linealitat de la mesura, mentre que si que provoquen, encara que lleuger, un augment en el mòdul fent que siguin les descartades juntament amb la pista mare B a la hora d'efectuar l'aïllament de les pistes mare restants, les pistes mare D i A.

4.5 SELECCIÓ DE L'ESTIMADOR DE CONCENTRACIÓ CEL·LULAR

Amb l'aïllament de les dues pistes mare més problemàtiques, el rang de mesura per a la impedància queda situat entre una freqüència mínima de 10-20 KHz i una freqüència màxima de 2-3 MHz, valors suficients per a la determinació de la impedància al voltant de la relaxació β (tant a altes com a baixes freqüències) en cultius de cèl·lules animals en suspensió (Gámez·2000). Abans del seguiment de la impedància en cultius però, cal determinar com es realitzaran les mesures d'impedància per tal d'obtenir una mesura que permeti estimar la concentració cel·lular en els cultius de cèl·lules animals adherents amb la màxima fiabilitat possible. Per a fer-ho analitzarem més profundament els perfils teòrics de la impedància al llarg de la freqüència en presència de material biològic.

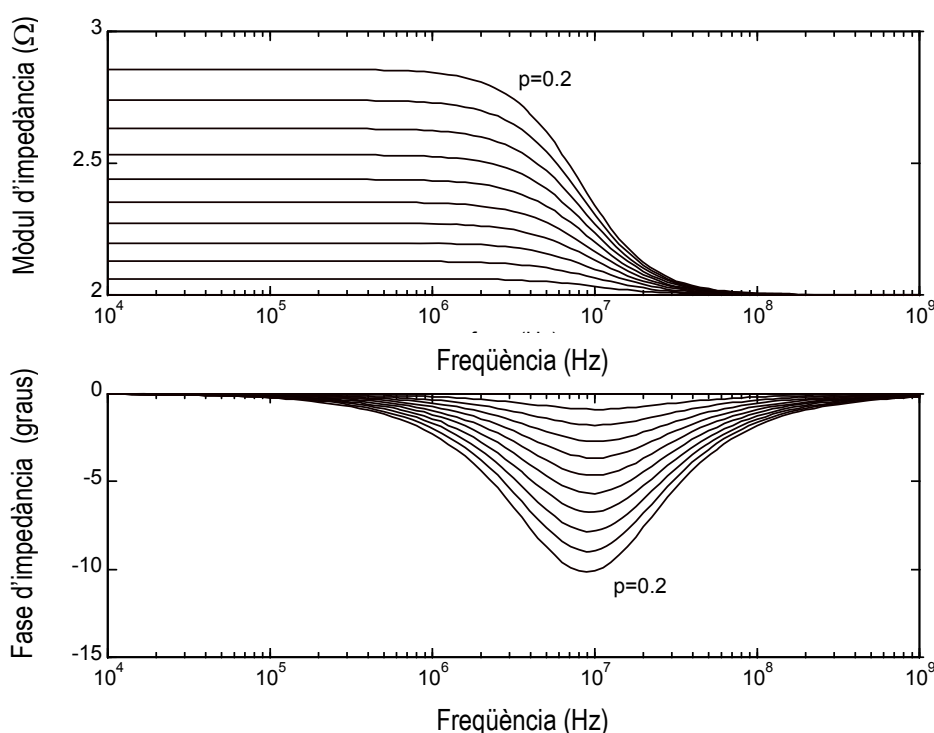


Figura 4.15 Efecte teòric de la fracció de volum cel·lular en el mòdul (superior) i en la fase (inferior) de la impedància mesurada en la zona de relaxació β . (Bragós·1997)

Com ja s'ha comentat anteriorment, la relaxació β depèn de la fracció de volum cel·lular i, per tant, depèn de la concentració cel·lular que hi hagi a la superfície de mesura. Aquesta dependència es pot observar a la figura 4.15, on es representa els valors de mòdul i de fase teòrics de la impedància per a un cultiu cel·lular en funció de la freqüència, a mesura que la fracció de volum cel·lular (p) es va augmentant de 0 a 0,2. D'aquesta manera, a mesura que augmenta la concentració cel·lular, el valor del mòdul de la impedància a baixa freqüència va augmentant, mentre que a freqüències altes es manté constant definint perfectament la relaxació a estudiar. Pel seu cantó, el valor de la fase de la impedància va disminuint en la

zona de freqüències de la relaxació assolint un mínim al valor de la freqüència corresponent a la freqüència central de relaxació en el model de Cole-Cole.

Aparentment, tal i com mostren les corbes d'impedància teòriques, un sola mesura del mòdul de la impedància realitzada a baixes freqüències es podria utilitzar per a l'estimació de la concentració cel·lular present en un cultiu. D'aquesta manera es pot obtenir un primer estimador de concentració cel·lular mesurant la variació percentual del mòdul de la impedància, a una determinada freqüència inferior a la freqüència central de relaxació ($|Z(BF)|$), respecte el valor obtingut en el moment inicial del cultiu ($|Z(BF)_0|$), tal i com s'expressa a l'equació 4.4.

$$|Z| = 100 \cdot \left(1 - \frac{|Z(BF)|}{|Z(BF)_0|} \right) \quad [\text{Eq. 4.4}]$$

Aquest estimador de concentració cel·lular, tot i tenir l'avantatge que es minimitza l'error de mesura que es sol obtenir en les mesures d'impedància situades en zones d'alta freqüència (normalment superiors a l'error obtingut a baixes freqüències), només es pot utilitzar quan les condicions ambientals es poden mantenir molt estables. Aquest fet es dona per la forta influència de la mesura d'impedància amb varis paràmetres, com poden ser la temperatura o bé la concentració d'ions entre d'altres. Mentre que en cultius cel·lulars la temperatura es manté constant, la concentració d'ions té unes variacions molt importants que poden comportar un error elevat a la mesura de la concentració cel·lular.

Aquest fet es degut que en els cultius de cèl·lules animals, la glucosa present en el medi es va consumint a causa del metabolisme de les cèl·lules, secretant làctic a la vegada. Com que la glucosa no és una molècula iònica i, per altra banda, el làctic sí que ho és, fa que la conductivitat del medi extracel·lular vagi augmentant al llarg del cultiu. Així, mentre el medi fresc té unes concentracions de 25mM de glucosa i de 0mM de làctic que atorguen al medi una conductivitat d'aproximadament 12,9 mS/cm, un medi exhaurit conté unes concentracions aproximades de 4mM i 25mM de glucosa i làctic respectivament, fent que la conductivitat pugi fins a aproximadament 13,6 mS/cm. A l'augmentar la concentració d'ions en el medi al llarg del creixement, s'afavoreix al pas del corrent i, per tant, s'obté que el valor de la impedància va disminuint.

És per aquesta raó que es fan servir estimadors de concentració cel·lular més robusts, com per exemple l'estimador de concentració cel·lular anomenat E_2 (Bragós:1997). Aquest estimador mesura la variació

percentual del mòdul de la impedància a una alta freqüència ($|Z(AF)|$), respecte el valor de mòdul obtingut a una baixa freqüència ($|Z(BF)|$), tal i com s'expressa a l'equació 4.5.

$$E_2 = 100 \cdot \left(1 - \frac{|Z(AF)|}{|Z(BF)|} \right) \quad [\text{Eq. 4.5}]$$

Aquests dos estimadors de concentració cel·lular poden ser utilitzats també per a valors de la fase de la impedància. En aquest cas, les mesures s'han de realitzar a freqüències properes a la freqüència central de relaxació i es relacionen amb la mesura al inici del cultiu pel primer estimador, o amb la mesura de la fase de la impedància a una freqüència suficientment allunyada de la freqüència central de relaxació pel cas de l'estimador de concentració cel·lular E_2 .

Per comprovar i mesurar l'error que comporta a ambdós estimadors aquesta variació en la concentració d'ions en el medi, s'han mesurat els perfils del mòdul de la impedància al llarg de la freqüència obtinguts per a mesures a 4 fils en medi de cultiu fresc i en medi de cultiu exhaurit, medi provinent del final d'un cultiu de cèl·lules *vero*. S'ha utilitzat el mateix muntatge experimental i les mateixes condicions que per a les mesures en solució salina, però aquest cop utilitzant els medis de cultiu fresc i exhaurit i configurant l'analitzador per a realitzar el promig de 10 mesures consecutives. Els escombrats d'impedància al llarg de la freqüència obtinguts, del qual se'n poden treure els valors dels dos estimadors de concentració cel·lular sense la influència de cap tipus de concentració cel·lular, es presenten a la figura 4.16.

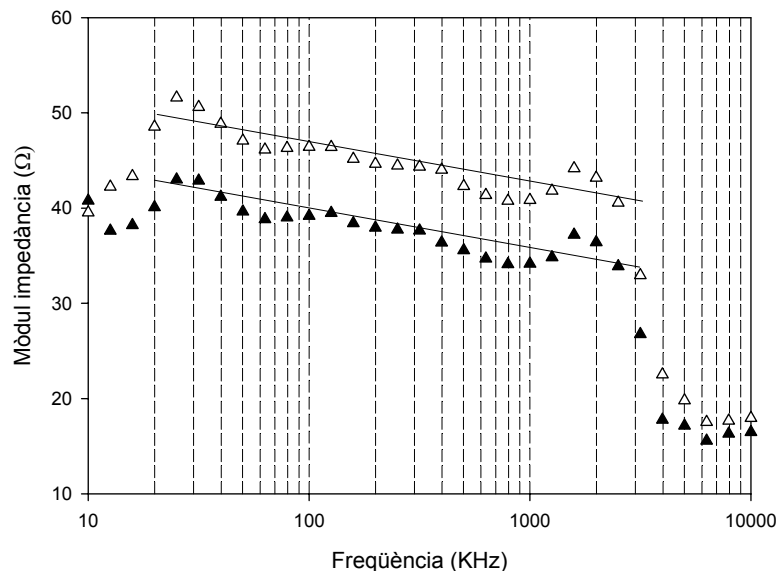


Figura 4.16 Variació del perfil del mòdul de la impedància al llarg de la freqüència des d'un medi fresc (Δ), corresponent al inici d'un cultiu, fins a un medi exhaurit ($\blacktriangle$), corresponent al final del cultiu. Determinació de la zona de freqüències amb la mesura lineal del mòdul de la impedància.

Prèviament a comprovar quin estimador de concentració cel·lular s'ha d'utilitzar pel seguiment de cultius cel·lulars, a partir de la figura 4.16 s'ha de determinar el rang òptim de freqüències per a la mesura de la impedància en medis de cultiu, i així comparar-los amb els obtinguts per a les mesures en solució salina, per lo que s'ha vist adequada la representació de les línies divisòries per a l'eix de la freqüència. Tal i com s'ha comentat anteriorment, si es té en compte que el perfil teòric d'un escombrat d'impedància per a un medi iònic sense cèl·lules, aquest no ha de presentar cap relaxació β , sinó que només ha de mostrar un lleuger descens continu del mòdul de la impedància al llarg de la freqüència.

Si s'observen els perfils reals obtinguts, es pot observar com la part central dels perfils del mòdul d'impedància s'adeqüen al perfil teòric, mentre que en els extrems del rang de mesura es pot observar com aquest descens queda truncat, tot i que part de l'error obtingut pot ser calibrable. Aquesta desviació del perfil teòric deixa com a rang de mesura les freqüències situades entre un valor mínim d'uns 20-30 kHz i a un valor màxim de 2-3 MHz, valors molt similars als obtinguts anteriorment per a la solució salina. Els valors escollits en aquest treball per la baixa freqüència i l'alta freqüència en la mesura de l'estimador de concentració cel·lular E_2 són de 30 KHz i 2 MHz respectivament.

Al calcular els estimadors de concentració cel·lular, s'obté que els valors de l'estimador E_2 pel medi fresc i pel medi exhaurit són de 9.0 i 8.9 % respectivament, mentre que els valors obtinguts de l'estimador $|Z|$ són de 100 i 84.2 % respectivament. Si es calculen els errors produïts pel canvi de conductivitat del medi de cultiu al llarg d'un creixement, s'obté un -1.5% per a l'estimador E_2 , error molt inferior a la variació de -15.8% obtinguda per a l'estimador $|Z|$. És per aquesta raó que l'estimador utilitzat a la pràctica en els cultius cel·lulars és l'estimador de concentració cel·lular E_2 , mentre que per a les simulacions, on la concentració iònica del medi no varia, s'utilitza l'estimador $|Z|$ evitant la necessitat de dependre de la mesura de la impedància a altes freqüències.

4.6 OPTIMITZACIÓ DE LA MESURA

Un cop s'ha determinat quin estimador de concentració cel·lular i com es realitzaran les mesures de la impedància en el seguiment de cultius cel·lulars i, prèviament al seguiment dels mateixos, és necessari comprovar la estabilitat i la fiabilitat de la mesura sense la influència del material biològic. Es fan necessàries aquestes comprovacions, per determinar si són adequades pel seguiment de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents i, d'aquesta manera, assegurar-nos que les variacions que obtenim en l'estimador de concentració cel·lular són degudes a la presència de cèl·lules adherides a la superfície activa dels microelèctrodes.

Per a dur a terme aquesta comprovació, s'ha efectuat un seguiment de l'estimador de concentració cel·lular E_2 de 3 ml de solució salina situats al mateix muntatge experimental de dins la placa petri i mantenint la temperatura ambient constant (a l'interior d'un incubador), on les mesures d'impedància s'han realitzat a 4 fils i cada 30 segons amb la configuració estàndard de l'analitzador d'impedàncies. Finalment, els resultats de l'estimador de concentració cel·lular s'han normalitzat respecte el valor inicial per a poder observar millor la estabilitat de la mesura. Els resultats del seguiment es poden observar a la figura 4.17.

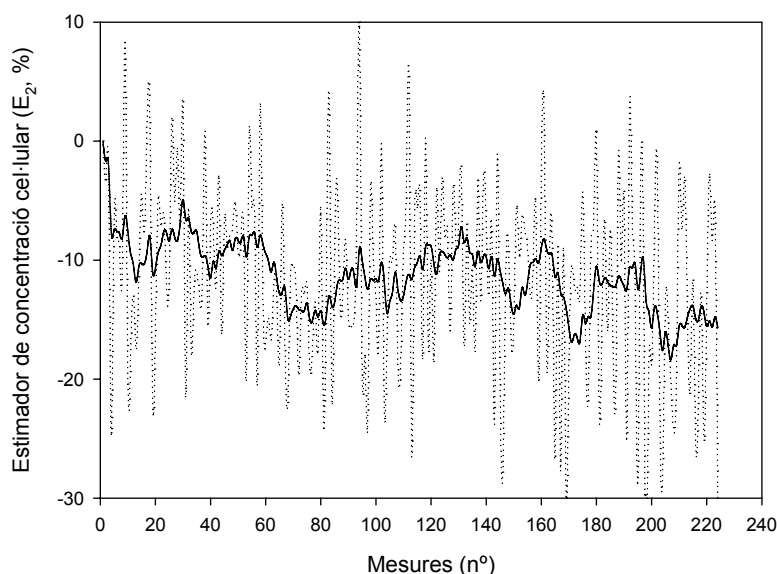


Figura 4.17 Seguiment de l'estimador de concentració cel·lular (E_2) al llarg del temps per a una solució salina. Al seguiment de les dades individuals de l'estimador de concentració cel·lular ($\cdots$), se'ls afegeix la representació del mateix perfil, però un cop se li ha efectuat un promig amb les 5 dades més properes ($—$).

Tot i que de les repeticions de l'experiment realitzades (tres repeticions, dades no mostrades) se'n mostra la que ha obtingut pitjors resultats (bastant similars entre elles), en termes generals es pot dir que l'estabilitat de la mesura de l'estimador de concentració cel·lular és molt dolenta, inclús després del filtratge de cada dada mitjançant un promig amb les 5 mesures més properes (línia contínua), obtenint una variació absoluta de l'estimador de concentració cel·lular de fins a 10 unitats (%), o amb una variació de 30 unitats amb les dades prèvies al filtrat.

A més de la problemàtica de la estabilitat de la mesura, també es pot observar amb els resultats representats a la figura 4.17 una deriva de la mesura al llarg del temps, bastant pronunciada inicialment (primeres 20 mostres) i que es va suavitzant a mesura que passa el temps. Amb aquesta deriva, la mesura de l'estimador de concentració cel·lular passa del valor inicial de l'estimador de 0 unitats (%) a rondar valors de -10 unitats un cop es porten 20-30 mesures, fins a rondar un valor de l'estimador de -15 unitats al

portar unes 200 mesures. Per tant, per a poder obtenir una mesura útil de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents a partir de mesures de bioimpedància, caldrà solucionar aquestes dues problemàtiques.

4.6.1 ESTABILITAT DE LA MESURA

Tal i com s'ha pogut observar, un sol filtratge basat en la realització d'un promig no és suficient per a obtenir una mesura prou estable, tot i que serveix per millorar-la significativament. Per tant, a partir d'aquest d'aquí s'afegirà la opció de fer un promig a partir de 5 mesures a la configuració de l'analitzador d'impedàncies.

Una altra de les problemàtiques de la mesura de la impedància realitzada en aquest muntatge, és la inestabilitat de la mesura de la impedància que es pot observar freqüentment en la majoria de les mesures realitzades amb aquest muntatge. Un exemple d'aquesta inestabilitat de la mesura de la impedància es pot observar en el seguiment de l'estabilitat en solució salina obtinguts anteriorment (figura 4.17), però agafant les dades anteriors al càlcul de l'estimador de concentració cel·lular, és a dir, els valors del mòdul de la impedància o els seus perfils al llarg de la freqüència.

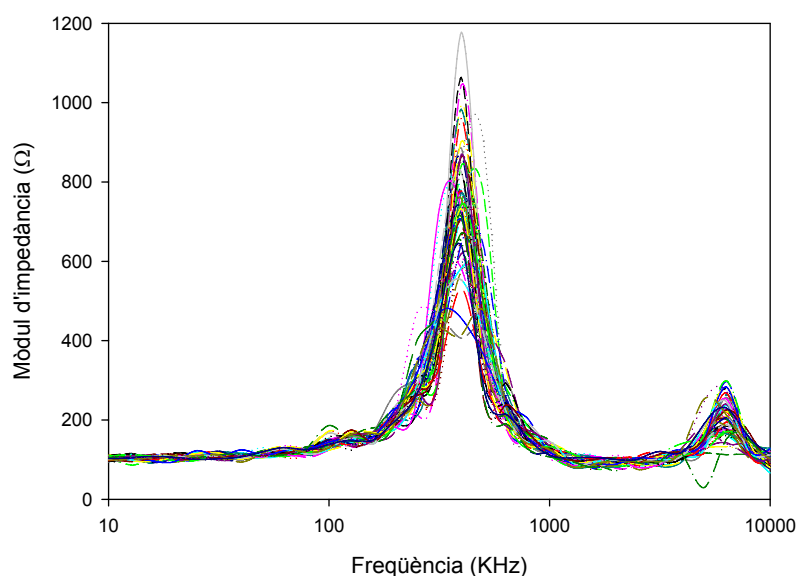


Figura 4.18 Exemple d'una mesura d'impedància amb errors. Perfils del mòdul de la impedància al llarg de la freqüència acumulats durant l'anterior experiment de determinació de l'estabilitat de la mesura en solució salina (figura 4.17).

Els perfils es troben representats a la figura 4.18, en els que es pot observar que, tot i que per a les baixes freqüències el mòdul de la impedància donen valors coherents respecte els perfils obtinguts en anteriors experiments (figura 4.14), a mesura que la freqüència de mesura es va augmentant es pot observar una

distorsió amb el màxim situat cap als 600 KHz que trunca els típics perfils descendents d'impedància teòrics (obtinguts en experiments anteriors), augmentant-ne fins a 10 vegades els valors esperats. Aproximadament als 8 MHz es pot observar una altra distorsió, encara que en aquest cas és menor i es troba situada fora del rang de freqüències determinat anteriorment. Aquests efectes que augmenten considerablement la impedància del sistema s'anomenen ressonàncies i són provocades per l'acció d'una capacitat connectada en sèrie al muntatge.

Per tant, per a poder aconseguir una bona estabilitat de la mesura, cal identificar la procedència de la inestabilitat mostrada per la mesura. El fet que el muntatge experimental contingui una ressonància causada per l'efecte d'un condensador en sèrie, indica que la problemàtica ha de provenir d'algun dels contactes pel que circula el corrent durant la mesura. A més, tenint en compte que només es veu afectat a unes determinades freqüències indica que aquest efecte es troba produït més per un contacte deficient que per alguna pista o cablejat tallat, en que el resultat seria un augment molt elevat del mòdul de la impedància al llarg de totes les freqüències de mesura. Dels diferents contactes que disposa el muntatge experimental, el que més probabilitats d'aportar problemàtiques pel que fa a connexions, és el connector de pinça utilitzat entre l'IME i el "front-end", que tot i ser el connector proporcionat pel fabricant dels IMEs, la seva utilització comporta la problemàtica que el contacte entre ambdós parts del muntatge depengui de la pressió aplicada a través d'una molla, tal i com es pot observar a la figura 4.19 (esquerra).

Aquests sistemes de connexions basats en sistemes mecànics tenen probabilitats elevades de fallar quan treballen sota condicions òptimes pel cultiu cel·lular (temperatura i humitats altes i amb unes durades llargues de les mesures), fent que només puguin ser utilitzats de forma provisional. Cal doncs, evolucionar el sistema de connexions evitant l'ús d'aquests tipus de connectors mecànics per un sistema de contactes elèctrics que sigui capaç de realitzar mesures durant llargs períodes de temps a aquestes condicions poc òptimes.

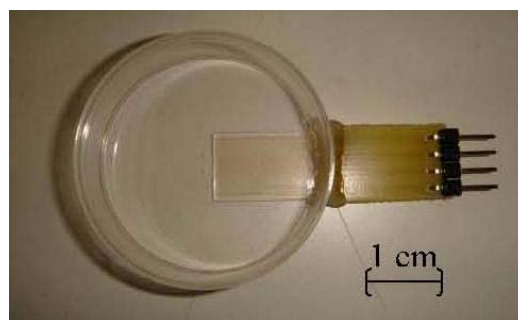
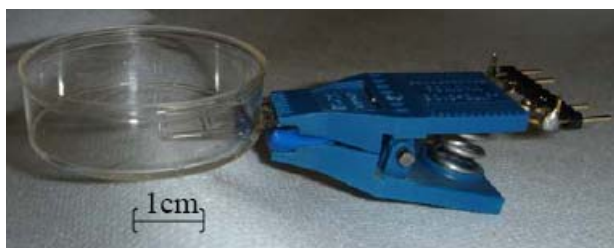


Figura 4.19 Evolució del muntatge dels microelèctrodes interdigitats a l'interior d'una placa petri, des de connectors per pinça (esquerra) a connectors de pintes (dreta), per a la millora de la robustesa en la mesura d'impedància.

L'evolució del connector realitzada (figura 4.19, dreta), es basa en la construcció d'una petita placa electrònica que comunica les pistes mare dels microelèctrodes de l'IME, que es troben adherides al circuit mitjançant una resina conductora, amb una pinta mascle de quatre pues que, un cop insertades a la corresponent femella, doten d'una bona robustesa al contacte entre els elèctrodes i el Front End. El protocol de muntatge dels IMEs a l'interior d'una placa petri, així com del sistema de connexions per pinces es troba descrit a l'apartat 8.7.6 de Materials i Mètodes.

Per comprovar, doncs, si aquest connector era el culpable de les connexions defectuoses i poder observar la millora en la estabilitat de la mesura aconseguida, s'han efectuat repeticions de l'anterior experiment del seguiment de l'estimador de la concentració cel·lular en solució salina i sense presència de material biològic, tant pel muntatge dels microelèctrodes mitjançant el nou connector de pintes, com per l'antic connector de pinça basat en sistemes mecànics. Els resultats per a ambdues configuracions del muntatge es poden observar a la figura 4.20.

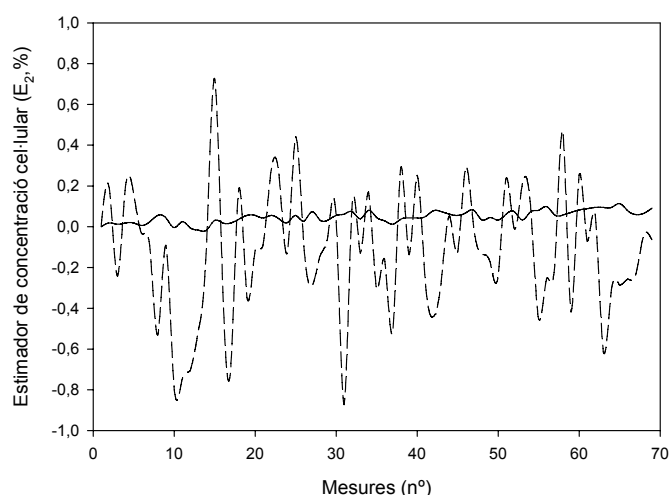


Figura 4.20 Comparació de la mesura de l'estimador de concentració cel·lular E_2 segons si s'utilitzen connectors per pinça (---) o connectors de pintes (—).

Tot i que les condicions s'han mantingut idèntiques a l'anterior experiment (temperatura constant a l'interior d'un incubador, 3 ml de solució salina...), l'analitzador ja ha estat configurat per a efectuar un promig de 5 mesures, tal i com s'ha decidit al inici d'aquest apartat. Amb els resultats obtinguts, queda palesa la millora en l'estabilitat de la mesura, reafirmant la hipòtesi de la presència d'un contacte defectuós que aportava una gran variabilitat a la mesura de la impedància i, per tant, a la mesura de l'estimador de concentració cel·lular.

Es pot observar doncs, que tot i que en aquesta repetició “només” s’ha obtingut una variabilitat màxima absoluta de l’estimador de concentració de casi 2 unitats de l’estimador (%), s’ha passat de tenir inicialment unes possibilitats elevades d’obtenir una variació absoluta de l’estimador de concentració de fins a 10% (figura 4.17,—) a obtenir al llarg del seguiment d’un cultiu cel·lular, a tenir una mesura estable amb una variació absoluta de menys de 0,2 unitats, unes 10 o 50 vegades menor respectivament.

4.6.2 FIABILITAT DE LA MESURA

El segon efecte problemàtic identificat en el seguiment de l’estimador de concentració cel·lular mitjançant mesures de la impedància (de les mesures representades anteriorment a la figura 4.17), es tractava d’una deriva en la mesura. Encara que es tingués una mesura robusta, quan es tracta de sistemes electrònics, s’ha de tenir en compte que poden haver-hi acumulacions de càrregues en algunes parts de circuits electrònics pels que passa el corrent que podrien ser causants d’un augment en la impedància del sistema.

En el muntatge experimental, les parts més susceptibles a aquesta acumulació de càrregues són tant el Front End, com les connexions que hi ha entre diferents parts del muntatge, en particular a la capacitat de la doble capa iònica dels elèctrodes. Per a solucionar aquest efecte, s’ha de proporcionar una sortida a terra per a la tensió que pogués quedar retinuda i així evitar la formació d’aquestes acumulacions.

Per tal de proporcionar aquesta sortida cap a terra, s’ha addicionat al sistema de mesura de la impedància un connector intermedi de pintes amb la presència d’un parell de condensadors situats al pas dels elèctrodes de mesura de la tensió en el cultiu cel·lular. Aquests condensadors es troben connectats al terra a través d’unes resistències que permeten l’alliberament de les possibles càrregues elèctriques acumulades, tal i com es pot observar a la figura 4.21, on es presenta una foto del connector en qüestió i el corresponent esquema de circuit electrònic.

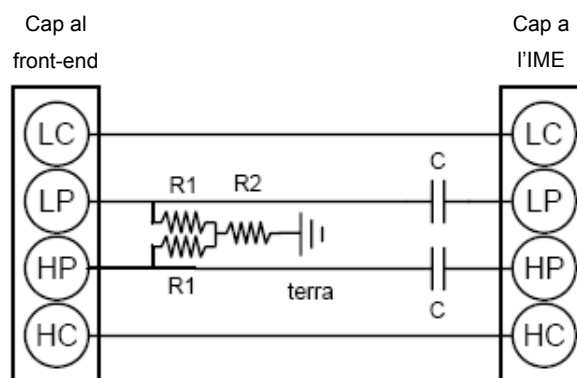
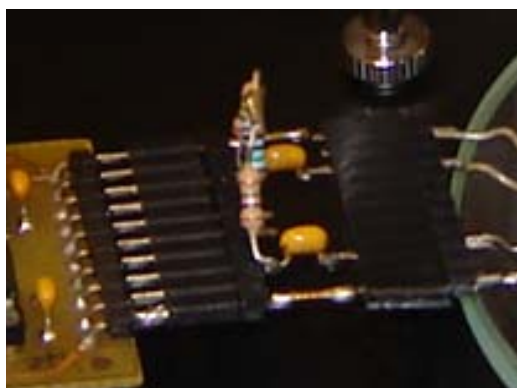


Figura 4.21 Foto (esquerra) i esquema (dreta) del circuit de condensadors entre els microelèctrodes i el Front End per minimitzar l’acumulació de càrregues i la conseqüent deriva en la mesura de concentració cel·lular. Les resistències utilitzades són molt més elevades que les impedàncies mesurades, per tal que no afectin a la mesura.

Per a poder determinar les millores obtingudes amb aquest connector amb sortida a terra, s'ha tornat a repetir el seguiment de l'estimador de la concentració cel·lular en solució salina i sense la presència de material biològic amb el muntatge evolucionat (amb el connector per pinça substituït ja pel connector de pintes), amb i sense la presència d'aquest connector amb sortida a terra. Les condicions utilitzades són les mateixes que en l'experiment anterior (temperatura constant, 3 ml de medi salí, promig de 5 dades...).

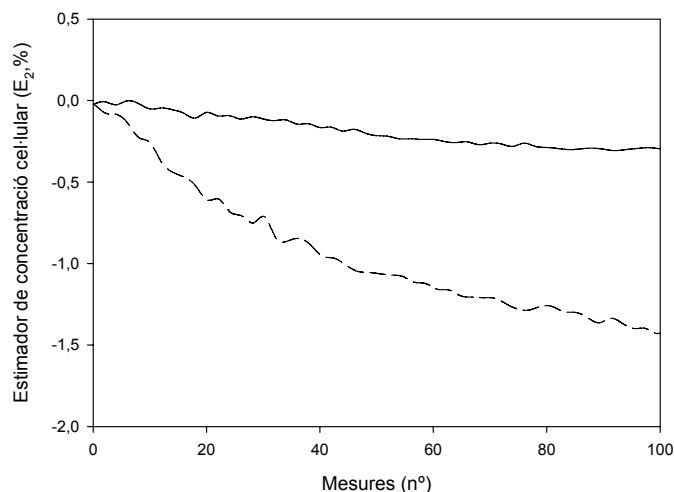


Figura 4.22 Evolució de la mesura de l'estimador de concentració cel·lular E_2 normalitzat per a configuracions de mesura sense el circuit de condensadors (---) i amb el circuit de condensadors (—).

Els resultats s'han representat a la figura 4.22 on es pot observar que, sense la presència del connector amb sortida a terra, hi ha una deriva a la mesura deguda a la acumulació d'aquestes càrregues en el sistema de mesura. Aquesta deriva, tot i disminuir el ritme durant els primers minuts, manté el mateix ritme a partir de la mesura 50, de manera que arriba a proporcionar una part bastant significativa en la mesura de la estimació de la concentració cel·lular, emmascarant els resultats.

Per altra banda, en el seguiment obtingut en presència d'aquest connector, es pot observar que tot i existir una petita deriva inicial durant els primers minuts, atribuïble a la formació de la doble capa iònica als elèctrodes, a partir de la mesura 70 s'estanca limitant-la a valors inferiors a 0,5 unitats de l'estimador (%) en la mesura de la concentració cel·lular.

Tot i que no s'ha pogut eliminar completament la deriva de la mesura, aquesta s'ha pogut disminuir significativament a l'hora que s'ha estancat per a que no augmenti al llarg del temps, fent que, juntament amb les millores aconseguïdes amb l'evolució del connector per pintes, es disposi d'una mesura amb una robustesa elevada.

4.7 EFECTES DEL SISTEMA DE CULTIU SOBRE LA MESURA D'IMPEDÀNCIA

Amb el canvi de les connexions per pintes en comptes de connectors de pinça, juntament la incorporació al sistema de mesura dels condensadors amb sortida a terra, s'ha aconseguit una mesura estable, robusta i fiable de la impedància en el muntatge de cultiu estàtic utilitzat pel desenvolupament de la mesura. El fet però, de necessitar un sistema de cultiu amb unes característiques diferents al sistema de cultiu estàtic utilitzats fins el moment, que permeti l'addició de diferents sondes per a la mesura de l'oxigen dissolt en el medi així com del pH i altres paràmetres de cultiu (sistema de minibioreactors, apartat 3.3), desemboca en la necessitat de realitzar les comprovacions de que aquestes noves característiques del sistema de cultiu no afectin massa negativament a les mesures d'impedància desenvolupades.

4.7.1 EFECTE DE L'AGITACIÓ DEL MEDI DE CULTIU

La primera d'aquestes noves característiques inherents al canvi en el sistema de cultiu que poden afectar negativament a la mesura de la impedància, recau en el fet de disposar d'un sistema d'homogeneïtzació del medi de cultiu basat en camps magnètics (fotografia a l'apartat 3.4, figura 3.9) que permeti la difusió de l'oxigen fins a la base del minibioreactor, zona a on es troben situades les cèl·lules que, a relacions de volum/superfície elevades, es troba limitada de suficient concentració d'oxigen produint un efecte inhibitori al cultiu (Gálvez·2006). Aquests camps magnètics, podrien crear petits corrents variables al circuit de microelèctrodes, provocant interferències que afectarien a la mesura de la impedància, que s'expressarien com un soroll en la mesura. Aquest soroll a la mesura de la impedància s'ha de quantificar per tal d'observar si l'estimació de la concentració cel·lular es veu emmascarat de manera significativa.



Figura 4.23 Fotografia del muntatge experimental per a la realització de mesures d'impedància a l'interior d'un sistema de cultiu en minibioreactor. A l'esquerra trobem el minibioreactor modificat amb els microelèctrodes situats a la superfície de cultiu i a la dreta trobem la tapa que conté un pèndol magnètic per a l'agitació del medi.

Per a la quantificació del soroll provinent de l'agitació del sistema de cultiu en minibioreactors, s'ha realitzat un muntatge on s'han incorporat els microelèctrodes a l'interior del sistema de cultiu en minibioreactor, utilitzant els mateixos components i mateix protocol de muntatge que per a la incorporació dels microelèctrodes en l'interior d'una placa petri, protocol que inclou totes les evolucions efectuades fins en aquest moment en aquest capítol. El muntatge obtingut es pot observar a la figura 4.23.

Amb aquest nou muntatge experimental en el sistema de minibioreactors ja es pot mesurar la magnitud de les interferències obtingudes a través del seguiment de la impedància a 4 fils (estimador E_2), de 3 ml de solució salina sense la presència de cèl·lules i mantinguts a temperatura constant a l'interior d'un incubador, mentre que la configuració de l'analitzador es manté dels experiments anteriors (condicions estàndards més el promig de 5 dades consecutives). Per a determinar l'efecte de l'agitació sobre la mesura de la impedància, s'han iniciat les mesures amb una agitació constant de 150 rpm durant les 10 primeres mesures (equivalent a 10 minuts), moment en que l'agitació es desconnecta per complet.

Els resultats obtinguts de l'estimador de concentració cel·lular normalitzats respecte la primera mesura realitzada es poden observar a continuació a la figura 4.24, a la que s'ha mantingut la mateixa escala que en les mesures d'estabilitat en el sistema de cultiu estàtic (placa petri) modificada amb la inserció dels microelèctrodes (figura 4.20, —) per, d'aquesta manera, facilitar-ne la seva comparació.

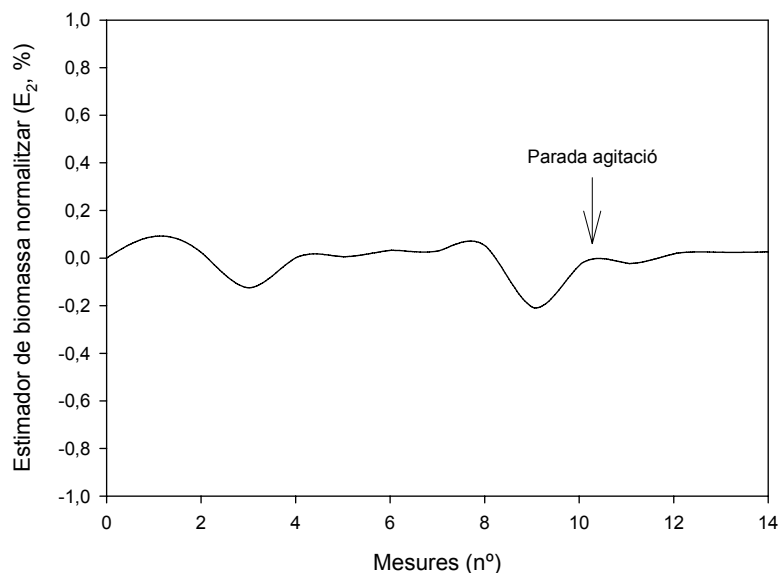


Figura 4.24 Efecte de l'agitació pendular del sistema de cultiu en la mesura de l'estimador de concentració cel·lular E_2 normalitzat.

Es pot observar doncs, que durant l'agitació del medi salí existeix un soroll de magnitud màxima lleugerament inferior a 0,4 unitats de l'estimador (%), soroll que disminueix un cop es desconnecta l'agitació per a passar a una variació màxima inferior a 0,2 unitats, la mateixa variació obtinguda anteriorment pel sistema de cultiu en placa petri.

Tot i obtenir doncs un augment del soroll en la mesura de l'estimador de la concentració cel·lular respecte a mesures sense l'efecte produït per interferències degudes a l'agitació del medi, aquestes interferències no suposen un descontrol de la mesura de la impedància i continuen essent bastant petites per lo que es pot concloure, a falta de comprovar encara quina és la variació de l'estimador de concentració cel·lular deguda al propi creixement, que la mesura de la impedància no és incompatible amb l'agitació del sistema de cultiu mitjançant sistemes basats en camps magnètics.

4.7.2 EFECTE DEL VOLUM DE MEDI DE CULTIU

El segon factor no es refereix a una característica del nou sistema de cultiu, sinó a l'efecte d'evaporació del medi de cultiu, efecte degut al corrent d'aeració per mantenir un pH adequat i una concentració d'oxigen suficient pel cultiu cel·lular i que pot fer que el volum de medi a l'interior d'un minibioreactor disminueixi dels 13 ml inicials (volum estàndard pel cultiu en els minibioreactors utilitzats) fins a un mínim de 10 ml al llarg d'un cultiu cel·lular (Soley·2010).

Aquest factor s'ha de tenir en compte en la mesura de la impedància en cultius de cèl·lules animals adherents, ja que al variar el volum de medi en els cultius degut a efectes d'evaporació, varia també l'alçada de líquid per sobre els microelèctrodes de mesura, engegant una cascada d'efectes. Al canviar l'alçada de líquid, canvia també l'àrea transversal de pas del corrent i, per tant, s'està variant la impedància relacionada amb el medi iònic i amb ella també varien els valors finals de l'estimador de concentració cel·lular. Així, com més volum de medi hi hagi, més àrea es troba disponible pel pas del mateix corrent i, per tant, més facilitat tindrà per a traspasar el corrent disminuint el valor de la impedància i, per tant, com més s'evapori el medi, menys àrea es troba disponible pel pas del mateix corrent, fent que el valor de la impedància augmenti al tenir més dificultats per a fluir a través del líquid, de manera que la variació de volum obtinguda pot emascarar els valors de l'estimador de concentració cel·lular.

Per motius físics (hi ha major densitat de corrent a la proximitat dels elèctrodes que en les zones més allunyades d'ells), aquest efecte va perdent importància fins que es torna menyspreable a mesura que es va augmentant l'alçada, ja que com més alçada de medi trobem sobre els microelèctrodes, menys influència té qualsevol variació de volum sobre el flux del corrent. Per tant, per a poder determinar si el

l'efecte d'evaporació del medi pot afectar significativament un cultiu cel·lular dut a terme a l'interior d'un minibioreactor s'ha mesurat la variació percentual de l'estimador de concentració cel·lular segons el volum de medi utilitzat.

Per a la mesura de l'estimador de concentració cel·lular segons el volum de treball, s'han utilitzat 12 ml de solució salina que s'han mantingut a temperatura constant a l'interior d'un incubador i dels que se n'ha anat enretirant 2 ml gradualment a cada mesura. La configuració de l'analitzador d'impedàncies utilitzada és la estàndard més l'opció del promig de 5 mesures i el procés ha estat repetit 3 vegades per a obtenir un valor de variació més precís. Finalment, per observar millor la variació obtinguda per culpa de l'evaporació i disminució del medi, l'estimador de concentració cel·lular s'ha normalitzat respecte el valor de l'estimador per a un volum de 12 ml. El perfil de la variació de l'estimador respecte el volum de medi es mostra a la figura 4.25.

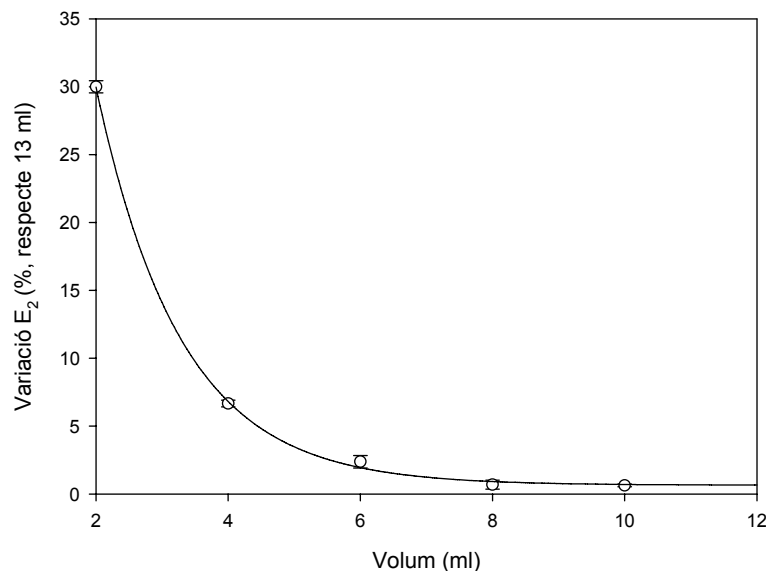


Figura 4.25 Variació relativa de l'estimador de concentració cel·lular E_2 en funció del volum de cultiu romanent, per determinar l'efecte d'evaporació del medi obtingut pel sistema de cultiu en minibioreactor. La variació es calcula respecte la mesura de l'estimador amb 12 ml de medi.

A la vista dels resultats, es pot observar que una evaporació del medi que faci variar el volum des de 13 fins a 10 mil·lilitres no suposa una gran variació del valor de l'estimador de concentració i aquest efecte no seria significatiu fins que l'evaporació reduís el volum de medi per sota de 8 mil·lilitres. Per altra banda, la variació obtinguda per a volums petits (tal i com es treballa amb els sistemes de cultiu estàtics), és bastant elevada, fent que una variació petita de volum es transformi en una variació gran de l'estimador de concentració cel·lular (passar de 4 a 2 ml significa una variació de més del 20% de l' E_2).

Per tant, si es treballa a un volum de treball de 13 ml i la evaporació del medi és la mateixa que la obtinguda pels cultius de cèl·lules animals en suspensió (Soley·2010), aleshores es disposa d'un marge suficientment gran (pel que fa a reducció del volum de treball) per a la obtenció d'una mesura d'impedància lliure de sorolls deguts als efectes d'evaporació existents.

4.8 CARACTERITZACIÓ BIOLÒGICA DELS MICROELÈCTRODES

Un cop disposem d'un sistema adequat per a la estimació de la concentració cel·lular a partir de la mesura de la bioimpedància, amb una mesura estable, fiable i amb els errors acotats, i també disposem de les característiques de treball a utilitzar per a optimitzar-ne el seu funcionament, s'ha de determinar si aquest sistema compleix una sèrie de requisits necessaris per a que es pugui dur a terme en cultius de cèl·lules adherents, tal i com s'ha fet en el capítol anterior durant el canvi cap al nou sistema de cultiu cel·lular (els minibioreactors, apartat 3.3.1). Aquests factors que s'han de tenir en compte són bàsicament dos, el primer dels quals és que el muntatge utilitzat sigui biocompatible i, per tant, que no presenti cap tipus de toxicitat que variï el creixement normal dels cultius de cèl·lules animals adherents obtingut en altres sistemes de cultiu comercials. El segon dels requisits és que el creixement que es dona a terme a la superfície de creixement dels microelèctrodes, superfície de creixement a on es realitza la mesura de la bioimpedància, ha d'ésser semblant al creixement obtingut a la resta de superfície de cultiu del sistema de cultiu, ja que sinó no obtindríem una mesura representativa del creixement que s'estigui realitzant al sistema de cultiu.

4.8.1 BIOCOMPATIBILITAT DEL MUNTATGE DE MESURA

El primer factor a tenir en compte, és la biocompatibilitat del sistema, on no només hi ha la necessitat de que el sistema no tingui una activitat tòxica per a les cèl·lules, sinó que se'ls ha de minimitzar qualsevol deterioració de les funcions cel·lulars que derivés cap a una velocitat de creixement més lenta o un augment considerable de la fase de latència.

Tot i que els materials utilitzats per a la construcció dels muntatges dels microelèctrodes a l'interior d'un minibioreactor presenten propietats de biocompatibilitat segons els fabricants, aquestes propietats han de ser comprovades. Per a comprovar-ho i, tal i com ja s'ha escollit i exposat en les proves de biocompatibilitat realitzades anteriorment pel sistema de cultiu, la línia cel·lular amb la que es treballarà per a realitzar aquestes proves de biocompatibilitat és la línia cel·lular *vero*, ja que a més a més de ser una línia àmpliament utilitzada per la producció de virus i varies proteïnes, és també una línia cel·lular adherent bastant robusta i amb una velocitat de creixement elevada, que permet la obtenció d'uns resultats fiables en uns temps de cultiu curts.

Per a la determinació de la biocompatibilitat del sistema de mesura de bioimpedància, s'ha efectuat el seguiment en línia de l'estimador de concentració cel·lular en un cultiu de cèl·lules *vero*, mentre que per a realitzar la comparació d'un creixement tipus de cèl·lules animals adherents, s'han efectuat mesures fora de línia de la concentració cel·lular de creixements paral·lels (2 pous per punt) en plaques de 6 pous (sistemes de cultiu comercials).

L'estimador s'ha mesurat a 4 fils i amb la configuració estàndard de mesura més l'opció del promig de 10, amb les mesures efectuades cada 15 minuts. Les característiques de cultiu utilitzades són que els creixements s'han realitzat en un incubador a 37°C, 95% d'humitat i amb una atmosfera d'aire amb 5% de CO₂, el medi de cultiu utilitzat és MEMG amb un 10% de FBS, la concentració cel·lular al inici dels cultius és de 10⁴ cèl·lules/cm² i s'ha mantingut una relació de volum per superfície de 1/3 ml per cm² (3 ml de cultiu).

Tot i trobar-se dins de la zona de màxima influència de la mesura d'impedància deguda a variacions de volum, l'evaporació de medi és mínima al realitzar-se el creixement a l'interior d'un incubador i, a més, al no poder treballar a volums de 13 ml o més de medi en plaques de 6 pous i que les característiques de treball s'han de mantenir constants per a ambdós sistemes de cultiu per a poder obtenir uns resultats comparables, fan que s'hagi de portar el cultiu de cèl·lules animals adherents en el minibioreactor a aquests volums de treball de sistemes de cultiu estàtics (3 ml de medi).

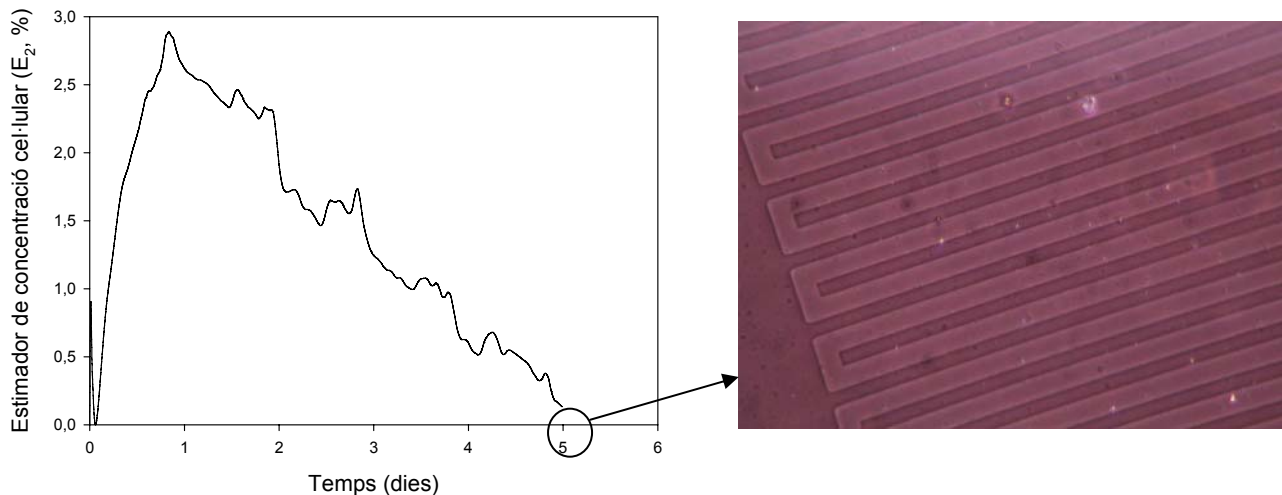


Figura 4.26 Evolució de l'estimador de concentració cel·lular E₂ normalitzat, en un cultiu cel·lular realitzat en els muntatges dels microelèctrodes sense cap tipus de neteja (esquerra). Foto dels microelèctrodes per a la corroboració òptica de la mort del cultiu, causada per la presència d'una substància tòxica (dreta).

Els resultats del seguiment de l'estimador de concentració cel·lular al llarg del cultiu de cèl·lules *vero*, normalitzat respecte el valor de l'estimador al inici del cultiu, es poden observar a la figura 4.26, on el valor

de l'estimador de concentració cel·lular va augmentant durant el primer dia i, per tant, les cèl·lules es van adherint i creixent a la superfície del microelèctrode, però a partir d'aquest moment, el creixement es veu truncat i les cèl·lules es van desadherint a causa de la seva mort, retornant el valor de l'estimador de concentració cel·lular cap a valors nuls de concentració. Al cinquè dia de cultiu es decideix aturar el cultiu i, per acabar de comprovar-ne la mort del cultiu cel·lular es realitza una foto als microelèctrodes (figura 4.26, dreta), on s'observen només petits fragments cel·lulars anomenats "debris", sense senyals de cèl·lules vives.

Per altra banda, mentre que al creixement mesurat es produeix la mort cel·lular, a partir dels controls realitzats fora de línia en creixements paral·lels dins de les plaques de 6 pous, s'obté un creixement cel·lular amb tota normalitat i aliè a la mort cel·lular obtinguda en el creixement monitorat, tal i com es mostra a continuació a la figura 4.27.

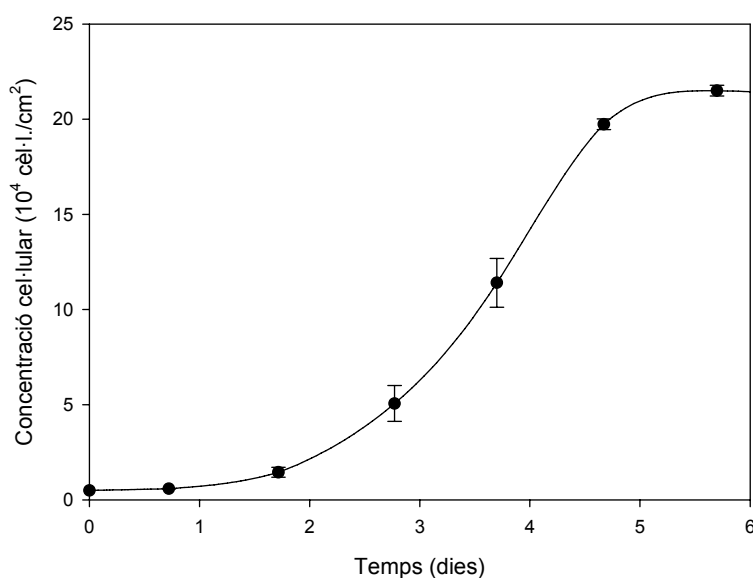


Figura 4.27 Evolució dels controls fora de línia en un cultiu de cèl·lules *vero* realitzat en plaques de 6 pous, sense la presència de cap substància tòxica.

Aquest fet, a més a més de reafirmar la importància de poder substituir el control dels cultius de cèl·lules adherents actuals, mitjançant mesures de creixements paral·lels externs, per una mesura en línia que permeti assabentar-se del que està passant al mateix cultiu, indica la presència d'una substància tòxica.

Aquesta substància tòxica pot provenir de diferents parts del muntatge utilitzat per a la mesura de la bioimpedància. Els materials utilitzats per a la fabricació dels muntatges de mesura són:

- Els minibioreactors. Són el sistema de cultiu a partir del qual es modifica per a la incorporació del sistema de mesura de la impedància, però no poden ser els causants de la toxicitat ja que aquesta biocompatibilitat ja està comprovada amb anterioritat durant l'apartat 3.3.1.

- Els microelèctrodes. Són els elèctrodes a través dels quals s'efectuen les mesures de la impedància, i podrien ésser els possibles causants de la toxicitat present en el muntatge que, tot i estar pensats per a aplicacions cel·lulars (Abtech Scientific), poden necessitar d'algun tipus de tractament de neteja i activació previ a la seva utilització.

- La silicona. S'utilitza per assegurar la estanquitat del muntatge de mesura i, a la vegada, per a l'aïllament de les diferents pistes mare dels microelèctrodes. Tot i ser biocompatible segons el propi fabricant, la silicona podria ésser la causant de la toxicitat a partir de la solubilització d'algun dels seus components, com en podrien ser restes de dissolvent o de cadenes curtes presents i que poguessin quedar soltes en el muntatge durant el cultiu cel·lular.

- La resta de components del muntatge per a la mesura de la concentració cel·lular. Cap d'aquests en pot ésser el causant de la toxicitat, ja que es troben situat a l'exterior del sistema de cultiu i per tant, són aliens al creixement cel·lular.

Així doncs, tenim dues possibles causants de la toxicitat, la falta de tractament dels microelèctrodes i, el més probable, la presència de restes de dissolvent i de cadenes curtes de la silicona. Per tal de comprovar si aquestes restes en són els causants de la toxicitat, s'han realitzat diferents neteges simples al muntatge experimental per arrossegar-les fora del sistema de cultiu. Aquestes neteges es basen en un rentat puntual amb aigua mili-Q per aconseguir una neteja senzilla de les superfícies de creixement per una banda, mentre que l'altra neteja es basa en deixar el muntatge submergit en aigua mili-Q durant 4 dies (amb canvis periòdics de l'aigua) per tal d'aconseguir una neteja més completa i eliminar qualsevol resta de dissolvent o cadena curta que quedés present en la silicona.

Per tal de comparar els efectes que s'han obtingut amb les neteges realitzades, s'ha efectuat el seguiment de la concentració cel·lular d'un creixement de cèl·lules *vero* mitjançant mesures fora de línia de creixements paral·lels per a cada un dels muntatges amb les diferents neteges (2 muntatges per punt de concentració cel·lular) i s'han comparat amb els perfils de creixement de creixements paral·lels de cèl·lules *vero* en plaques de 6 pous (2 pous per punt de concentració cel·lular).

Les característiques de cultiu s'han mantingut idèntiques a l'experiment anterior de biocompatibilitat, excepte per a la concentració inicial que s'ha doblat a $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² per a disminuir els possibles temps de latència, així com també el temps de cultiu necessari per arribar a confluència i, per tant, la quantitat de muntatges experimentals necessaris que augmentaria innecessàriament el preu de l'experiment (el preu dels IMEs és bastant elevat).

Els perfils de concentració cel·lular obtinguts pels diferents creixements s'han representat a continuació a la figura 4.28, on es pot observar que els tres creixements segueixen un mateix perfil fins al segon dia de cultiu, moment en que s'observa clarament que el perfil de creixement obtingut pels muntatges amb una neteja puntual no pot seguir el mateix ritme de creixement que en els perfils de creixement obtinguts tant per la neteja més completa, com pels creixements obtinguts en els sistemes estàtics de cultiu comercials.

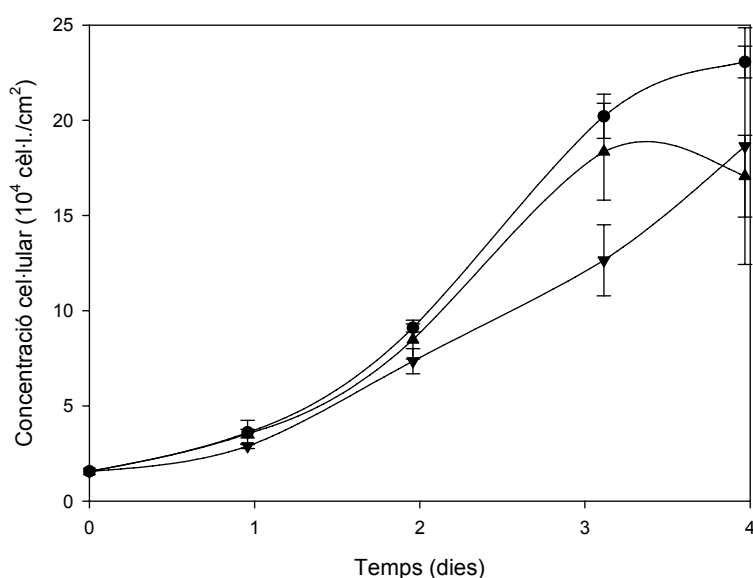


Figura 4.28 Comparació dels creixements cel·lulars obtinguts per a les diferents neteges realitzades als muntatges dels microelèctrodes. Al creixement control en plaques de 6 pous (●) se'l compara amb el creixement obtingut sobre muntatges netejats amb aigua mili-Q durant 4 dies (▲) i amb el creixement obtingut sobre muntatges amb només un rentat puntual amb aigua mili-Q (▼).

En canvi, pel que fa al perfil de creixement dels muntatges als que se'ls ha efectuat la neteja completa durant 4 dies, es pot observar que no es separa significativament del perfil obtingut pels creixements en plaques de 6 pous fins que el cultiu ja no es troba en la fase exponencial de creixement, aproximadament als 3 dies de cultiu. Per tal d'observar millor l'efecte de les neteges durant la fase exponencial i poder quantificar les diferències respecte el creixement obtingut en els sistemes de cultiu comercial, s'han calculat les velocitats de creixement durant la fase exponencial i els corresponents temps de duplicació resultants per a cada tipus de neteja efectuada, trobant-se resumits a la taula 4.1.

Taula 4.1 Comparació de les velocitats de creixement i temps de duplicació obtinguts, tant per a les diferents neteges realitzades als muntatges dels microelèctrodes com pel sistema de cultiu comercial (placa de 6 pous).

Cultiu cel·lular	μ (d ⁻¹)	t_{dup} (dies)
Sistema de cultiu comercial	0.83	20.0
Muntatge: neteja completa	0.80	20.8
Muntatge: rentat puntual	0.64	26.0

Tal i com es pot observar si es comparen les velocitats específiques de creixement per a les diferents neteges efectuades, tot i que per els muntatges amb una neteja puntual ja no es produeix una mort del cultiu tal i com s'obtenia pel muntatge sense cap tipus de neteja (figura 4.26), la variació obtinguda entre aquest muntatge i el valor de velocitat de creixement pels creixements en sistemes comercials de cultiu és d'un 23%, un valor de variació bastant elevat que indica que el cultiu encara es troba influenciat per la toxicitat d'algun component.

Per altra banda, la variació de la velocitat de creixement que s'obté entre els muntatges als que s'ha aplicat la neteja completa durant els 4 dies i els sistemes de cultiu comercials és solsament d'un 4%, una variació que es pot considerar menyspreable al tractar-se de material biològic, ja que aquests materials ja es troben subjectes a variacions elevades, inclús en rèpliques idèntiques de l'experiment.

Així doncs, tot i que una neteja puntual dels muntatges serveix per millorar la toxicitat mostrada en anterioritat, encara es pot observar que hi ha factors que disminueixen el ritme de creixement dels cultius, fent que aquesta neteja dels muntatges no sigui adequada per a la mesura de la impedància en cultius cel·lulars. Per altra banda, aquests factors desapareixen quan la neteja que es realitza als muntatges és més extensa, com la realitzada durant 4 dies, fent que els creixements obtinguts siguin pràcticament comparables als que s'obtenen en superfícies de cultiu comercials, com les plaques de 6 pous.

Finalment, per comprovar la correcta adherència de les cèl·lules a les diferents superfícies del muntatge al que s'ha realitzat la neteja completa de 4 dies, es van efectuar fotos de les diferents superfícies dels muntatges al final dels creixements realitzats anteriorment, per tal de poder observar l'adhesió de les cèl·lules a les corresponents superfícies. Les fotos es mostren a continuació a la figura 4.29.

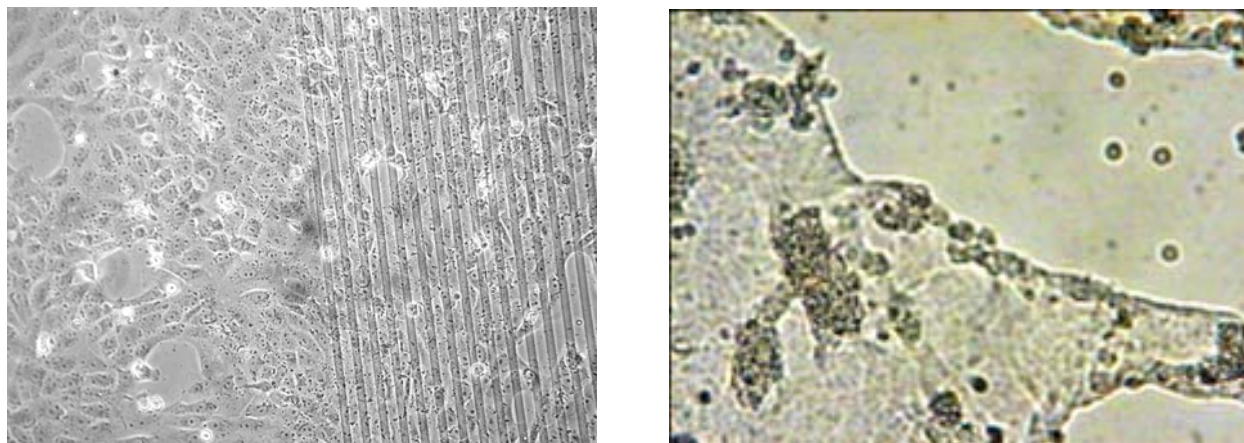


Figura 4.29 Fotos de les cèl·lules *vero* adherides sobre els microelèctrodes de l'IME (esquerra) i a la interfase entre la silicona (dreta, zona sense cèl·lules) i el fons del minibioreactor (dreta, zona amb cèl·lules).

A la foto de l'esquerra, es pot observar com les cèl·lules es troben perfectament adherides a la superfície de l'IME a on es troben dipositades les xarxes de microelèctrodes. A partir de la foto de la dreta, on es pot observar entre les zones amb presència i absència de silicona, es pot observar tot i que no s'arriben a ancorar a sobre la superfície de la silicona, es permet perfectament l'adhesió de les cèl·lules a les zones annexes sense presència de la silicona. A més, com que la silicona només es troba situada sota de l'IME i en els laterals del sistema de cultiu, la seva utilització amb la pertinent neteja no perjudicarà el cultiu de cèl·lules adherents.

4.8.2 CARACTERITZACIÓ DEL CREIXEMENT SOBRE ELS IMEs

Tal i com s'ha comentat anteriorment, un cop comprovada la biocompatibilitat del sistema de mesura de la impedància, el següent requisit per a poder utilitzar els muntatges dels IMEs per a la mesura de la impedància en cultius cel·lulars és que els creixements mesurats en els muntatges experimentals siguin representatius dels creixements obtinguts als sistemes de cultiu comercials.

Tot i que anteriorment ja s'ha demostrat que els creixements obtinguts en el minibioreactors són semblants als creixements control en plaques de cultiu, encara s'ha de comprovar aquesta similitud a sobre de la superfície de mesura, on es troben dipositades les xarxes de microelèctrodes pel seguiment de la impedància, ja que el creixement que serà monitorat és el que es dona sobre aquesta superfície i no en la superfície del minibioreactors.

Per a comprovar aquesta similitud, s'ha efectuat el seguiment de la concentració cel·lular d'un creixement de cèl·lules *vero* sobre el suport de vidre dels microelèctrodes, microelèctrodes tractats amb el protocol complet de neteja durant 4 dies, per a poder-lo comparar amb el seguiment de la concentració cel·lular del

mateix creixement, però aquest cop a sobre la superfície de creixement de plaques de 6 pous. Aquests seguiments dels creixements s'han efectuat mitjançant la tripsinització i el posterior recompte fora de línia de la concentració cel·lular de varis cultius paral·lels.

Les característiques de cultiu s'han mantingut idèntiques a l'experiment anterior, mentre que els recomptes de concentració cel·lular s'han realitzat per duplicat i cada 24 hores. Altra vegada i per a evitar que el preu de l'experiment augmenti innecessàriament (el preu dels IMEs és bastant elevat), només s'han efectuat suficients cultius paral·lels pel seguiment de la concentració cel·lular durant 4 dies de cultiu.

Els resultats dels seguiments es troben representats a la figura 4.30, on es poden observar tant els valors de concentració cel·lular pels creixements realitzats en ambdues superfícies de cultiu, com els ajusts corresponents a un creixement exponencial.

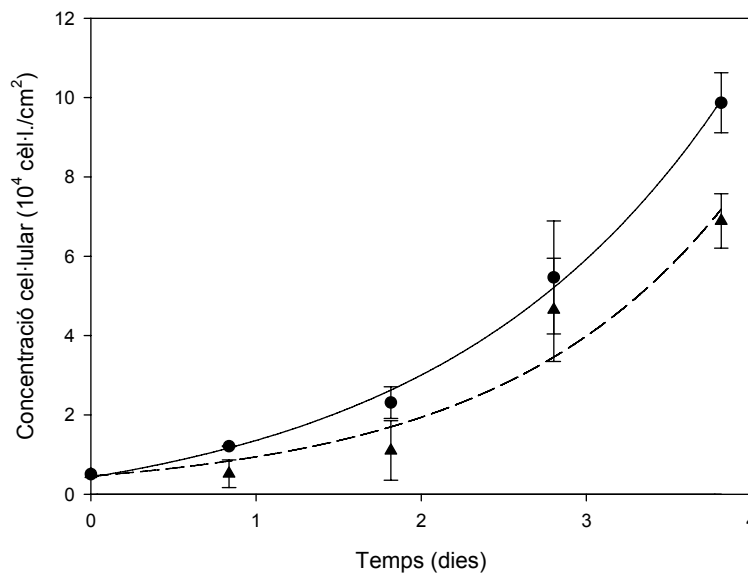


Figura 4.30 Comparació de la zona de creixement exponencial a les diferents superfícies de creixement existents als muntatges dels microelèctrodes. Es compara el creixement control obtingut sobre plaques de 6 pous (●) amb el creixement obtingut sobre el suport de vidre dels microelèctrodes (▲) juntament amb els seus ajusts exponencials, (—) i (---) respectivament.

Es pot observar en els creixements, que la concentració inicial dels cultius no ha arribat al valor teòricament inoculat de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², fent que al cap dels 4 dies de cultiu, els creixements encara no es trobessin a confluència. Tot i que es podrien haver realitzat els recomptes de concentració cel·lular en intervals de temps més espaiats, s'ha considerat oportú mantenir els intervals de 24 hores i, d'aquesta manera, obtenir el màxim de punts durant la fase exponencial dels cultius, ja que és la zona del creixement a on es mesura la velocitat màxima de creixement, essent el paràmetre clau per a la comparació dels diferents creixements.

Un altre fet que es pot observar en la figura 4.30, és que l'error obtingut a l'analitzar fora de línia la concentració cel·lular a la superfície dels microelèctrodes és superior al que s'ha obtingut en els creixements efectuats en sistemes de cultiu comercial, però aquest fet es degut bàsicament a que la superfície de creixement d'un IME és molt més petita, fent necessari el fet d'afegir un pas de concentració extra de les cèl·lules tripsinitzades per poder realitzar el recompte cel·lular mitjançant un hemacitòmetre, tot i que a la vegada que se n'augmenta la variabilitat dels resultats obtinguts.

Tot i aquest error intrínsec en la mesura de la concentració cel·lular, si es mesuren les velocitats màximes de creixement per a les dues superfícies de cultiu, obtenim uns valors de 0,78 i 0,72 d⁻¹ respectivament pels creixements sobre la superfície dels sistemes comercials de cultiu i sobre la superfície dels microelèctrodes. D'aquesta manera, la variació entre els dos creixements equival a 7.5%, error bastant petit a l'hora de treballar en cèl·lules animals, ja que, per exemple, si es mesura la variació de les velocitats màximes de creixement en els sistemes de cultiu comercials obtingudes entre aquest experiment i l'anterior (0,78 i 0,83 d⁻¹), aquesta és del 6%.

Per tant, es pot considerar que el creixement obtingut sobre la superfície de cultiu dels microelèctrodes i, per tant, el creixement monitorat a partir de la mesura de la bioimpedància, és representatiu del creixement que s'obté sobre la superfície de cultiu dels sistemes comercials com, per exemple, les plaques de 6 pous.

4.9 MONITORATGE DE CULTIUS CEL·LULARS

Un cop s'han solucionat tots els factors que influenciaven la mesura de la impedància i, per tant, s'ha aconseguit una mesura robusta i fiable de l'estimador de concentració cel·lular, ja es poden realitzar proves de seguiments de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules per, d'aquesta manera, observar-ne les propietats de la mesura de l'estimador de concentració cel·lular per a que aquesta pugui ésser validada.

D'aquestes propietats la que més en destaca és la sensibilitat de la mesura, però també se n'ha de tenir en compte d'altres com la fiabilitat de la mesura al llarg d'un cultiu de varis dies de durada, el calibrat de la mesura respecte la concentració cel·lular, la influència elèctrode-cèl·lula a la mesura de la impedància en funció de la freqüència i també la possible determinació de paràmetres cel·lulars a partir de la mesura.

4.9.1 SENSIBILITAT DE LA MESURA D'IMPEDÀNCIA

Tal i com s'acaba de comentar, la sensibilitat de la mesura és la propietat més important que encara queda per determinar i així poder validar la mesura de la bioimpedància com a eina pel seguiment de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules adherents. La forma més ràpida i senzilla de comprovar-ne la sensibilitat de la mesura de l'estimador de concentració cel·lular respecte la variació de la concentració cel·lular present, és mitjançant el seguiment d'una sedimentació de cèl·lules animals sobre la superfície dels IMEs. A més a més, aquest experiment de sedimentació s'ha repetit amb les dues configuracions diferents del sistema de mesura (a 2 fils i a 4 fils) per poder observar i comprovar-ne, un cop es realitzen mesures en presència de cèl·lules, les diferències teòriques entre les dues configuracions, exposades al llarg de l'apartat 4.4.4.

Per a dur a terme aquest experiment de sedimentació cel·lular, es tripsinitzen les cèl·lules d'un cultiu que es troba a confluència i es mantenen agitades en suspensió en 13 ml d'un medi amb presència de sèrum (per a inactivar la tripsina i evitar que les cèl·lules s'acabin morint i trencant), a l'interior d'un muntatge d'un minireactor modificat amb el sistema de mesura d'impedància mantingut a temperatura constant a l'interior d'un incubador (a 37°C). A temps zero es para l'agitació per a que les cèl·lules en suspensió comencin a sedimentar i es comencen les mesures d'impedància (a 2 fils i a 4 fils respectivament) mitjançant l'analitzador d'impedàncies amb els valors de configuració estàndards, tot i que en aquest experiment però, l'analitzador no s'ha configurat per a que efectui cap promig de les mesures i, d'aquesta manera, poder escurçar el temps de mesura i poder-les realitzar cada 15 segons durant la sedimentació cel·lular.

Primerament, per a poder realitzar un anàlisi directe de les dades obtingudes a partir de les mesures de bioimpedància i, poder observar les diferències entre les mesures d'impedància obtingudes a 2 i a 4 fils respectivament, s'ha vist adequat representar a continuació a la figura 4.31, els perfils del mòdul i de la fase de la impedància al llarg de la relaxació β (perfil teòric representat a la figura 4.15).

Amb aquestes representacions s'observa que, a l'anar sedimentant les cèl·lules i, per tant, a l'anar augmentant la quantitat de material biològic (o fracció de volum) a la superfície dels microelèctrodes, per una banda el mòdul de la impedància va augmentant progressivament en la zona de baixes freqüències, mentre que la fase de la impedància va disminuint al voltant de la freqüència central de relaxació β . Si es comparen aquests augments de mòdul entre les mesures a 2 fils i a 4 fils, es pot observar que corresponen respectivament a un 25% i al 350% de variació respecte a la mesura inicial (mesura en la que hi ha menys influència de cèl·lules).

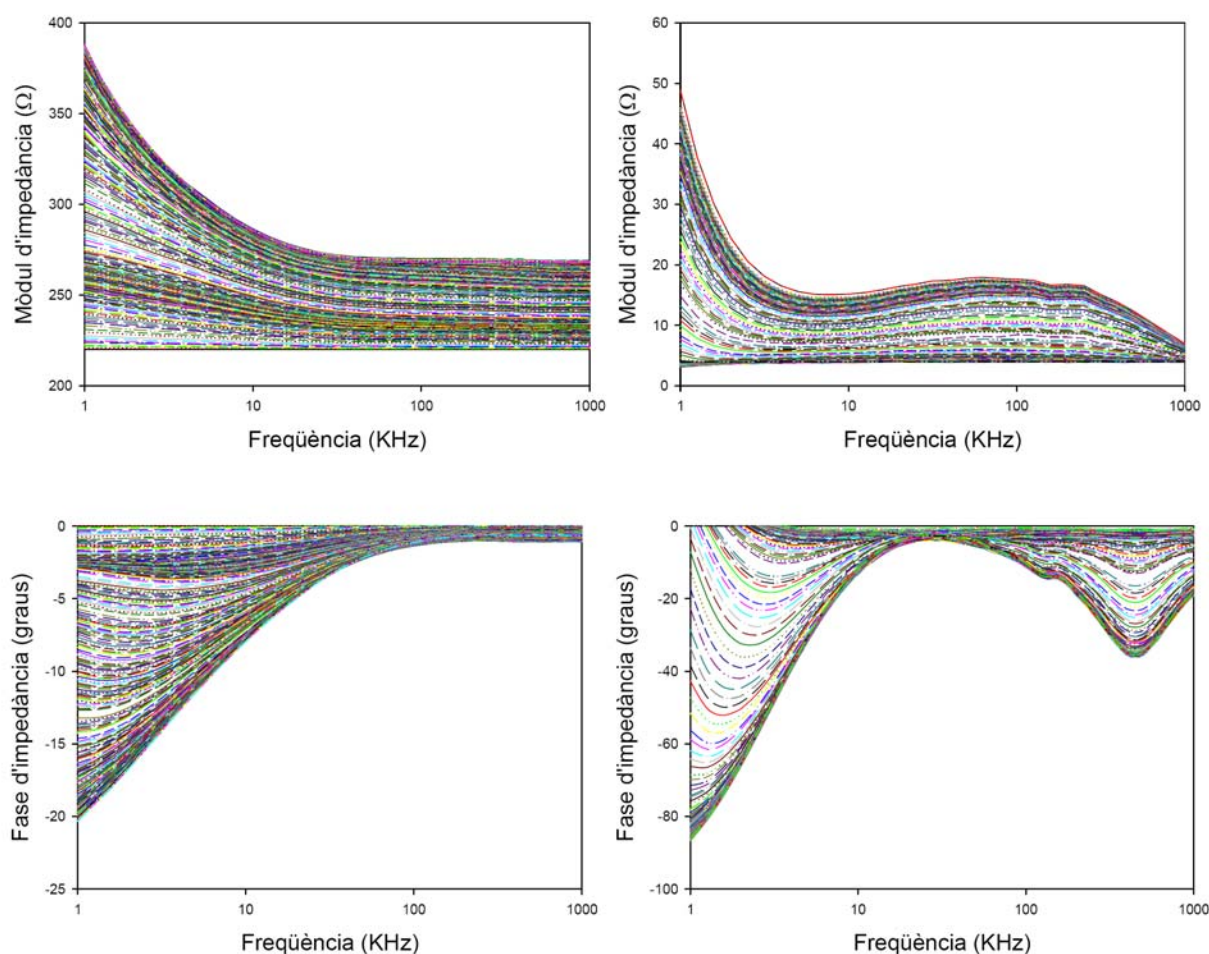


Figura 4.31. Evolució dels perfils normalitzats de mòdul (superior) i de fase (inferior) de la impedància en funció de la freqüència segons el sistema de mesura utilitzat. Sistemes de mesura d'impedància a 2 fils (esquerra) i 4 fils (dreta).

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, aquests resultats demostren que les mesures a 2 fils es veuen influenciades per la pròpia impedància dels elèctrodes i pel grau de recobriment dels mateixos, fent disminuir aquesta variació relativa deguda per l'augment de concentració cel·lular fins a més de 10 vegades respecte la variació relativa obtinguda en les mesures realitzades a 4 fils. Això indica que la impedància dels propis microelèctrodes representa la gran majoria de la impedància final en les mesures a 2 fils i, tot i que fonamentalment aquest factor provinent de la impedància dels microelèctrodes és additiu, és també desconegut i variable contribuint a una font d'incertesa poc desitjada en la mesura de la concentració cel·lular. Tot i això, aquest és el mètode utilitzat en gairebé tots els casos publicats.

Si es comparen els perfils obtinguts amb els teòrics, representats anteriorment a la figura 4.15, es pot observar que a freqüències baixes (inferiors a algunes desenes de KHz) hi ha un augment de l'error en la mesura de la bioimpedància a 2 i 4 fils, augment que, tal i com ja s'ha comentat anteriorment (figura

4.12), és causat per la pròpia capacitat dels elèctrodes de mesura i afecta tant al valor del mòdul com al valor de la fase de la impedància. D'aquesta manera, en la mesura realitzada a 2 fils s'obté que els valors absoluts de mòdul i fase augmenten progressivament al disminuir el valor de la freqüència per sota d'aproximadament 30 i 100 KHz respectivament.

Pel que fa a la mesura realitzada a 4 fils, s'obté el mateix efecte, causat per la capacitat dels elèctrodes de mesura, d'augment del valor absolut de la fase per sota 20 KHz, mentre que pel que fa al mòdul de la impedància, aquest augment de mòdul no es pot observar fins a freqüències inferiors a uns 8 KHz, però aquest, es veu també influenciat amb una primera disminució en el valor absolut al baixar la freqüència de mesura per sota d'uns 20-30 KHz, fet que desaconsella la mesura de la impedància per sota aquests valors de freqüència. Aquesta disminució observada en el mòdul de la mesura d'impedància a 4 fils, coincideix amb l'observada en mesures d'impedància a 4 fils sense presència de cèl·lules (per exemple, les mesures realitzades en medis de cultiu, figura 4.16).

Així doncs, el fet de disposar de material biològic en els microelèctrodes de mesura de la impedància no afecta al límit inferior de freqüències del rang de mesura de l'estimador de concentració cel·lular, que es manté igual a l'obtingut per a mesures sense presència de cèl·lules (uns 20-30 KHz). Pel que fa al límit superior de freqüències per a la mesura de l'estimador, aquest també es manté igual que per a mesures sense material biològic (uns 2-3 MHz), ja que al tractar-se de freqüències superiors a les de la relaxació β , permeten que el corrent circuli lliurement a través les cèl·lules sense que aquestes alterin significativament els perfils de mòdul i de fase de la impedància.

Per a poder realitzar un anàlisi més profund dels resultats obtinguts per a la sedimentació de cèl·lules a la superfície dels microelèctrodes, s'han representat a la figura 4.32 els perfils dels estimadors de concentració cel·lular (normalitzats respecte la mesura inicial), tant a partir de les mesures del mòdul de la impedància (estimador E_2 , esquerra) com a partir de la mesura directa de la fase de la impedància a la freqüència central de relaxació (a 500 KHz segons la figura 4.31, dreta).

D'aquesta manera, es podrà determinar quina sensibilitat s'obté amb el sistema de mesura de la concentració cel·lular desenvolupat a partir de les mesures d'impedància, així com també es podran observar les diferències teòriques exposades al llarg de l'apartat 4.4.4 entre les configuracions de mesura de la impedància a 2 i a 4 fils, un cop aquestes mesures es realitzen en presència de cèl·lules.

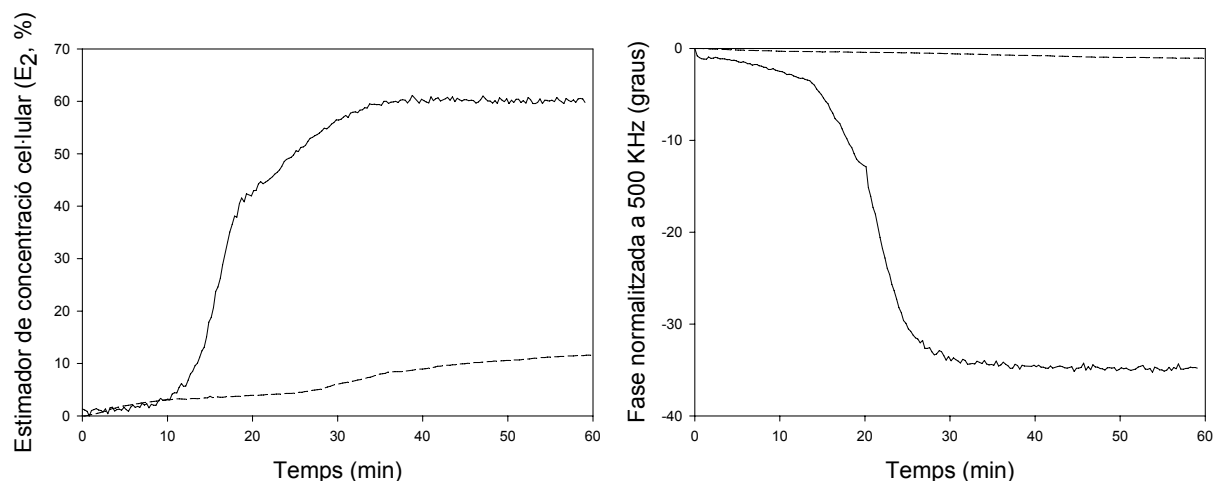


Figura 4.32 Comparació de les evolucions dels estimadors de concentració cel·lular E_2 (esquerra) i de les fases de la impedància normalitzada a 500 KHz (dreta) al llarg d'un procés de sedimentació de cèl·lules *vero*, obtingudes a partir de les diferents configuracions del sistema de mesura utilitzades. Aquestes configuracions del sistema de mesura d'impedàncies analitzades són la configuració a 2 fils (- -) i a 4 fils (—).

Si s'observen els resultats obtinguts durant la sedimentació de cèl·lules animals, quan les mesures es realitzen a partir de la configuració de mesura de 4 fils, es pot veure que la sensibilitat assolida pel mètode de mesura de la concentració cel·lular és molt bona, tant pel cas de l'estimador basat en la mesura del mòdul de la impedància com pel cas de l'estimador basat en la mesura de la fase de la impedància. Pel que fa al primer dels casos, s'aconsegueix una variació de l'estimador de concentració cel·lular d'aproximadament 60 unitats de percentatge corresponent al material biològic sedimentat sobre la superfície dels IMEs. A més, els resultats obtinguts presenten un perfil que és molt comú en processos de sedimentació, és a dir, de 1er ordre.

Pel que fa a l'estimador de concentració cel·lular basat en la fase de la impedància, es pot comprovar que també s'obté un perfil (invertit cap als valors negatius) similar a l'obtingut per a l'estimador basat en el mòdul de la impedància i, en aquest cas, la variació corresponent al material biològic sedimentat és d'aproximadament uns 35 graus. Tal i com es pot observar en els perfils obtinguts per ambdós casos, s'obté una variació suficientment elevada de l'estimador de concentració cel·lular per a que la mesura no es vegi afectada per la pròpia variabilitat de la mesura, indicant-ne una bona idoneïtat de la metodologia utilitzada pel seguiment de cultius de cèl·lules adherents.

Per altra banda, en el seguiment obtingut a 2 fils, tant pel estimador basat en el mòdul com per l'estimador basat en la fase, tot i que permet el seguiment de l'augment de cèl·lules dipositades sobre de la superfície dels microelèctrodes deguda a la sedimentació de les mateixes, la sensibilitat obtinguda és bastant més dolenta que en les corresponents mesures realitzades a 4 fils.

En el cas de l'estimador de concentració cel·lular basat en el mòdul de la impedància, tot i que permet observar un perfil d'augment de la concentració cel·lular a la superfície dels microelèctrodes amb una saturació final (quan ja estan pràcticament totes les cèl·lules sedimentades), aquest perfil no reproduïx amb tanta precisió el perfil teòric d'una cinètica de primer ordre com en el cas de les mesures realitzades a 4 fils. A més, la variació total assolida per a l'estimador arriba sols a unes 13 unitats de percentatge, fent que la pròpia variabilitat de la mesura de la impedància afecti d'una manera més significativa a les mesures. Per altra banda, en el cas de l'estimador de concentració cel·lular basat en la fase de la impedància mesurada a 2 fils, es pot observar com no només la variació total obtinguda corresponent a la sedimentació del material biològic és pràcticament nul·la (entre 1 i 2 graus), sinó que amb prou feines es pot observar un perfil d'augment de l'estimador.

Aquestes diferències obtingudes entre les dues configuracions es poden atribuir a que les mesures realitzades a 2 fils es veuen destorbades pels altres efectes amb un pes significatiu dins de la mesura de la impedància (exposades al llarg de l'apartat 4.4.4) com la adhesió de les cèl·lules als microelèctrodes, disminuint el valor obtingut de l'estimador de concentració cel·lular al no trobar-se les cèl·lules adherides a la superfície dels microelèctrodes, o com el recobriment de la superfície de mesura degut a les cèl·lules, efecte que va augmentant al llarg de la sedimentació i va alterant el perfil teòric de sedimentació.

Tot i que, dels resultats obtinguts, s'hagi observat que la mesura a 2 fils es troba influenciada per efectes secundaris a l'augment de la concentració cel·lular i que la sensibilitat obtinguda és força inferior a l'assolida en el sistema de mesura de la impedància a 4 fils, aquesta també aporta informació valuosa pel seguiment continu i en línia de cultius cel·lulars, com per exemple sobre l'adherència cel·lular. Per tant, les mesures de concentració cel·lular es realitzaran a 4 fils, però es complementarà amb mesures a 2 fils ja sigui per a augmentar-ne la informació recollida com per a permetre una comparativa dels resultats obtinguts en les mesures realitzades a 4 fils amb les mesures obtingudes a partir del sistema utilitzat normalment en la bibliografia per a les mesures d'impedància en cultius cel·lulars.

Un cop s'ha aconseguit una mesura robusta i fiable de l'estimador de concentració cel·lular i s'ha comprovat que la sensibilitat del sistema de mesura és suficientment adequada pel seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents, ja es pot procedir a monitorar un cultiu cel·lular per tal de poder determinar-ne la robustesa de la mesura i l'estimador durant un període llarg de temps corresponent al temps de cultius pel cas de cèl·lules animals adherents, així com poder calibrar la relació entre l'estimador E_2 i la concentració cel·lular real del cultiu per a obtenir, d'aquesta manera, paràmetres bàsics de cultiu cel·lular com per exemple velocitats específiques de creixement.

4.9.2 SEGUIMENT DE CULTIUS CEL·LULARS

Un cop s'ha comprovat, a partir del monitoratge de la sedimentació de cèl·lules *vero* a la superfície dels microelèctrodes emulant a un creixement cel·lular, que el seguiment de la impedància permet realitzar el seguiment de la concentració cel·lular amb una sensibilitat suficient, es procedirà al propi seguiment d'aquest cultiu de cèl·lules *vero*. Amb aquest seguiment es podrà determinar la fiabilitat i la robustesa del sistema de mesura, quan aquest s'ha de mantenir en funcionament durant aproximadament uns 5 dies, corresponents a un període de temps bastant normal per a que els cultius de cèl·lules animals adherents puguin arribar a confluència.

Per a realitzar aquest anàlisi, s'ha efectuat el seguiment en línia de l'estimador de concentració cel·lular en un cultiu de cèl·lules *vero* a l'interior d'un dels minibioreactors amb el sistema de microelèctrodes incorporat (al que se l'hi ha realitzat la neteja corresponent, determinada a l'apartat 4.8.1), mentre que per a poder comparar els resultats obtinguts de l'estimador de concentració cel·lular amb valors reals de concentració cel·lular en cultius de cèl·lules *vero*, s'han efectuat mesures puntuals i fora de línia de la concentració cel·lular de creixements paral·lels (2 pous per punt i un punt per dia) en plaques de 6 pous (sistemes de cultiu comercials), conservant les mateixes característiques de cultiu que pel minibioreactor monitorat. Aquestes característiques de cultiu utilitzades són una temperatura de 37°C, un 95% d'humitat i una atmosfera d'aire amb 5% de CO₂, tot mantingut a partir d'un incubador comercial. A més, el medi de cultiu utilitzat són 3 ml de MEMG suplementat amb un 10% de FBS, mentre que la concentració cel·lular inoculada és de $0,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm².

Pel que fa a les característiques del sistema de mesura de la impedància, les mesures s'han realitzat a 4 fils i s'ha utilitzat la configuració estàndard de mesura, amb la realització del promig de 10 escombrats d'impedància al llarg del rang de freqüències (valors de freqüència entre 10 i 10.000 KHz) per a cada mesura i s'ha programat per a que efectuï una mesura cada 15 minuts.

Primerament, tal i com s'ha anat realitzant al llarg d'aquest desenvolupament de la mesura d'impedància, s'analitzaran els escombrats d'impedància al llarg de la freqüència en la zona de la relaxació β , necessaris pel càlcul de l'estimador de concentració cel·lular. Aquests escombrats es troben representats a la figura 4.33 (només s'ha representat una de cada 10 mesures realitzades, equivalent a una escombrat d'impedància cada 200 minuts de cultiu), a on es pot observar l'evolució dels escombrats de freqüència obtinguts tant per a la mesura del mòdul de la impedància (mostrat a l'esquerra), com per a la mesura de la fase de la impedància (mostrat a la dreta).

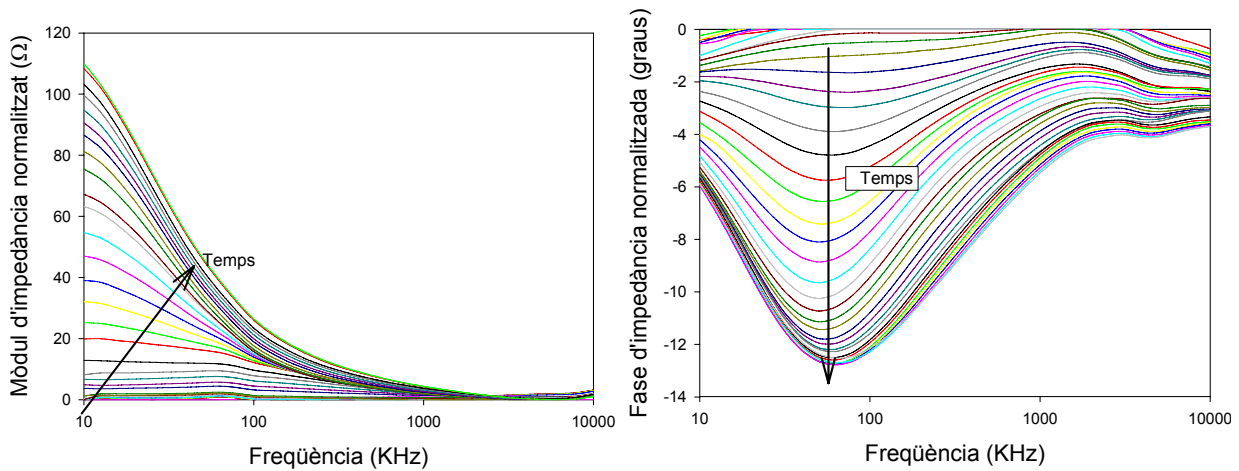


Figura 4.33 Evolució dels escombrats de freqüència del mòdul (esquerra) i de la fase (dreta) de la impedància al llarg d'un cultiu cel·lular, un cop normalitzats respecte la mesura inicial.

Per una banda, amb els perfils del mòdul de la impedància normalitzats respecte la mesura inicial, es pot observar perfectament com la relaxació β es va fent cada cop més evident al llarg del cultiu a causa de l'augment de la concentració cel·lular induït pel creixement cel·lular. Aquest creixement provoca que el mòdul de la impedància a la zona de baixes freqüències arribi fins a prop de 120 Ω , valor de variació d'impedància obtingut respecte a el valor inicial d'impedància a la zona de baixes freqüències, però també respecte al valor del mòdul de la impedància a la zona d'altres freqüències del mateix escombrat.

Per altra banda, amb els perfils de la fase de la impedància, també es pot observar com a mesura que el temps de cultiu va passant i, per tant, la concentració cel·lular va en augment, el perfil típic de la fase de la impedància en la zona de la relaxació β (perfil teòric ja representat anteriorment a la figura 4.15), amb un mínim de fase situat a la freqüència central de relaxació, es va fent cada cop més visible fins a arribar, al final del cultiu, a una variació de fase de 13 graus respecte el valor de fase inicial. Al contrari que pels perfils de mòdul, en els perfils de fase de la impedància i a la zona de freqüències teòrica en la que no s'ha de notar la influència del creixement cel·lular (zona de freqüències allunyada de la freqüència central de relaxació per la fase i la zona d'altres freqüències pel mòdul), s'obté també una variació significativa del valor de la fase de la impedància. Aquest fet concorda amb anteriors resultats en els que ja s'ha pogut observar que la mesura de la fase de la impedància es veu més afectada per artefactes externs al creixement cel·lular, de manera que la quantitat i grandària dels errors es veuen augmentades, indicant que el seguiment òptim de la concentració cel·lular en un cultiu de cèl·lules adherents en aquest sistema de mesura de la impedància desenvolupat, passa per realitzar mesures de mòdul de la impedància per sobre de les mesures de fase de la mateixa. Així doncs, encara que queda comprovat que la concentració cel·lular del cultiu de cèl·lules *vero* es pot estimar a través de la mesura tant del mòdul com de la fase de la

impedància, el sistema de seguiment escollit pel càlcul de l'estimador serà a través de la mesura del mòdul de la impedància.

Un cop analitzats els perfils dels escombrats de la impedància al llarg del temps de cultiu, ja es pot procedir al càlcul dels valors de l'estimador de concentració cel·lular mesurat a partir de les mesures de mòdul de la impedància. El perfil de l'estimador de concentració (E_2) al llarg del temps de cultiu s'ha representat a continuació a la figura 4.34, figura a on també s'han representat els valors de concentració cel·lular mesurats fora de línia i cada aproximadament 24 hores en els cultius paral·lels realitzats en plaques comercials de cultiu. D'aquesta manera, es podrà disposar d'una comparació entre els valors de concentració cel·lular mesurats a partir del sistema de mesura de la impedància amb els valors de concentració cel·lular mesurats directament amb les metodologies tradicionals.

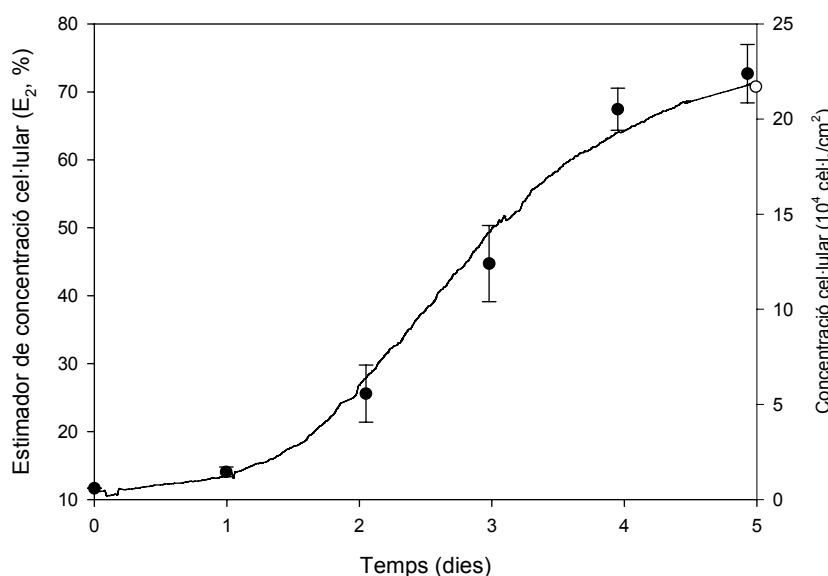


Figura 4.34 Seguiment d'un cultiu cel·lular al llarg del temps mitjançant la mesura de l'estimador de concentració cel·lular E_2 a 4 fils (—). Comparació amb recomptes cel·lulars mesurats fora de línia en creixement controls paral·lels (●) i comparació amb el recompte final del cultiu monitorat (○)

Es pot observar que el perfil de l'estimador de concentració cel·lular mesurat a 4 fils és capaç de resseguir perfectament a les diferents mesures de concentració cel·lular obtingudes amb els recomptes fora de línia realitzats en els cultius paral·lels de cèl·lules *vero* en sistemes comercials de cultiu. Aquest solapament dels dos seguiments del cultiu es dona ja sigui en la fase de creixement exponencial o en les altres fases del cultiu cel·lular, com en el cas de la fase de latència obtinguda durant el primer dia de cultiu o bé al final del cultiu quan aquest ja es troba limitat i no és capaç de prosseguir el creixement a la velocitat màxima obtinguda en el creixement exponencial (a partir del 3er dia de cultiu). Aquest fet indica la correcta funcionalitat del sistema de mesura desenvolupat per a la realització del monitoratge en línia de cultius de cèl·lules animals adherents, amb unes sensibilitat i fiabilitat molt bones.

A més, per tal de comprovar-ne la similitud del creixement obtingut en el minibioreactor monitorat i, per tant, la seva representativitat envers els creixements obtinguts fora de línia en les plaques de cultiu, s'ha realitzat un recompte de la concentració cel·lular en el mateix minibioreactor monitorat al final del cultiu, tal i com s'ha representat a la figura 4.34 (mitjançant la marca "○"). Es pot observar doncs, que el valor de la concentració cel·lular en el minibioreactor monitorat concorda amb bastant exactitud amb els valors de concentració cel·lular assolits en els cultius en l'interior de les plaques comercials de cultiu.

Per a poder analitzar amb més detall el perfil de l'estimador de concentració cel·lular obtingut a partir de les mesures realitzades a 4 fils, s'ha procedit a la repetició de l'experiment amb exactament les mateixes condicions que l'anterior amb la excepció que el sistema de mesura de la impedància s'ha configurat per a que realitzi les mesures d'impedància a 2 fils. El perfil de l'estimador de concentració cel·lular resultant de l'experiment s'ha representat a la figura 4.35.

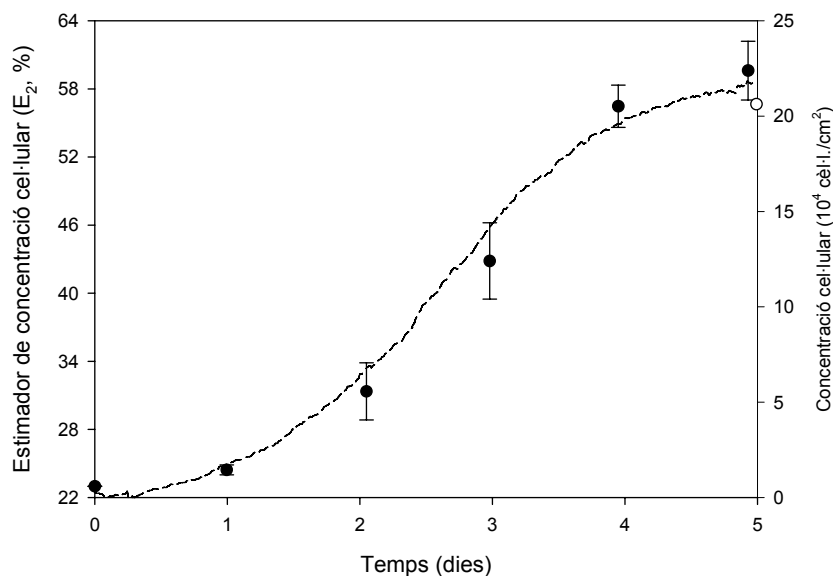


Figura 4.35 Seguiment d'un cultiu cel·lular al llarg del temps mitjançant la mesura de l'estimador de concentració cel·lular E_2 a 2 fils (- -). Comparació amb recomptes cel·lulars mesurats fora de línia en creixement controls paral·lels (●) i comparació amb el recompte final del cultiu monitorat (○).

Es pot observar doncs, que el seguiment de la concentració cel·lular a partir de les mesures de l'estimador de concentració cel·lular (E_2) quan la mesura de la impedància es realitza amb la configuració de mesura de 2 fils també dóna uns resultats molt bons, permetent el correcte seguiment de les mesures realitzades fora de línia en els cultius en plaques comercials en qualsevol de les tres fases del creixement de cèl·lules *vero* (latència, exponencial i de "desacceleració") abans comentades.

A més també es pot observar com la mesura de concentració cel·lular realitzada al minibioreactor monitorat al final del creixement indica que el creixement obtingut en el sistema de minibioreactors és representatiu als creixements obtinguts en els creixements paral·lels, donant conformitat als resultats obtinguts.

Tot i que, tal i com s'acaba de comprovar, les mesures a 2 fils permeten un correcte monitoratge dels cultius de cèl·lules animals adherents, si s'entra més en detall i es comparen les mesures a 2 fils i a 4 fils, es poden observar diversos aspectes importants. De forma resumida, es pot observar com tot i partir de la mateixa concentració inicial, obtenim un valor basal per a la mesura a 2 fils molt superior (22%) al valor obtingut en la mesura realitzada a 4 fils (11%) i, si es mira el grau de sensibilitat es pot observar, mentre el grau de variació relativa a 2 fils és aproximadament del 200% (un valor de 40% de variació absoluta respecte el 22% de valor base), el grau de variació relativa a 4 fils arriba al 550% (un valor de 62% de variació absoluta respecte l'11% de valor base).

Així, tot i que els valors base i, conseqüentment els valors de variació relativa, depenen de molts factors variables poc coneguts, la diferència entre els sistemes a 2 i a 4 fils es evident, obtenint una millor sensibilitat en l'estimació de la concentració cel·lular en la mesura realitzada a 4 fils.

La raó de les diferències obtingudes, tal i com ja s'ha explicat anteriorment, són degudes a que la mesura es veu àmpliament influenciada per factors com la pròpia impedància dels elèctrodes de mesura, els efectes de l'adhesió de les cèl·lules als elèctrodes i la fracció d'àrea ocupada pel cultiu cel·lular entre altres.

D'aquesta manera, tot i que el primer dels factors és independent a la concentració cel·lular present en el cultiu i adherida a la superfície dels microelèctrodes de mesura, tant els efectes de l'adhesió de les cèl·lules als elèctrodes com la fracció d'àrea que ocupen aquestes cèl·lules adherides del total de la superfície de mesura són uns efectes que van augmentant al llarg del cultiu fins que aquest arriba a confluència amb el 100% de la superfície de mesura coberta per les cèl·lules adherides i, per tant, moment en que la interferència d'aquests factors és màxima.

Per tal de determinar la magnitud d'aquesta interferència en cultius quan arriben a confluència, s'ha realitzat el monitoratge d'un cultiu de cèl·lules *vero* amb mesures simultànies de l'estimador de concentració cel·lular realitzades a 2 i a 4 fils, però partint d'una concentració inicial ($1 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) lleugerament superior a la de l'experiment anterior i amb un volum de treball de 13 ml, tot i realitzar el cultiu

a l'interior d'un incubador, que permeti arribar a valors de concentració cel·lular final més elevats i allargar, d'aquesta manera, el creixement durant la fase de confluència.

Per altra banda, la resta de característiques s'han mantingut constants als dos seguiments de cultius de cèl·lules vero anteriors. Els perfils resultants de l'estimador de concentració cel·lular a 2 i a 4 fils, normalitzats respecte el valor inicial, es presenten a la figura 4.36.

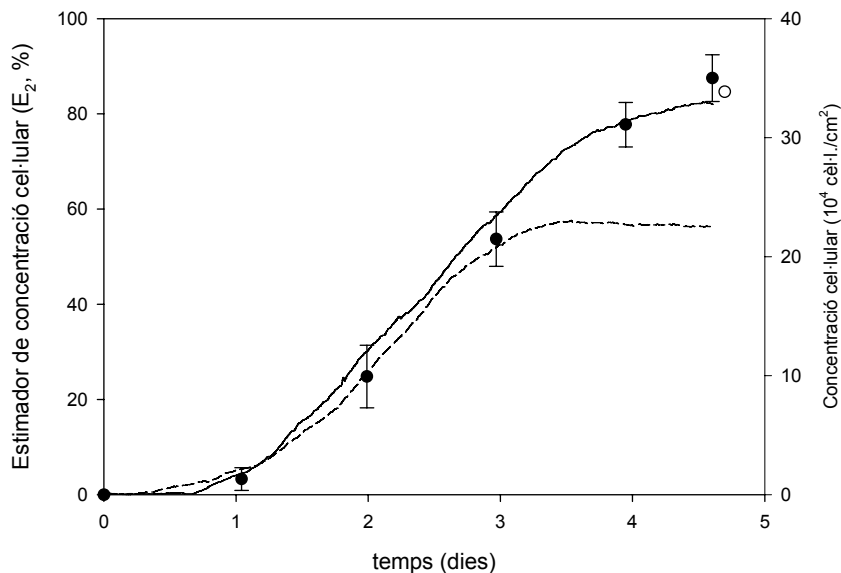


Figura 4.36 Seguiment d'un cultiu cel·lular al llarg del temps mitjançant la mesura de l'estimador de concentració cel·lular E_2 simultània a 2 fils (---) i a 4 fils (—). Comparació amb recomptes cel·lulars mesurats fora de línia en creixement controls paral·lels (●) i comparació amb el recompte final del cultiu monitorat (○).

Si es comparen els perfils obtinguts pels dos sistemes de mesura de la impedància, es pot observar que mentre el cultiu es troba en fase de latència o en fase de creixement exponencial, tant la mesura a 2 fils com la mesura a 4 fils, segueixen perfectament els creixements controls mesurats fora de línia. A mesura que el cultiu va creixement i supera la concentració de $20 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², les cèl·lules es troben ja a confluència i, a diferència dels creixements anteriors creixements, encara no ha esgotat el medi i el cultiu cel·lular encara té nutrients per augmentar significativament la concentració cel·lular. És a partir d'aquest moment, quan ja ha arribat a confluència, que es pot observar que mentre l'estimador de concentració mesurat a 4 fils continua mesurant aquest augment de concentració, el perfil de l'estimador de concentració mesurat a 2 fils no és capaç de reproduir el creixement real que té el cultiu.

L'explicació d'aquest fet rau en que la mesura d'impedància a 2 fils, contràriament a la mesura d'impedància a 4 fils, es troba molt influenciada per el percentatge de la superfície dels microelèctrodes que es troba coberta per les cèl·lules adherents, de manera que tot i l'augment global de la concentració

cel·lular en la fase de confluència del cultiu, el fet de no variar el percentatge d'àrea colonitzada per les cèl·lules (100%) actua emmascarant aquest creixement cel·lular fent que la mesura de la impedància no sigui capaç de poder-lo distingir.

Finalment, amb la mesura de la concentració cel·lular del cultiu monitorat es pot corroborar que el creixement obtingut en el minibioreactor monitorat és representatiu dels obtinguts en els controls paral·lels i, per tant, també ho és el perfil de l'estimador de concentració cel·lular obtingut amb el sistema de mesura a 4 fils.

Es pot concloure doncs, que tot i que la mesura de la impedància a 2 fils permet el correcte seguiment dels cultius de cèl·lules adherents durant les fases de latència i de creixement exponencial, aquesta mesura deixa de ser representativa quan el cultiu ja arriba a confluència, desviant-se del creixement real del cultiu. Per altra banda, la mesura de la impedància a 4 fils és capaç de realitzar el seguiment del creixement cel·lular durant totes les fases del creixement, convertint-la en una mesura robusta i fiable pel seguiment de la concentració cel·lular al llarg de tot el cultiu de cèl·lules animals adherents, tot i tractar-se de temps de cultiu elevat.

4.9.3 CALIBRATGE DE L'ESTIMADOR DE CONCENTRACIÓ

Un cop s'ha comprovat la robustesa i fiabilitat de la mesura al llarg d'un cultiu de cèl·lules animals adherents, l'últim pas per a obtenir la mesura de la concentració cel·lular és la realització del calibratge de la mesura, calibratge que caldrà realitzar per a les diferents línies cel·lulars a monitorar, prèviament al corresponent seguiment del cultiu. Per a poder obtenir aquest calibratge de la mesura de l'estimador de concentració cel·lular, s'ha dut a terme el seguiment de l'estimador de concentració cel·lular en cultius de cèl·lules *vero* inoculats a diverses concentracions inicials diferents. Aquestes concentracions cel·lulars inicials són de $0,5 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^4$ i $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm².

Les característiques dels cultius són les mateixes que pels seguiments anteriors, és a dir, una temperatura de 37°C, un 95% d'humitat i una atmosfera d'aire amb 5% de CO₂, tot mantingut a partir d'un incubador comercial, on els minibioreactors amb el sistema de microelèctrodes incorporat s'han utilitzat amb un volum útil de 3 ml de MEMG suplementat amb un 10% de FBS. Per altra banda, pel càlcul de la concentració cel·lular real, s'han efectuat mesures puntuals i fora de línia de la concentració cel·lular de creixements paral·lels (2 pous per punt i un punt per dia) en plaques de 6 pous.

Finalment, pel que fa a les característiques del sistema de mesura de la impedància, les mesures s'han realitzat a 4 fils i s'ha utilitzat la configuració estàndard de mesura, amb la realització del promig de 10 escombrats d'impedància al llarg del rang de freqüències (valors de freqüència entre 10 i 10.000 KHz) per a cada mesura i s'ha programat per a que efectuï una mesura cada 15 minuts, encara que només s'utilitzin els valors de l'estimador de concentració corresponents als recomptes fora de línia en les plaques comercials de 6 pous. La representació dels punts resultants entre els valors dels estimadors de concentració cel·lular normalitzats respecte el valor inicial del cultiu i els valors de la variació de concentració cel·lular real mesurats en creixements controls paral·lels es poden observar a la figura 4.37.

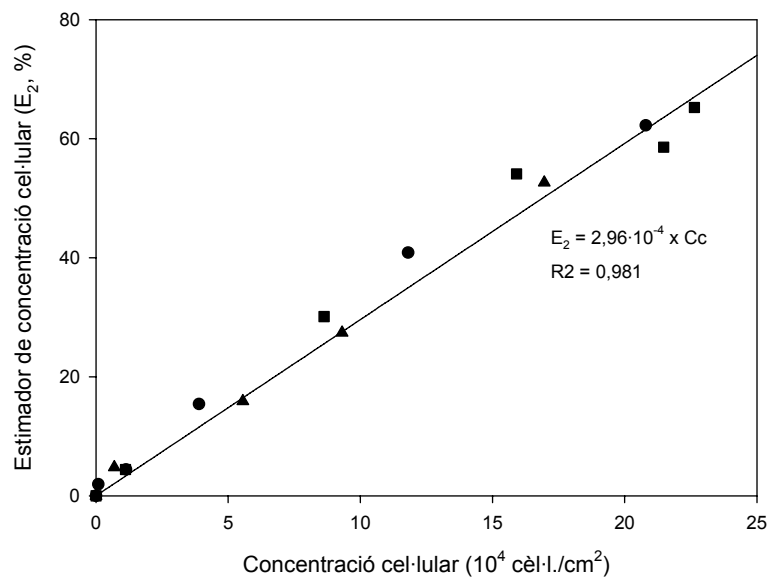


Figura 4.37 Calibratge de l'estimador de concentració cel·lular E_2 normalitzat mesurat a 4 fils respecte la variació de concentració cel·lular en diversos cultius a diferents concentracions inicials (—). Les concentracions inicials analitzades corresponen a $0,5 \cdot 10^4$ (●), $2 \cdot 10^4$ (■) i $8 \cdot 10^4$ (▲) cèl·lules/cm².

Es pot observar doncs, que la relació entre l'estimador de concentració cel·lular E_2 i la concentració cel·lular real en el cultiu monitorat és lineal, regida per una constant de proporcionalitat, sense importar quina és la concentració inicial del cultiu i, per tant, en qualsevol fase del creixement cel·lular. Per tal de determinar aquesta constant de proporcionalitat, s'ha ajustat una recta de regressió a la totalitat dels punts obtinguts obtenint uns resultats amb un bon coeficient de correlació ($R^2 = 0,981$), mentre la sensibilitat resultant de l'estimador de concentració cel·lular E_2 (la inversa del pendent obtingut en l'ajust de la figura 4.37) ha resultat de $0,34 \cdot 10^4$ cèl·lules per cada 1% de l'estimador.

4.9.4 DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES CEL·LULARS

El calibratge de la mesura de la concentració cel·lular permet la determinació de paràmetres cel·lulars molt importants tant per a la investigació com per a la indústria que treballa amb processos de cultiu cel·lular.

N'és el cas de la velocitat màxima de creixement, essent el principal paràmetre a utilitzar per a les comparacions entre diferents creixements, tal i com es podrà observar al llarg del capítol 5, ja sigui per a determinacions del medi òptim de cultiu en un procés, d'efectes de toxicitats de productes i efectes en la concentració cel·lular inicial entre altres aplicacions.

La determinació de la velocitat de creixement a partir del seguiment de l'estimador de concentració cel·lular (E_2) s'assoleix mitjançant l'ajust d'una recta a la zona de creixement exponencial en la representació del logaritme neperià de la concentració cel·lular respecte el temps de cultiu, tal i com es pot observar a la figura 4.38 (esquerra), on s'ha calculat la velocitat específica de creixement a partir del perfil de seguiment de la impedància a 4 fils efectuada en el cultiu de l'apartat 4.9.2 (perfil del cultiu representat a la figura 4.34).

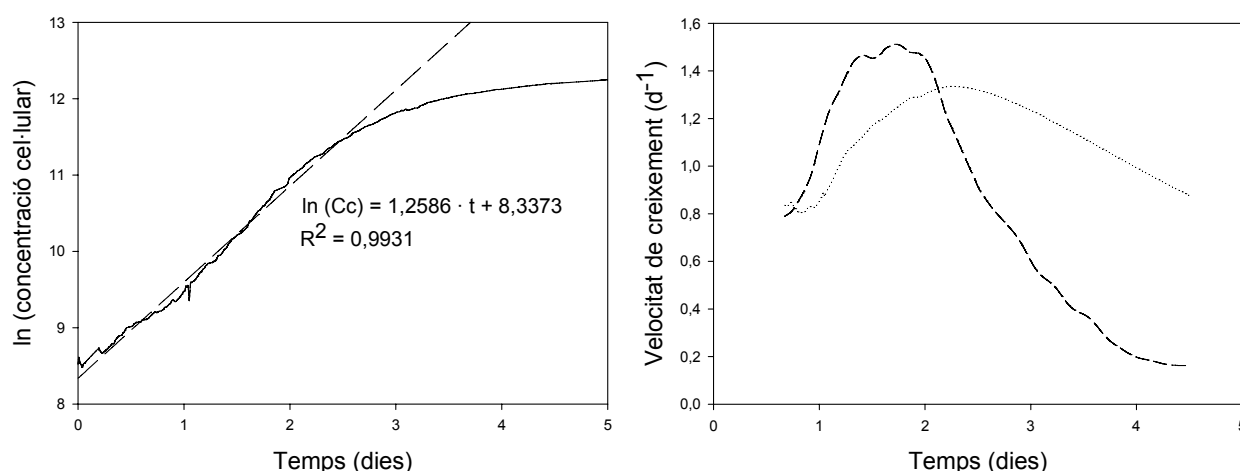


Figura 4.38 Càlculs de la velocitat de creixement mitjançant la linealització de la fase exponencial de la mesura de l'estimador de concentració cel·lular al llarg del cultiu (esquerra, — —) i mitjançant el càlcul de la velocitat de creixement puntual (dreta, — —) i acumulada (dreta, ··· ·) al llarg del cultiu de cèl·lules vero.

L'avantatge de tenir una mesura en línia i contínua de la concentració cel·lular, a diferència de les mesures realitzades fora de línia en creixements paral·lels, és que també permet obtenir mesures en línia de la velocitats de creixement puntuals i acumulades en cultius cel·lulars, tal i com es mostra a la figura 4.38 (dreta), obtenint informació a l'instant de l'estat fisiològic de les cèl·lules en qualsevol moment del cultiu sense haver d'esperar a l'obtenció de la totalitat de les mesures. Al realitzar l'ajust de la recta per a la determinació de la velocitat de creixement, mentre que pel càlcul de la velocitat de creixement puntual només es té en compte les últimes dades de l'estimador durant un període concret de temps, equivalent en aquest cas a 2/3 de dia, la velocitat de creixement acumulada és calculada amb la totalitat de les mesures d'impedància realitzades fins al moment.

Amb les figures es pot observar com el monitoratge en línia de la concentració cel·lular permet el càlcul de la velocitat màxima de creixement a través de la linealització de la fase exponencial del creixement amb bastant precisió ($1,26 \text{ d}^{-1}$ amb $R^2 = 0,9931$ pel cultiu de cèl·lules *vero*). A més, també permet el càlcul i monitoratge de la velocitat de creixement puntual i acumulada al llarg d'un cultiu, a partir dels quals es poden distingir clarament les diferents fases del creixement així com dels moments de traspàs entre elles, com per exemple en el monitoratge del perfil de la velocitat de creixement puntual (figura 4.38, dreta), en el que es pot observar com, en el període de latència la velocitat de creixement va augmentant inicialment durant el primer dia i escaig fins a arribar a la fase de creixement exponencial, durant la que es manté constant. Finalment als dos dies i quart de cultiu, la velocitat de creixement va disminuint a mesura que el cultiu comença a veure's afectat per la falta d'algun nutrient i la falta de superfície de creixement, fins que al quart dia de cultiu la velocitat de creixement és pràcticament nul·la, amb el cultiu a confluència i el medi esgotat. Per altra banda, amb la velocitat de creixement acumulada es pot observar un comportament similar, arribant a una velocitat màxima de creixement de $1,33 \text{ d}^{-1}$ (equivalent a un temps de duplicació de 12,5 hores).

Així doncs, amb el seguiment en línia de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules adherents a partir de mesures d'impedància a 4 fils, s'obté un seguiment fiable i robust al llarg de tot el cultiu cel·lular i que permet la determinació de paràmetres cel·lulars bàsics en cultius cel·lulars per a la realització de comparacions acurades entre ells.

4.10 MONITORATGE DE LA MORFOLOGIA CEL·LULAR

Tot i que l'aplicació més directa de la mesura de la impedància en cultius és l'estimació de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules adherents i la conseqüent determinació de paràmetres cel·lulars (cinètics...), la mesura de la impedància a 4 fils aporta altres avantatges pel monitoratge de cultius cel·lulars.

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, el principal avantatge de la mesura de la impedància en cultius cel·lulars, és la possibilitat d'ajustar els valors obtinguts de la impedància al model de Cole-Cole per a la relaxació β (equació 4.2) que, amb la determinació dels paràmetres que el defineixen, aporten informació de la morfologia de les cèl·lules presents en el cultiu. Un d'aquests paràmetres del model de Cole-Cole, que aporta informació de la morfologia cel·lular en cultius i que es fàcil d'observar sense calibrat previ, és la freqüència central de relaxació (ω_c), ja que aquesta és la freqüència que correspon amb el valor mínim de la fase de la impedància en la seva representació envers la freqüència (mostrat anteriorment a la figura 4.15). Teòricament, com que la relaxació β és causada per l'efecte de polarització de la membrana

cel·lular a l'aplicar un corrent, aquesta depèn de la quantitat de membrana cel·lular que troba el corrent en el seu pas i, per tant, de la grandària de les cèl·lules. D'aquesta manera, com més gran és una cèl·lula, es necessita més temps per que el corrent polaritzi les membranes cel·lulars i, per tant, la relaxació β es trobarà situada a zones de freqüències més baixes i viceversa.

Per tal de comprovar aquesta relació entre la grandària de les cèl·lules amb la freqüència central de relaxació (ω_c), s'ha realitzat el seguiment de la impedància de tres línies cel·lulars de mides bastant diferents. Aquestes tres línies cel·lulars escollides són una línia cel·lular animal adherent (cèl·lules *vero*), que no només té una mida cel·lular elevada sinó que a més es troba adherida a la superfície dels microelèctrodes augmentant l'àrea de pas del corrent a polaritzar, una línia cel·lular animal no adherent (cèl·lules d'*hibridoma*), que tenen una mida cel·lular elevada, tot i que l'àrea de pas del corrent és inferior a les línies adherents, i finalment un bacteri (*Escherichia coli*), amb una mida cel·lular molt més petita que les cèl·lules animals.

Les característiques per a realitzar els seguiments de la fase de la impedància per a les diferents línies cel·lulars es detallen a continuació. Primerament i pel seguiment de les cèl·lules *vero*, s'han agafat les dades de fase de la impedància mesurada a 4 fils i obtingudes en experiments anteriors (dades ja representades a la figura 4.33). Per a les altres dues línies cel·lulars (hibridomes i *E. coli*), els monitoratges s'han realitzat a l'interior de minibioreactors modificats amb el sistema de mesura de la impedància situats a l'interior d'un incubador per mantenir una atmosfera saturada de vapor d'aigua, amb el 5% de CO₂ i amb una temperatura de 37 °C.

En el cas dels bacteris, s'ha mesurat la impedància a 4 fils d'una pluja de cèl·lules a la superfície dels microelèctrodes cada minut, utilitzant la configuració estàndard del sistema de mesura sense promig durant les 2 hores de sedimentació cel·lular. Per a realitzar el seguiment, s'han utilitzat 3 ml del mateix medi que pel cultiu de les cèl·lules *vero* (MEMG) sense suplementes al que s'ha inoculat a partir del pèl·let de la centrifugació de les cèl·lules provinents d'un preinocul i, un cop es troba la solució atemperada i homogènia, s'atura l'agitació i s'inicia el monitoratge de la impedància.

En el cas dels hibridomes, s'ha efectuat el seguiment de la impedància a 4 fils d'un creixement dels hibridomes amb una concentració inicial de $4 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml i amb un volum útil de 13 mil·lilitres de medi DMEM suplementat amb 5% de FBS, β -mercaptoetanol i insulina. Pel que fa al sistema de mesura de la impedància, s'ha utilitzat la configuració estàndard amb promig de 5 mesures consecutives i les mesures s'han efectuat cada 15 minuts. Tot i que l'agitació utilitzada pel cultiu d'hibridomes és de 200 rpm, s'han

anat realitzant parades puntuals durant les mesures de la impedància per a permetre'n la sedimentació de les cèl·lules sobre la superfície dels microelèctrodes i, d'aquesta manera, poder obtenir una mesura del cultiu amb una concentració cel·lular més elevada i, per tant, una mesura més estable i fiable.

La representació dels perfils de fase (normalitzats respecte al seu valor mínim) on es pot determinar clarament el valor de la freqüència central de relaxació, es pot observar a la figura 4.39.

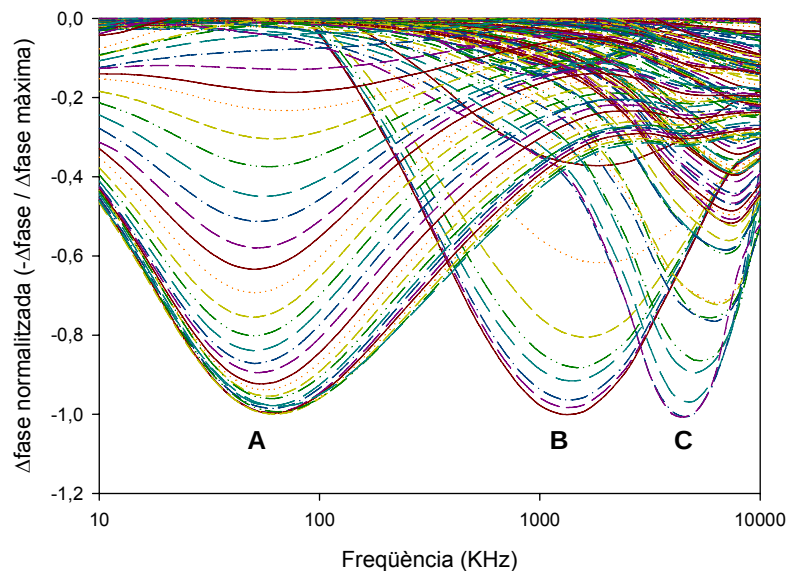


Figura 4.39 Efecte de la morfologia cel·lular en la freqüència central de relaxació en la mesura d'impedància, a partir de la representació de la variació de fase normalitzada al llarg d'un cultiu per a cèl·lules animals adherents (cèl·lules vero, creixement A), per a cèl·lules animals no adherents (cèl·lules d'hibridoma, creixement B) i per a bacteris (E.coli, creixement C).

A partir d'aquesta representació s'obté que un cultiu de cèl·lules animals adherents (com les cèl·lules vero representades en els perfils de creixement A) tindrà una freqüència central de relaxació d'aproximadament 80-100 KHz, mentre que per un cultiu de cèl·lules animals en suspensió (cèl·lules d'hibridoma representades en els perfils de creixement B), tot i tenir una mida cel·lular semblant a les cèl·lules animals adherents, al no adherir-se ni escampar-se per la superfície de creixement la freqüència central de relaxació és més elevada i es situa cap al miler de KHz. Finalment, per a un cultiu de bacteris (cèl·lules d'E. coli representades en els perfils de creixement C) on les cèl·lules són d'una mida més petita que les cèl·lules animals i no s'adhereixen ni s'escampen per la superfície de mesura dels microelèctrodes, la freqüència central de relaxació puja encara més, de manera que es situa cap a 4-5 MHz.

D'aquesta manera, queda demostrada l'existència de la relació entre una de les propietats de la morfologia cel·lular (en aquest cas la mida cel·lular) amb un dels paràmetres de l'equació de Cole-Cole (en aquest cas la freqüència central de relaxació). Tot i que amb aquesta representació de la fase normalitzada es

poden determinar diferències qualitatives del valor la freqüència de relaxació, per a poder obtenir una mesura en línia de les característiques morfològiques dels cultius cel·lulars, i per a poder determinar quin efecte té les seves variacions sobre els diferents paràmetres que defineixen l'equació de Cole-Cole, es necessària la modelització de les mesures d'impedància obtingudes.

Per tant, per a poder determinar l'efecte d'aquestes característiques morfològiques dels cultius cel·lulars als paràmetres de la equació de Cole-Cole, necessitem realitzar el seguiment de la impedància a 4 fils al llarg d'un procés en el que existeixi un canvi significatiu de la morfologia de les cèl·lules mesurades i, a més a més, que es conegui aquesta variació de la morfologia o que es pugui observar qualitativament. Els processos dels cultius de cèl·lules animals adherents amb el canvi de morfologia més evident, són els processos d'enganxament i de desenganxament cel·lular, tal i com es pot observar a la figura 4.40, en els que les cèl·lules poden tenir una morfologia fibroblàstica quan es troben adherides a una superfície de creixement i en condicions normals, o bé poden tenir una forma arrodonida, quan aquestes es troben desenganxades i en suspensió (situació antinatural de les cèl·lules animals adherents).

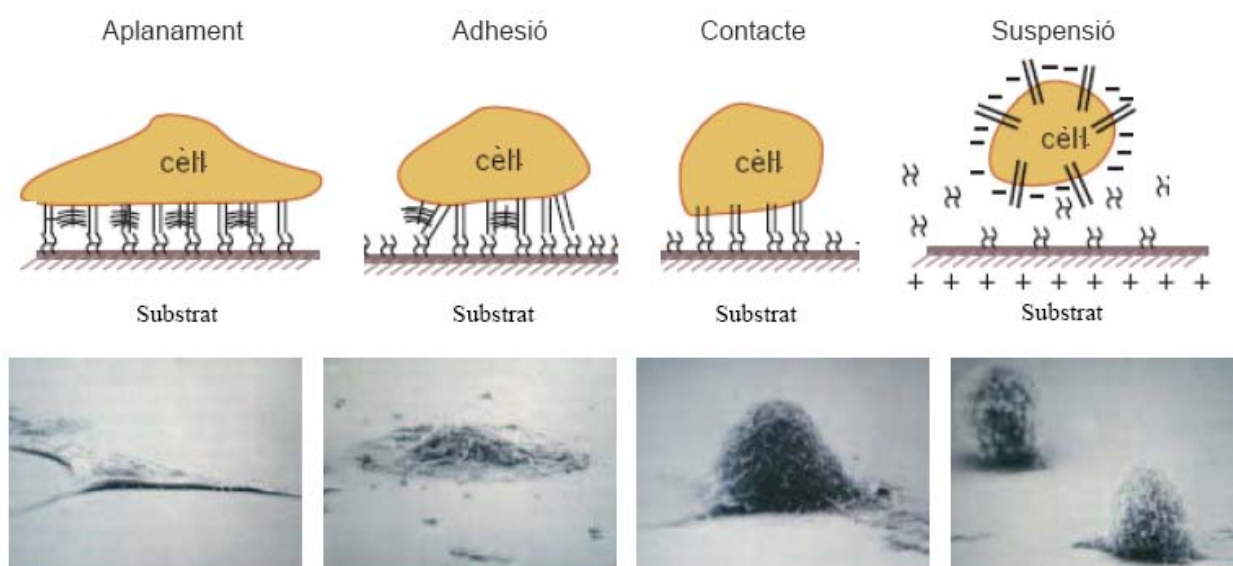


Figura 4.40 Dibuixos esquemàtics del procés de desenganxament cel·lular en quatre fases (superior) juntament amb fotografies microscòpiques del procés (inferior). (Amersham 2005)

Per tal de poder tenir unes condicions estables durant el procés i per poder-ne controlar tant l'inici com la durada d'aquest, el procés escollit per a realitzar-ne la mesura de la impedància és el desenganxament cel·lular causat per una pertorbació del cultiu. D'aquesta manera, es coneixerà l'inici exacte del procés i a més la durada d'aquest serà bastant menor. Pel que fa a l'agent pertorbador, aquest consisteix en la substitució del medi del cultiu de cèl·lules vero per una solució salina sense presència de sèrum, provocant

d'aquesta manera, l'eliminació de les proteïnes necessàries per a que el cultiu mantingui l'adherència i causant-ne el desenganxament cel·lular.

Per tal de poder observar visualment el canvi de morfologia durant el procés de desenganxament, s'ha incorporat al sistema de mesura de la impedància (esquema del sistema representat anteriorment a la figura 4.5) un microscopi invertit amb una càmera de vídeo incorporada en un dels oculars, tal i com es pot observar a les fotos de la figura 4.41.

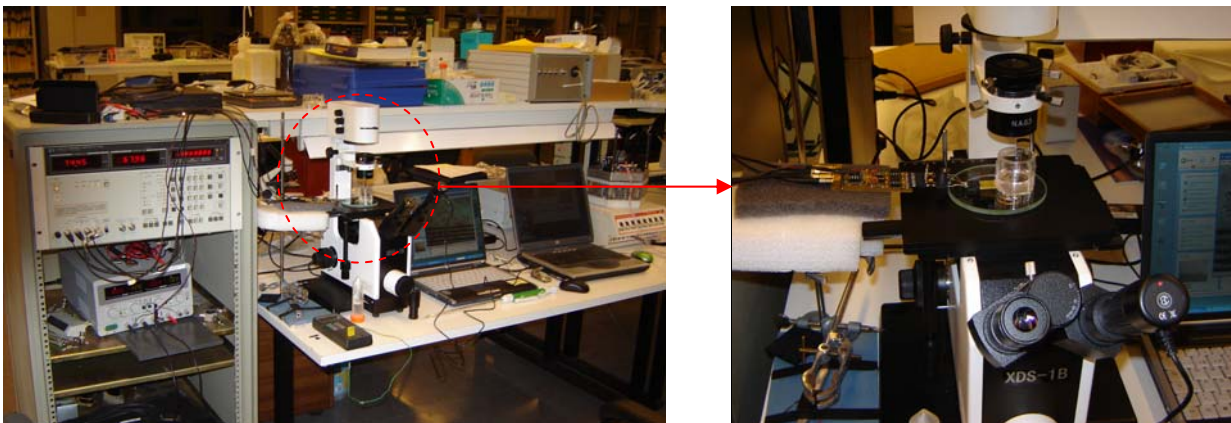


Figura 4.41 Fotografia (esquerra) del sistema de mesura de la impedància (esquema a la figura 4.5) juntament amb el sistema d'enregistrament de vídeo, compost d'un microscopi invertit, una càmera de vídeo i un ordinador per a l'enregistrament. Fotografia (dreta) més detallada de la zona de mesura, amb el "front-end" i connectors per a la mesura de la impedància i el microscopi i la càmera de vídeo (incorporada en un dels oculars) pel seguiment visual del procés

Un cop es disposa dels sistemes de mesura i d'enregistrament es procedeix a fer l'experiment des d'un cultiu de cèl·lules *vero* realitzat a la superfície dels microelèctrodes situats a l'interior d'un minibioreactor. A temperatura ambient, es substitueix el medi de cultiu pel PBS i es comencen els enregistraments de la impedància, així com el de vídeo, fins que les cèl·lules del cultiu es trobin totalment desenganxades i la mesura d'impedància estigui estable. Les condicions d'ús del sistema de mesura de la impedància són les estàndards sense realització de cap promig, les mesures es duen a terme cada 20 segons i s'utilitza la configuració de mesura a 4 fils, tot i que es repeteix l'experiment a 2 fils per tal de disposar d'una contramesura que serveixi de control de les dades obtingudes.

Pel que fa al sistema d'enregistrament de vídeo, les condicions utilitzades són de 2 segons d'enregistrament cada minut (mitjançant control manual) per evitar que augmenti la temperatura a l'interior del minibioreactor a causa de la llum del microscopi. A més, es disposa d'una sonda de temperatura enganxada a la paret del minibioreactor per comprovar que la temperatura es manté estable durant tot el procés. A la figura 4.42 es poden observar 6 fotogrames del vídeo enregistrat durant el procés de

desenganxament cel·lular ordenades temporalment (fotogrames corresponents als temps 0, 10, 20, 30, 40 i 50 minuts del procés).

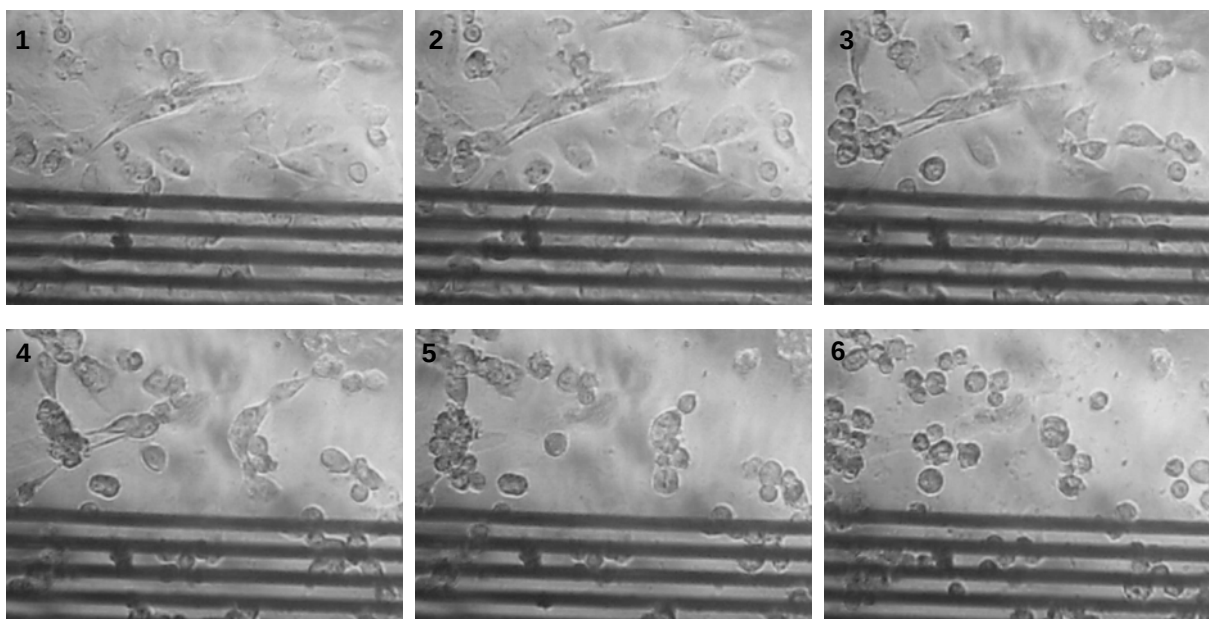


Figura 4.42 Evolució òptica de la morfologia de les cèl·lules al llarg del desenganxament d'un cultiu de cèl·lules vero (fotos numerades temporalment, de t=0 minuts a la foto nº 1 fins a t=50 minuts a la foto 6).

Es pot observar doncs, que en el moment inicial del procés de desenganxament (fotograma número 1), les cèl·lules es troben totalment adherides a la superfície de cultiu dels microelectrodes mostrant una morfologia fibroblàstica i, a mesura que va passant el temps, les cèl·lules són incapaces de mantenir l'adherència degut a la manca de les proteïnes que aporta el sèrum i es van desenganxant de la superfície, adoptant una morfologia esfèrica (fotograma número 6).

Un cop es disposa de les mesures de la impedància al llarg del procés de desenganxament cel·lular, per a la determinació de l'evolució dels diferents paràmetres s'ha utilitzat un programa desenvolupat pel Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC en Matlab per a l'ajust de les dades obtingudes amb el model de Cole-Cole i que consta de dos passos. El primer pas per a la determinació dels paràmetres de l'equació de Cole-Cole, es tracta del calibratge de les dades obtingudes respecte una mesura sense la influència de les cèl·lules de mesura. Així doncs, el calibratge s'ha realitzat respecte la última mesura d'impedància del final de l'experiment, quan totes les cèl·lules es troben ja desenganxades, d'aquesta manera aconseguint una mesura del medi (en aquest cas PBS) amb el menor efecte de la concentració cel·lular. El segon pas per a efectuar la modelització de les mesures es basa en l'ajust (mitjançant el programa MATLAB) d'un arc a les dades ja calibrades quan aquestes es representen en el diagrama de

Wessel, diagrama a on es representa la part imaginària de la impedància respecte la part real (figura 4.43). D'aquesta manera, s'obtenen els arcs que representen els escombrats d'impedància per a cada mesura durant el procés de desenganxament cel·lular i que defineixen els paràmetres del model.

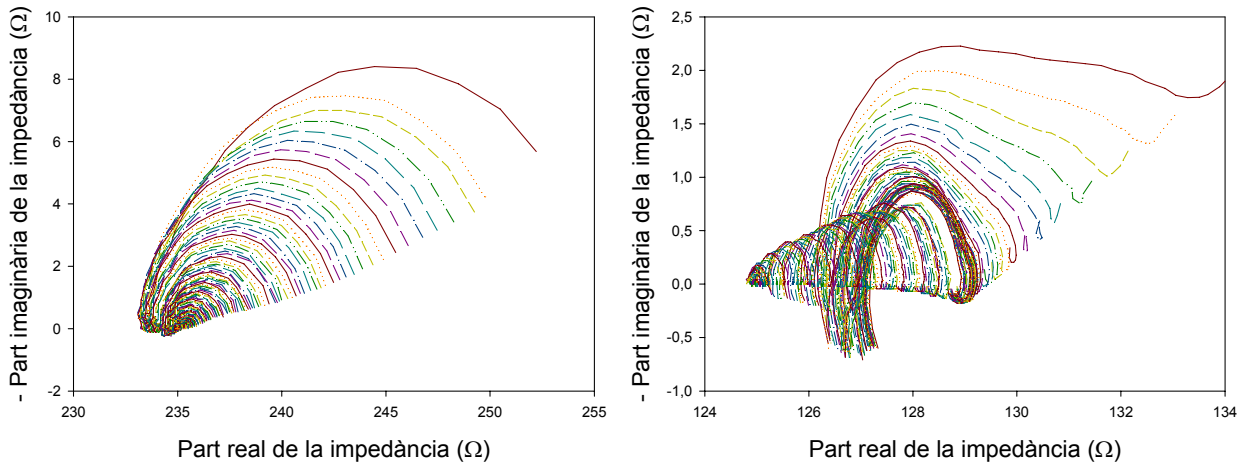


Figura 4.43 Representació dels arcs de Cole-Cole obtinguts al llarg del desenganxament cel·lular a partir de les mesures d'impedància a 2 fils (esquerra) i a 4 fils (dreta). Les dades estan calibrades respecte a la última mesura del desenganxament quan les cèl·lules es troben totalment desadherides (arc més petit).

En aquests arcs de Wessel, es pot observar la desviació de les mesures realitzades durant el procés de desenganxament cel·lular de la mesura d'una capacítància ideal, on els perfils d'impedància quedarien representats per un semicercle centrat en l'eix real, amb les dades ordenades (segons la freqüència ascendent) en sentit antihorari i amb una amplada proporcional a la concentració cel·lular existent. Es pot observar però amb els perfils obtinguts, que aquests semicercles dibuixats es troben deformats i desplaçats de l'eix real. Aquestes desviacions de la idealitat dels semicercles, que són funció dels diferents paràmetres de l'equació de Cole-Cole, depenen de la morfologia de les cèl·lules mesurades.

Si es comparen els resultats obtinguts a 2 fils (esquerra) i a 4 fils (dreta), es pot observar com mentre per a les mesures a 2 fils s'obtenen uns arcs bastant idealitzats, la mesura a 4 fils permet l'observació d'un canvi de morfologia durant el procés de desenganxament cel·lular. Així, en les mesures inicials quan les cèl·lules es troben totalment adherides als microelèctrodes, els arcs obtinguts són més amples a causa de la major quantitat d'àrea transversal de les cèl·lules que interfereix al pas del corrent i a més aquests es troben molt deformats i descentrats, evidenciant que la morfologia de les cèl·lules mesurades s'allunya la idealitat i, per tant, s'allunyen d'una morfologia esfèrica.

Per altra banda, a mesura que les cèl·lules es van desenganxant de la superfície dels microelèctrodes, les cèl·lules van perdent aquesta morfologia fibroblàstica i es van arrodonint (tal i com s'ha observat amb les

fotos de la figura 4.42), fent que els arcs del diagrama de Wessel es vagin arrodonint i centrant en l'eix real. A més, a l'anar-se desenganxant es va perdent la influència de les cèl·lules al pas del corrent fent que els arcs cada cop siguin més petits, fins que aquests es tornen pràcticament nuls.

Si ens centrem en la determinació dels paràmetres del model, els primers paràmetres que se'n deriven a l'ajustar l'arc a les dades obtingudes, en són els valors teòrics de la impedància a freqüència zero (R_0) i a freqüència infinita (R_∞). Aquests dos valors queden representats en els dos valors de l'ajust que tallen l'eix real.

Tot i que aquests paràmetres no aporten molta informació sobre la morfologia per a ells sols, sí aporten informació sobre la concentració cel·lular al tractar-se de dues mesures situades una a cada costat de la relaxació β , de manera que la impedància teòrica a freqüència zero es troba totalment influenciada per la concentració cel·lular, mentre que la impedància teòrica a freqüència infinita no es troba influenciada pel concentració cel·lular, permetent el càlcul d'un estimador de concentració cel·lular molt robust. A més, la representació d'aquests paràmetres permet la comparació amb els valors de l'error del model. El perfil d'aquests paràmetres al llarg del procés de desenganxament es poden observar a continuació a la figura 4.44 superior, mentre que el perfil de l'error de l'ajust del model s'ha representat a la figura 4.44 inferior.

Es pot observar doncs, que la màxima variació de concentració cel·lular i, per tant, també la zona de màxima variació morfològica de les cèl·lules en el procés de desenganxament, es dona en els primers 30 minuts, obtenint uns errors en l'ajust del model relativament acceptables. A partir d'aquest moment, les cèl·lules ja es troben pràcticament desadherides, de manera que al trobar-se calibrades respecte les mesures finals, ja no s'observa canvis en les mesures de les impedàncies i l'error obtingut augmenta fins a valors molt elevats.

Si es comparen els resultats obtinguts a 2 i a 4 fils, es pot observar que el seguiment de les impedàncies teòriques realitzat a 2 fils indica que la variació cel·lular no presenta variacions significatives a partir del minut 40 de procés (moment en que s'ajunten les dues corbes d'impedància) i, per tant, que les cèl·lules es troben ja totalment desadherides de la superfície dels microelèctrodes. Per altra banda, el seguiment de les impedàncies a 4 fils indica que aquesta variació cel·lular segueix essent significativa fins pràcticament al final del procés (45-50 minuts). Aquesta diferència es deguda a la influència de la mesura a 2 fils dels diferents efectes exposats anteriorment (impedància dels propis elèctrodes, adherència...), que augmenten pràcticament en un 100% els valors de les impedàncies (de 126-134 a 235-255 ohms de 4 a 2 fils). Aquest

fet fa que les variacions de l'estimador més petites es trobin emmascarades per els altres efectes i no es puguin observar amb significança.

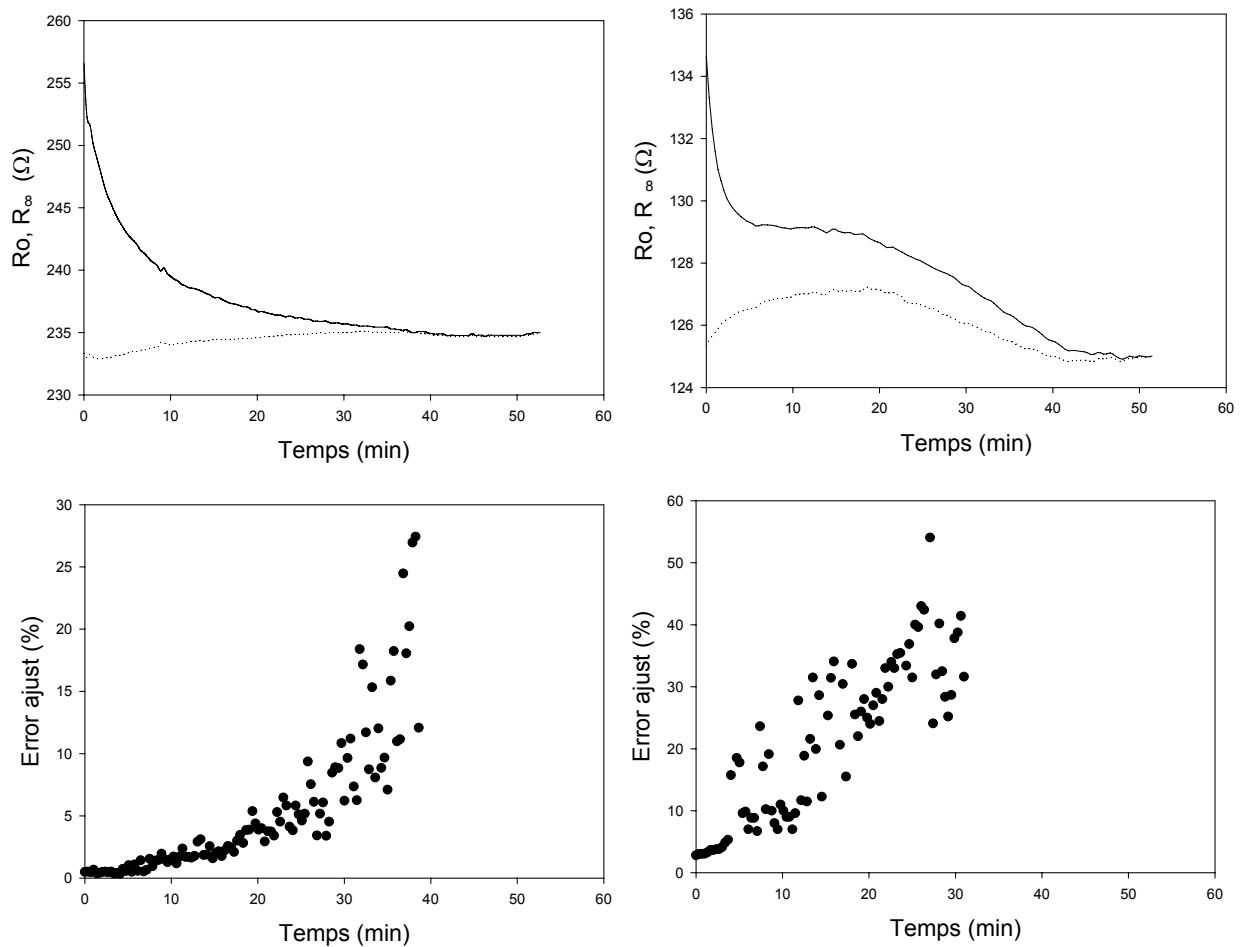


Figura 4.44 Evolució del seguiment del procés de desenganxament cel·lular al model de Cole-Cole a 2 fils (esquerra) i a 4 fils (dreta). Determinació al llarg del temps, del mòdul de la impedància per a R_o , (superior, —), per a R_∞ (superior, ...). A la part inferior es representa l'evolució de l'error obtingut pel model.

Amb els errors de l'ajust, es pot observar com l'ajust de les mesures realitzades a 2 fils al model de Cole-Cole comporta un error menor que l'ajust al model de les mesures realitzades a 4 fils. Aquest fet es dona a causa de que, tot i que les mesures d'impedància a 2 fils es trobin més emmascarades que les realitzades a 4 fils i, per tant, comportin un error superior en les seves mesures, al modelitzar aquests perfils d'impedància a l'equació de Cole-Cole, les mesures a 2 fils no tenen tanta dependència de la morfologia cel·lular com les mesures a 4 fils, de manera que els semiarc obtinguts en el diagrama de wessel són més ideals per a les mesures realitzades a 2 fils i, per tant, comporten errors d'ajust menors a les mesures realitzades a 4 fils.

A més, la determinació d'aquests valors teòrics de les parts capacitives i resistives de la impedància, permet el càlcul de l'estimador de concentració cel·lular E_2 , agafant la impedància a freqüència 0 per a la impedància a baixa freqüència i la impedància a freqüència infinita per a la impedància a alta freqüència. Tot i que el procés es realitza a concentració cel·lular constant i, per tant, no s'hauria d'observar canvis en l'estimador, aquest es troba influenciat en major part per la variació de la morfologia cel·lular en la mesura a 4 fils i per la variació de l'adherència en la mesura a 2 fils. Els perfils de l'estimador E_2 al llarg del temps s'han representat a la figura 4.45.

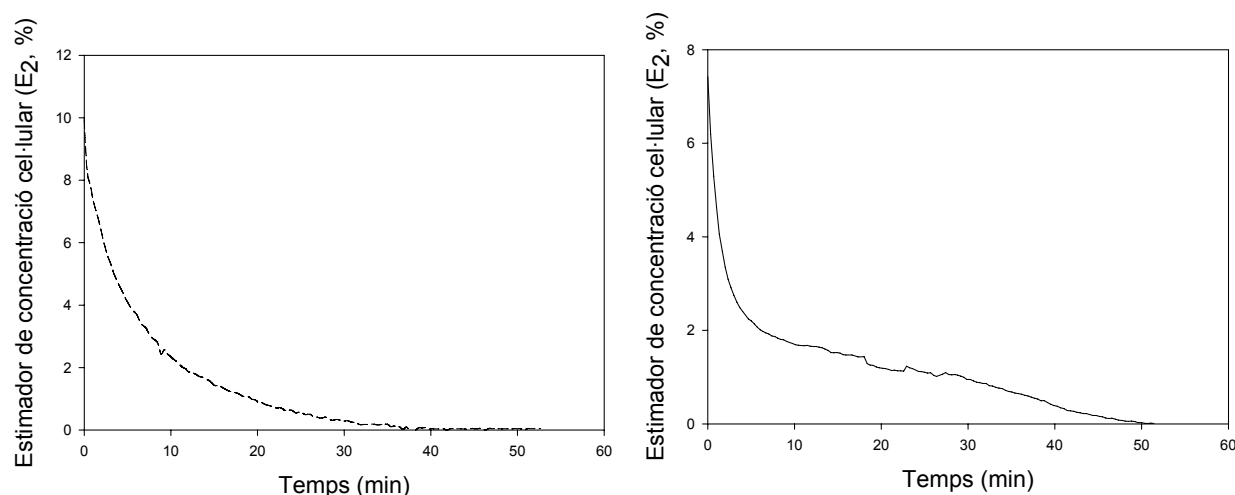


Figura 4.45 Evolució de l'estimador de concentració cel·lular E_2 al llarg del desenganxament cel·lular per a les configuracions de mesura a 2 fils (esquerra) i a 4 fils (dreta).

Es pot observar com el valor de l'estimador va disminuint a velocitat constant (cinètica de 1er ordre) per a la mesura a 2 fils, deixant de mesurar variacions cel·lular un cop aquestes es troben desenganxades completament de l'elèctrode de mesura (perfil pla a partir del minut 35), mentre que per a les mesures a 4 fils es pot observar com la major part del desenganxament cel·lular es troba concentrat en els primers 5 minuts, moment en que les cèl·lules ja no es troben tant escampades per la superfície de creixement i la variació morfològica de les cèl·lules no es tant pronunciada. Al no trobar-se tant influenciades per la pròpia impedància dels elèctrodes ni de l'adhesió de les cèl·lules en les mesures realitzades a 4 fils, un cop les cèl·lules es troben desenganxades, encara es poden mesurar variacions de concentració, obtenint una petita disminució final en la mesura deguda a l'agrupament de cèl·lules entre elles (figura 4.42, fotos 4-6) disminuint la quantitat de membrana citoplasmàtica que es veu afectada per el corrent i per tant el valor de l'estimador de concentració cel·lular.

Els altres dos paràmetres del model de Cole-Cole (freqüència central de relaxació i paràmetre α), són els que es veuen més influenciats per la morfologia cel·lular. Si ens fixem primerament en la freqüència central

de relaxació, que en el diagrama de Wessel seria la freqüència corresponent al valor absolut més elevat de la part imaginària de la impedància, aquesta té relació amb la grandària cel·lular, tal i com ja s'ha vist anteriorment (figura 4.39). A la figura 4.46, s'han representat els perfils de la freqüència central de relaxació al llarg del procés de desenganxament del cultiu de cèl·lules animals adherents obtinguts a partir de la modelització.

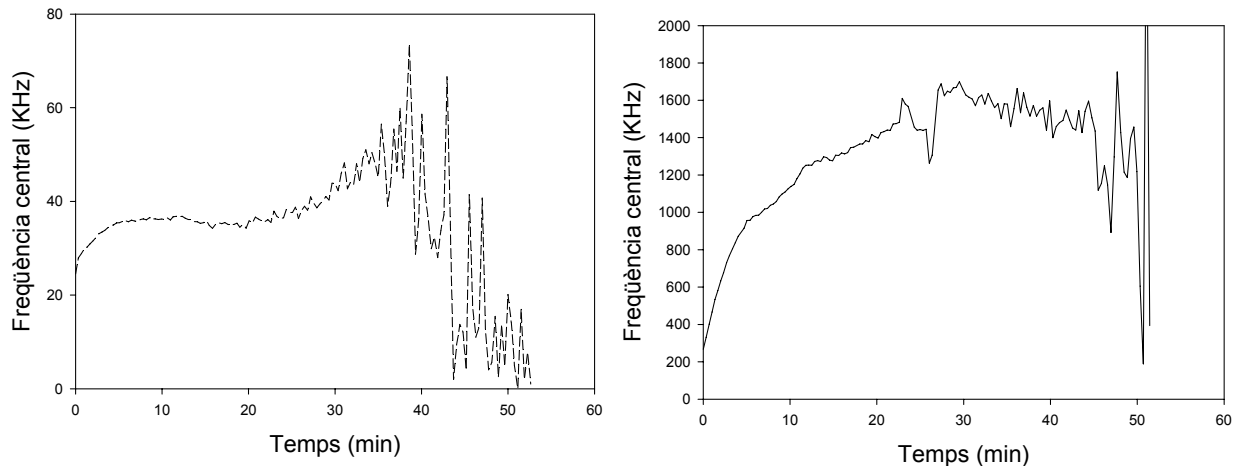


Figura 4.46 Evolució de la freqüència central de relaxació al llarg del desenganxament cel·lular per a les configuracions de mesura a 2 fils (esquerra, - -) i a 4 fils (dreta, —). A partir dels 30-40 minuts, l'error de l'ajust del model es fa massa elevat impossibilitant la estimació del paràmetre mesurat.

Es pot observar que en el perfil de les mesures a 2 fils (esquerra) que, tot i tenir una petita variació de la freqüència central al inici del procés de desenganxat, pràcticament no hi ha variació del paràmetre al llarg dels 30 minuts de durada del procés, moment en que els errors de l'ajust ja són molt elevats. Per altra banda, si s'observa el perfil obtingut per a les mesures del paràmetre realitzades a 4 fils, la mesura de la freqüència central passa de valors de pocs centenars de KHz, que correspon a valors típics per a cultius de cèl·lules animals adherents (tal i com s'ha mostrat al principi d'aquest apartat), fins a 1500 KHz que correspon a un valor típic de cèl·lules animals en suspensió. A partir d'aquest moment, la morfologia de les cèl·lules ja no varia significativament, fent que les dades incorporin un error massa elevat a causa de la semblança de l'estat del procés respecte a l'estat final al que s'ha fet el calibrat.

Finalment, l'últim paràmetre a estudiar del model de Cole-Cole és el paràmetre α , que té relació amb la idealitat de la capacítancia de la membrana cel·lular i que queda representat en el diagrama de Wessel com a la deformació del semicercle que generen les dades d'impedància, també aporta informació de la morfologia de les cèl·lules del cultiu, concretament sobre la esfericitat de les cèl·lules. Teòricament doncs, si es tingués un cultiu de cèl·lules esfèriques iguals, el valor del paràmetre un cop calibrat respecte una mesura coneguda d'impedància, agafaria un valor 0, mentre que agafaria un valor al voltant de 0.2 per a

cultius de cèl·lules arrodonides però desiguals i allunyant-se a mesura que l'esfera es va deformant de la idealitat (Bragós·1997). A la figura 4.47 s'ha representat l'evolució del paràmetre α al llarg del procés de desenganxament cel·lular.

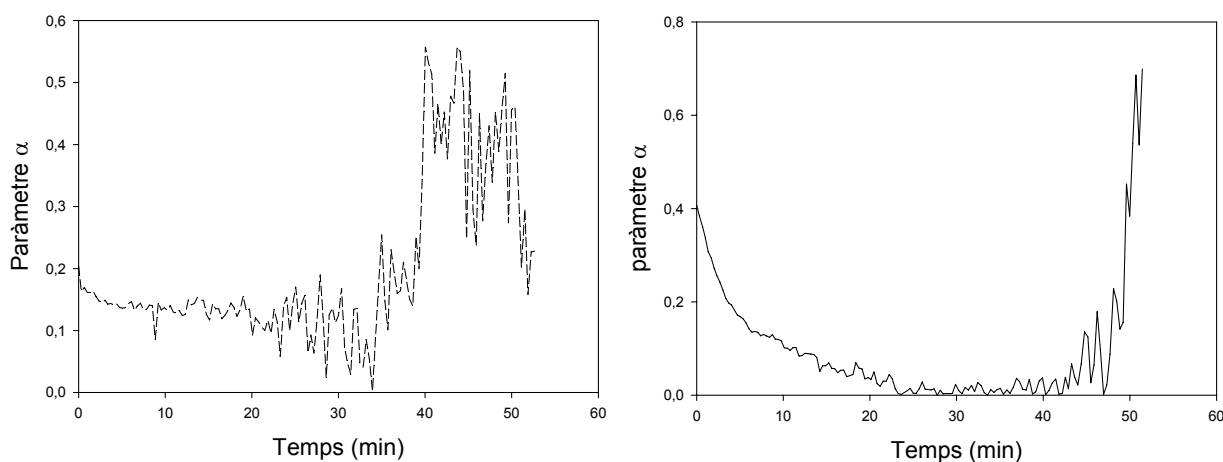


Figura 4.47 Evolució del paràmetre α al llarg del desenganxament cel·lular per a les configuracions de mesura a 2 fils (esquerra, - -) i a 4 fils (dreta, —). A partir dels 30-40 minuts, l'error de l'ajust del model es fa massa elevat impossibilitant la estimació del paràmetre mesurat.

Es pot observar altre cop que la mesura a 2 fils no aporta informació clara sobre la morfologia de la cèl·lula, on l'única variació significativa del paràmetre es pot atribuir a l'augment de l'error en l'ajust del model. En canvi, a la mesura a 4 fils es pot observar com durant els 30 minuts en els que es van desenganxant les cèl·lules, el valor del paràmetre va disminuint fins a establir-se en un valor del paràmetre pròxim a 0. Aquest fet no indica que les cèl·lules tinguin una morfologia cel·lular esfèrica perfecte, ja que les mesures s'han calibrat respecte la mesura final del procés en comptes d'una mesura del medi sense la presència de cèl·lules. Aquest fet fa que un valor del paràmetre α igual a zero signifiqui que la morfologia de les cèl·lules ja és igual a la morfologia del final del procés (que teòricament s'hauria de situar a valors aproximats al 0,2. Per tant, el perfil obtingut indica que la morfologia de les cèl·lules s'ha anat arrodonint (el paràmetre ha anat baixant) amb una velocitat major en els primers 5 minuts del procés, fins a aproximadament al minut 30, en que les cèl·lules ja es troben en el mateix estat que al final del procés i a partir d'aquest moment, l'error de l'ajust del model fa que la mesura del paràmetre sigui errònia.

4.11 LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR

El desenvolupament del sistema d'estimació de la concentració cel·lular a partir de l'espectroscòpia d'impedàncies ha permès el seguiment de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents d'una manera fiable i robusta, sense que el sistema tingui cap efecte significativament negatiu

pel creixement de les cèl·lules. Amb el sistema de mesures a 4 fils i amb l'estimador de concentració cel·lular E_2 , s'ha pogut minimitzar les interferències de la mesura provinents dels canvis al llarg d'un cultiu en la conductivitat del medi, de la impedància dels propis elèctrodes, de l'adhesió de les cèl·lules a la superfície de la xarxa de microelèctrodes, així com la possibilitat d'estimació de la concentració cel·lular un cop el cultiu arriba a confluència. A més, amb l'evolució del sistema de cultiu cap a l'interior de minibioreactors, permetrà el funcionament conjunt amb altres sensors per a la mesura de paràmetres clau dels cultius cel·lulars, com la mesura de l'activitat.

Finalment, s'ha comprovat amb el seguiment d'un cultiu de cèl·lules *vero*, que la sensibilitat de la mesura és molt bona, permetent les mesures en un rang molt ampli de concentració cel·lular. A més a més, amb el sistema de mesura a 4 fils també s'ha dotat al sistema d'una mesura de la morfologia de les cèl·lules a través de la parametrització de les mesures d'impedància obtingudes amb el model de Cole-Cole. S'ha comprovat la funcionalitat i la sensibilitat de la mesura de la morfologia cel·lular a través del seguiment del procés de desenganxament cel·lular d'un cultiu confluent de cèl·lules *vero* amb l'eliminació del sèrum del medi.

Havent desenvolupat un sistema d'estimació de la concentració cel·lular a partir de l'espectroscòpia d'impedàncies, el principal problema del sistema de mesura és l'econòmic. Tot i que la producció de la placa de control i mesura de la impedància no suposa una gran inversió, el fet que es necessiti un sistema de xarxes de microelèctrodes (IMEs) amb molta precisió a l'interior del cultiu, fa que el preu del muntatge augmenti considerablement. El fet que la majoria de cultius de cèl·lules animals adherents necessiten de tecnologies d'un sol ús que permetin assolir una qualitat alta fa que el reaprofitament dels IMEs no sigui possible, impossibilitant-ne la seva producció a gran escala i limitant-ne la seva utilitat a una necessitat específica. Per a poder incorporar la mesura de la concentració cel·lular de manera regular en cultius juntament amb altres sensors de mesura de paràmetres del cultiu, necessitaria l'optimització d'aquests costs de matèria primera, amb la pròpia fabricació de pous de cultiu amb els microelèctrodes implantats durant el procés de producció. Així doncs en els capítols que prossegueixen, només s'utilitzarà el sistema de mesura de la impedància quan no es pugui obtenir un perfil de la concentració cel·lular a partir dels sistemes de mesura de l'activitat cel·lular desenvolupats al capítol anterior.

CAPÍTOL 5

APLICACIONS EN CULTIUS CEL·LULARS

Tal i com ja s'ha comentat a la introducció, el cultiu de les cèl·lules animals, i en concret de les cèl·lules animals adherents, disposa d'una gran varietat d'aplicacions amb un gran potencial, que fa necessària la disponibilitat d'un sistema de monitoratge de la concentració i/o activitat cel·lular per tal de poder optimitzar els diferents processos de que es componen aquestes teràpies. Així doncs, seguidament es procedirà al seguiment dels principals processos de cultiu de cèl·lules animals adherents, és a dir, processos de caracterització del creixement cel·lular sobre plàstic, de caracterització d'efectes citotòxics de molècules sobre els cultius confluents i de caracterització del creixement cel·lular sobre suports polimèrics (microsuports) per a produccions de biomolècules, virus per a vacunes o vectors per a teràpies gèniques. Aquest seguiment es realitzarà mitjançant el sistema de monitoratge de l'activitat cel·lular (OURs) desenvolupat al llarg del tercer capítol, per observar els resultats obtinguts i les necessitats que se'n deriven.

5.1 CARACTERITZACIÓ DEL CREIXEMENT CEL·LULAR

Tant a nivell industrial com a nivell d'investigació, uns dels aspectes amb major importància del monitoratge de cultius cel·lulars recau en la possibilitat de realitzar la caracterització del creixement cel·lular a fi de poder efectuar la determinació dels diferents paràmetres cel·lulars, com la velocitat específica de creixement i les velocitats específiques de consum de substrats i de producció de productes.

D'aquesta manera, es poden conèixer més bé les necessitats de les línies cel·lulars monitorades per tal d'optimitzar-ne el seu creixement cel·lular, essent aquest, un procés molt necessari per definir els òptims

en processos per a teràpies víriques, teràpies gèniques i teràpies bioquímiques i biofarmacèutiques, en les que els productes buscats (producció de virus per a vacunes i teràpies gèniques, cèl·lules hoste per a infeccions víriques i producció de proteïnes d'alt valor terapèutic respectivament) depenen de la concentració cel·lular del cultiu. Aquestes optimitzacions, com poden ser la determinació tant del medi de cultiu òptim com de les variables físico-químiques òptimes (pH, pO₂, ...) en un procés, d'efectes de toxicitats de productes i efectes de la concentració cel·lular inicial entre altres, es basen en la comparació entre cultius cel·lulars als que es va variant, una a una, les condicions inicials. Aquesta comparació, es realitza mitjançant l'anàlisi dels paràmetres cel·lulars essent, la velocitat màxima de creixement, el principal paràmetre a considerar.

5.1.1 MESURES FORA DE LÍNIA

Així doncs, per tal d'observar el funcionament del sistema de mesura en línia desenvolupat, s'ha procedit al seguiment mitjançant mesures de concentració cel·lular fora de línia de diversos cultius cel·lulars als que se'ls ha anat variant una condició, la concentració cel·lular inicial. D'aquesta forma, es disposarà de dades per a la comparació, no només dels resultats obtinguts a partir dels seguiments en línia de la concentració cel·lular entre ells, sinó que també es podran comparar amb els resultats obtinguts fora de línia. La línia cel·lular utilitzada serà la línia cel·lular *vero*, línia cel·lular recomenada per la *World Health organization* (WHO·1987a; WHO·1987b) i àmpliament utilitzada per a la producció de virus per a vacunes i investigació de vacunes noves i en teràpies gèniques (Gao *i col.*·2008; Kistner *i col.*·2007; Nielsen *i col.*·2008; Rourou *i col.*·2007; Tartour *i col.*·2000).

Per a realitzar aquestes mesures fora de línia, s'efectuarà el seguiment de cultius de cèl·lules *vero* a unes concentracions inicials bastant diferenciades entre elles. Així, les concentracions inicials a caracteritzar el creixement són de $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ i $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² aproximadament. Els cultius es realitzaran en plaques de 6 pous a condicions estàndards de cultiu i s'efectuaran recomptes de concentració cel·lular per triplicat (destrucció de 3 pous de cultiu per inòcul i mesura) cada 24 hores aproximadament.

Els perfils dels creixements obtinguts per a cada inòcul, que s'analitzaran més profundament a l'apartat 5.1.5 amb els resultats dels monitoratges realitzats en línia, es troben representats a la figura 5.1 (esquerra), juntament amb les línies de tendència exponencial (dreta) utilitzades per a la mesura de la velocitat màxima de creixement (valors a la taula 5.1).

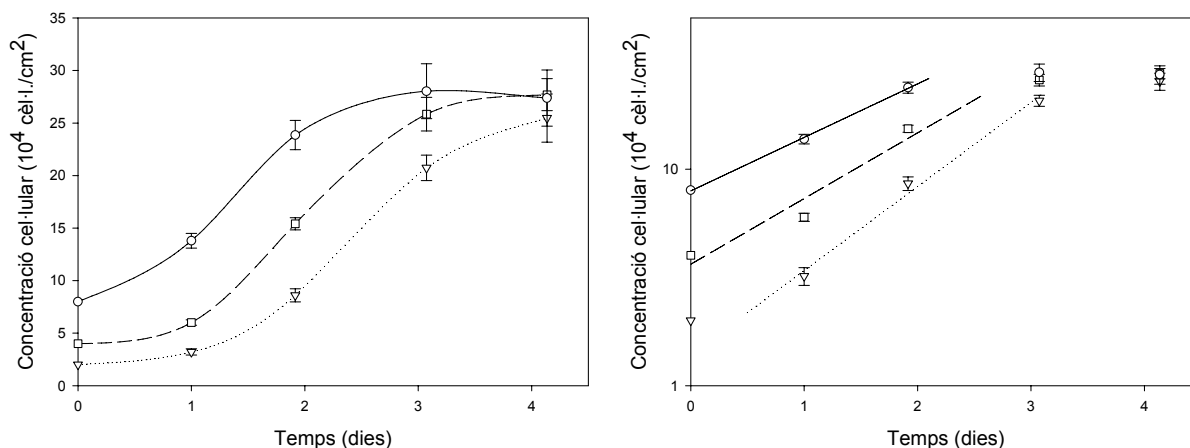


Figura 5.1 Perfils de concentració cel·lular al llarg dels cultius de cèl·lules vero a diferents inòculs mesurats fora de línia (esquerra). Els inòculs seguits són de $2 \cdot 10^4$ (línia $\cdots$ i símbol ∇), $4 \cdot 10^4$ (línia $- -$ i símbol $\square$) i $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (línia $-$ i símbol $\circ$). A la dreta es troben representades les rectes de tendència usades per a la mesura de les velocitats puntuals màximes de creixement per a cada un dels inòculs utilitzats (valors a la taula 5.1).

Si s'analitzen els resultats obtinguts, el primer que es pot observar visualment dels perfils de concentració cel·lular obtinguts és que la fase de latència present en els diferents creixements és superior per aquells cultius amb menor concentració cel·lular inicial (figura 5.1, esquerra). Tot i aquestes diferències, els cultius arriben a la mateixa concentració final, arribant aproximadament a un valor de $25\text{-}30 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², essent valors típics pels cultius de cèl·lules vero confluents en plaques de 6 pous (obtinguts anteriorment al llarg de l'apartat 3.3.1 del capítol de mesura de l'activitat cel·lular).

Taula 5.1 Valors de les velocitats puntuals màximes de creixement per a cada un dels inòculs utilitzats a partir de les mesures fora de línia de la concentració cel·lular, juntament amb els corresponents temps de duplicació.

Concentració inòcul	μ (d ⁻¹)	t_{dup} (hores)
$2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm ²	0,89	18,7
$4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm ²	0,70	23,8
$8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm ²	0,57	29,3

Si s'observen les velocitats puntuals màximes de creixement obtingudes, de 0,89, 0,70 i 0,57 d⁻¹ pels inòculs de $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ i $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² respectivament, es pot veure que els cultius cel·lulars es troben influenciats segons la concentració inicial a la que es troben inoculats, de manera que la màxima velocitat puntual a la que arriben és inferior a mesura que l'inòcul va augmentant. Aquest fet indica que un inòcul de $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², obtenint una màxima velocitat puntual un 36% inferior a l'obtinguda per a l'inòcul de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², no és adequat per a la determinació de la velocitat màxima de creixement de la línia cel·lular, ja que es necessita que la màxima velocitat puntual a la que arribi el cultiu no es trobi

influenciada per a cap efecte que la faci disminuir i que ens proporcionaria uns resultats equivocs. Aquest mateix raonament pot ésser utilitzat pel cultiu amb un inòcul de $4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², on la màxima velocitat puntual mesura és un 21% inferior a l'obtinguda per a l'inòcul de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm².

Tot i aquestes conclusions inicials, cal tenir en compte altres aspectes importants. Un d'aquests aspectes a tenir en compte quan es realitza el seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents a partir de mesures fora de línia de concentració cel·lular és que, tot i que s'obtenen uns resultats bastants bons amb unes corbes de creixement bastant fiables, el fet que sigui necessària la destrucció del cultiu cel·lular per a poder realitzar la mesura de la concentració cel·lular present, fa necessari engegar un número molt elevat de cultius en paral·lel per a poder realitzar un seguiment acurat del cultiu (s'han utilitzat 13 cultius en paral·lel per cada un dels inòculs, 39 cultius en total), augmentant considerablement el cost de la caracterització cel·lular a realitzar i de manera que cadascun dels punts de concentració resultants prové de diferents cultius cel·lulars que es poden haver trobat influenciats per diferents aspectes al llarg del cultiu.

Aquest fet també fa que, per tal de determinar la màxima velocitat puntual de creixement en cultius de cèl·lules animals adherents, només es pugui tenir en compte un número petit de punts de concentració cel·lular que, a més, poden no trobar-se dins de la fase exponencial del cultiu al no poder diferenciar-se clarament els canvis de fase, tant el pas de la fase de latència a la fase exponencial, com el moment en que aquesta comença a estancar-se. Aquesta problemàtica es pot observar en els seguiments realitzats, en que només es disposa de tres punts pel càlcul de la màxima velocitat puntual de creixement, i on dos d'aquests tres punts poden no trobar-se a dins de la fase exponencial dels cultius.

Amb aquests resultats es pot concloure que, per tal de poder mesurar la velocitat màxima de les cèl·lules vero a partir del càlcul de la màxima velocitat puntual de creixement dels cultius, és necessària l'obtenció d'una mesura (o estimació) de la concentració cel·lular al llarg del cultiu en línia per evitar la realització d'un número massa elevat de cultius cel·lulars i per permetre la obtenció de una gran quantitat de punts de concentració cel·lular durant la fase exponencial del cultiu, així com permetre la distinció clara dels canvis de fase del cultiu. Finalment, tot i que les mesures de la màxima velocitat puntual de creixement indicaven que no és correcte realitzar la determinació de la velocitat màxima de creixement per a cultius de cèl·lules vero a partir d'inòculs de $4 \cdot 10^4$ i $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², es continuaran realitzant els seguiments a tres concentracions inicials diferents mitjançant els sistemes de monitoratge desenvolupats tant per a poder obtenir més seguiments per observar el funcionament del sistema desenvolupat, com per a poder mesurar la màxima velocitat puntual de creixement amb una millor exactitud.

5.1.2 MONITORATGE DE LA OUR

Una vegada s'han caracteritzat els creixements cel·lulars amb recomptes fora de línia, es pot procedir al monitoratge d'aquests a partir del sistema de seguiment en línia desenvolupat. Per a fer-ho, s'ha efectuat per duplicat el seguiment de cultius de cèl·lules *vero* a les concentracions inicials de $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², baixant la concentració de l'inòcul més concentrat per poder augmentar la màxima velocitat puntual a la que arriba el cultiu amb la concentració cel·lular inicial major.

Aquests seguiments, han estat duts a terme a l'interior de minibioreactors equipats amb les sondes òptiques d'oxigen desenvolupades al capítol 3, situats aquests a l'interior d'un Hexascreen (®Hexascreen C.T., descrit detalladament a l'apartat 8.4.3 de Materials i Mètodes), amb el que s'han mantingut unes condicions de cultiu estàndards i amb el que s'ha realitzat la mesura de les OUR a raó de dues per dia. Al final del cultiu, s'ha procedit al recompte de la concentració cel·lular en el mateix minibioreactor monitorat, per tal de comprovar el correcte seguiment dels diferents creixements cel·lulars. Els resultats es poden observar a la figura 5.2.

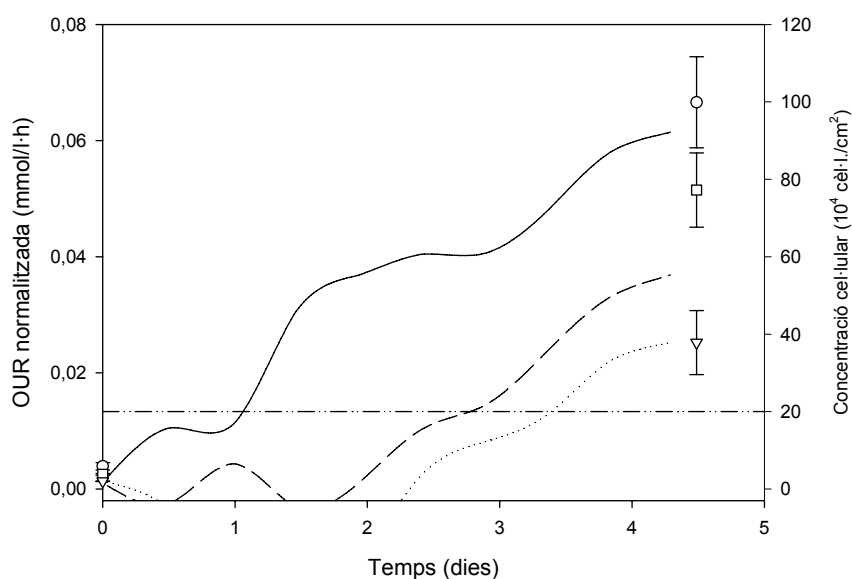


Figura 5.2 Seguiment de la velocitat de consum d'oxigen (OUR normalitzada respecte el punt inicial) al llarg de cultius de cèl·lules *vero* per a diferents concentracions cel·lulars inicials. Les concentracions inicials monitorades són de $2 \cdot 10^4$ ($\cdots$), $4 \cdot 10^4$ (—) i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules / cm² (—). Comparació amb el recompte cel·lular al final del cultiu pels corresponents seguiments d'OURs (∇ , $\square$ i $\circ$ respectivament). La línia (— · —) dibuixada indica el límit de sensibilitat considerat segons els resultats obtinguts.

Si s'observen els perfils de les OURs pels diferents creixements (normalitzades respecte el punt inicial d'OUR), es pot observar que els valors de les OURs van augmentant al llarg del cultiu, a partir de les 24 hores de cultiu pel creixement amb la concentració inicial de $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², mentre que per la resta de cultius no es pot observar un augment significatiu del valor de la OUR fins passats uns 3 dies de cultiu.

Aquest fet, tal i com ja s'ha comentat anteriorment al capítol 3, és atribuïble a una falta de sensibilitat als nivells de concentració cel·lular als que es treballa en els cultius de cèl·lules animals adherents (línia ---), que fa que la mesura de la OUR sigui una mesura més qualitativa que quantitativa.

Per a poder-ne determinar la validesa i sensibilitat dels resultats obtinguts s'ha efectuat la mesura de les concentracions cel·lulars corresponents al final del cultiu per a cada un dels creixements monitorats, obtenint que el creixement corresponent a la concentració més elevada ($6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) ja ha arribat a valors de concentració cel·lular típics de confluència per a cultius en minibioreactor (aproximadament de $100 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², valors extrets dels apartats 3.4 i 3.5), mentre que els altres creixements amb concentracions cel·lulars inicials inferiors encara es troben en fase de creixement, amb concentracions cel·lulars finals d'aproximadament 40 i $80 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² respectivament pels inòculs de 2 i $4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm². És en el cas d'aquest últim inòcul, a una concentració inicial de $4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², que els valors de la OUR obtinguts cap al final no es corresponen amb els valors dels recomptes de concentració cel·lular efectuats fora de línia al propi minibioreactor monitorat, indicant que la mesura de la OUR, tot i que permet el seguiment qualitatiu dels creixement cel·lulars de cèl·lules animals adherents, aquest sistema és insuficient quan es tracta de realitzar comparacions entre diferents cultius, on les necessitats passen per obtenir uns resultats més quantitius que permetin la determinació dels diferents paràmetres cel·lulars.

5.1.3 INTRODUCCIÓ AL MONITORATGE DEL pH

Així doncs, tot i que el sistema de mesura de la OUR aporta una informació suficientment quantitativa per a cultius de cèl·lules animals en suspensió (Gálvez·2006; Konstantinov *i col.*·1994; Lin *i col.*·2002; Soley·2010), aquest sistema només ens aporta informació qualitativa quan es tracta de creixements de cèl·lules animals adherents, on les petites concentracions cel·lulars a les que es treballa desemboquen en una falta de sensibilitat significativa. Cal, doncs, un sistema de mesura de la concentració o activitat cel·lular que permeti la comparació quantitativa entre cultius de cèl·lules animals adherents.

Tal i com ja s'ha vist anteriorment (4rt capítol), l'adequació d'un sistema de mesura directa de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents, tot i obtenir també uns bons resultats en el seguiment de cultius cel·lulars, comporten la utilització de muntatges amb un cost considerable i, per tant, no sempre es possible de dur a terme, fent necessària la búsqueda d'alternatives amb uns costos d'operació menors. Una d'aquestes alternatives es pot trobar entre els mètodes indirectes per a la mesura de la concentració cel·lular mitjançant l'anàlisi de l'activitat cel·lular, on un dels més utilitzats, tant industrialment com per a la investigació, és basa en l'evolució de la mesura o bé dels substrats presents

en el medi de cultiu o bé de subproductes del metabolisme cel·lular, tal i com ja s'ha comentat anteriorment (apartat 1.3 de la introducció).

De l'esquema simplificat de les rutes metabòliques de les cèl·lules animals, representat a la figura 5.3 (simplificació de la figura 1.8 de la introducció), es pot observar que els substrats bàsics necessaris pel cultiu de cèl·lules animals són l'oxigen, la glucosa i els aminoàcids, essent la glutamina el més important entre els aminoàcids. Per altra banda, els subproductes principals del metabolisme cel·lular animal són el lactat com a producte final de la glicòlisi i de la glutaminòlisi, el diòxid de carboni com a subproducte del cicle de Krebs i l'amoni, que es produeix durant la desaminació de la glutamina per tal de donar glutamat i en la subseqüent formació de l' α -cetoglutarat.

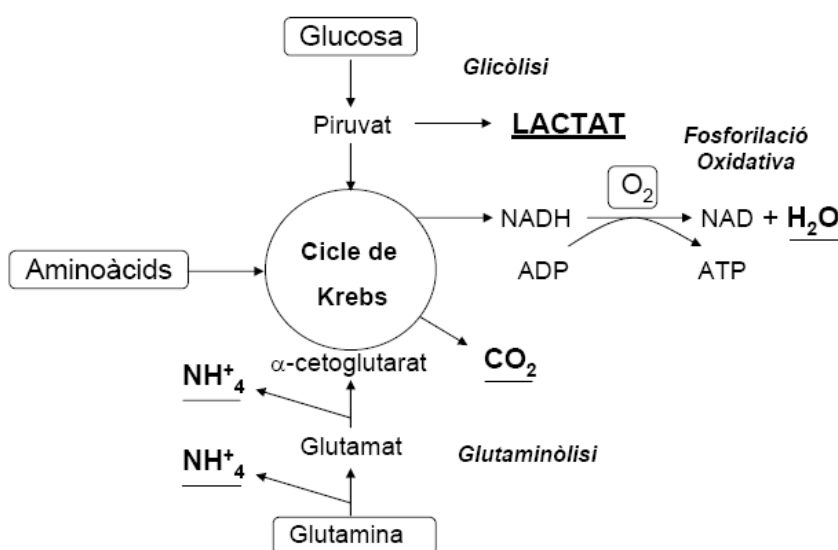


Figura 5.3 Esquema simplificat de les rutes metabòliques de la cèl·lula animal.

De tots aquests metabòlits, la mesura de l'oxigen (OUR) no ha donat una sensibilitat suficient i la mesura del diòxid de carboni (CER) pot ser més difícil que la mesura de l'oxigen (De Tremblay *i col.*·1993), de manera que es poden descartar. De la resta de substrats i subproductes, que es poden mesurar a partir de tècniques cromatogràfiques per HPLC, els substrats i subproductes més utilitzats pel seguiment de cultius de cèl·lules animals són la glucosa i el lactat (Campmajó *i col.*·1994), que es poden mesurar a partir d'anàlisis enzimàtics mitjançant un YSI 2700 Select (apartat 8.6.2 de Materials i Mètodes).

Un exemple del seguiment de la concentració de glucosa i làctic en el medi de cultiu en un creixement cel·lular es pot observar a la figura 5.4, on s'han representat els corresponents perfils d'evolució de la concentració cel·lular, la glucosa i el lactat del cultiu efectuat anteriorment (inòcul de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² de les mesures fora de línia, figura 5.1), on cada cop que es realitza la mesura de la concentració cel·lular en

un dels creixements paral·lels, també s'analitza, mitjançant l'YSI, una mostra del medi de cultiu corresponent. Per tant, s'obtenen també triplicats per a les mesures de concentració dels diferents metabòlits.

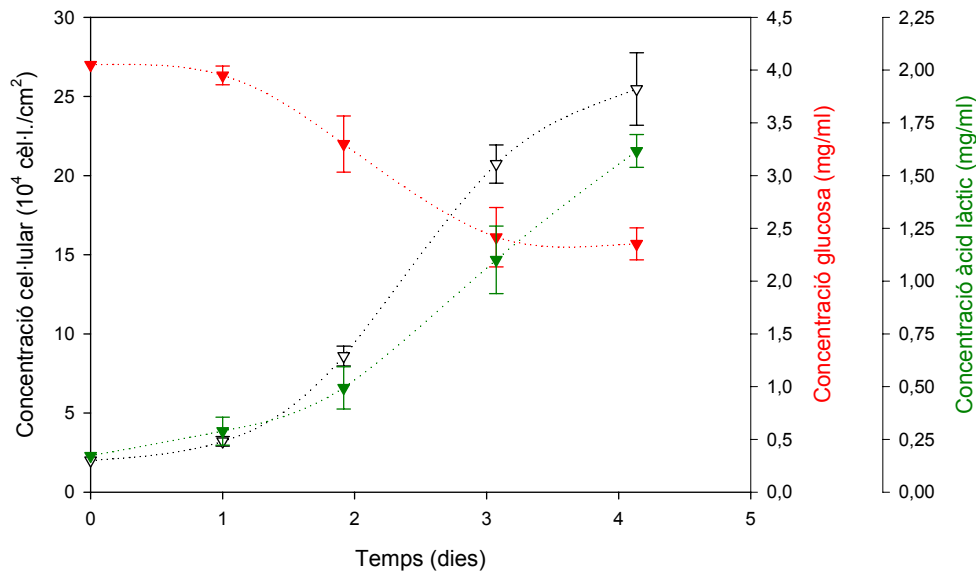


Figura 5.4 Perfils de concentració cel·lular ($\cdots, \nabla$), de concentració de glucosa ($\cdots, \blacktriangledown$) i de concentració de làctic ($\cdots, \blacktriangledown$) al llarg d'un cultiu de cèl·lules vero (creixement de la figura 5.1, inòcul de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²).

Es pot comprovar, amb el seguiments realitzats, la semblança dels perfils de concentració de làctic i de glucosa amb el perfil de concentració cel·lular al llarg del cultiu cel·lular, obtenint una primera fase durant les primeres 24 hores de cultiu amb una baixa producció de làctic i un baix consum de glucosa que corresponen a la fase de latència). Després d'aquesta fase inicial, s'obté el conseqüent creixement exponencial tant de la concentració cel·lular com de la concentració de làctic i inversament per a la concentració de glucosa. Finalment quan el cultiu es comença a estancar, es pot observar un descens del consum de glucosa i, en menys proporció, de la producció de làctic.

Amb els valors finals de concentració de glucosa quan el cultiu es comença a aturar, estancant-se a una concentració aproximada de 2,5 mg/ml a l'inici del tercer dia de cultiu, es pot observar que la glucosa no és el substrat limitant del cultiu. En el cas dels cultius de cèl·lules animals adherents, el factor limitant pot no ésser cap dels substrats del medi de cultiu, sinó que la frenada en el cultiu pot venir donada per la falta de superfície de creixement lliure per on les cèl·lules es puguin expandir. Aquest n'és el cas per a aquest cultiu, si es té en compte que la concentració cel·lular final a la que arriba el cultiu és d'unes $25 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², és a dir, un valor de concentració de confluència típic pels cultius de cèl·lules vero en plaques de 6 pous (obtinguts en la figura 5.1 i anteriorment al llarg de l'apartat 3.3.1 del capítol de mesura de l'activitat cel·lular).

Per poder observar millor i comprovar aquesta relació entre la producció de cèl·lules amb el consum de substrats, concretament amb el consum de glucosa i amb la producció de subproductes, concretament amb la producció de lactat, s'ha representat els corresponents perfils a la figura 5.5 pels tres cultius cel·lulars amb concentracions cel·lulars inicials de $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ i $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (gràfiques d'esquerra a dreta) realitzats anteriorment en l'apartat 5.1.1, cultius als que se'ls ha mesurat la concentració de glucosa i làctic present en el moment de cada un dels recomptes cel·lulars (obtenció de triplicats per a cada un dels punts i per a les mesures de concentració cel·lular, de glucosa i de làctic). Per a obtenir els perfils de producció, tant de cèl·lules com de làctic, s'ha sostret les corresponents concentracions inicials de les concentracions obtingudes en cada punt, mentre que per a obtenir el perfil de consum de glucosa s'ha sostret la concentració obtinguda en el punt en concret de la concentració inicial mesurada en el cultiu.

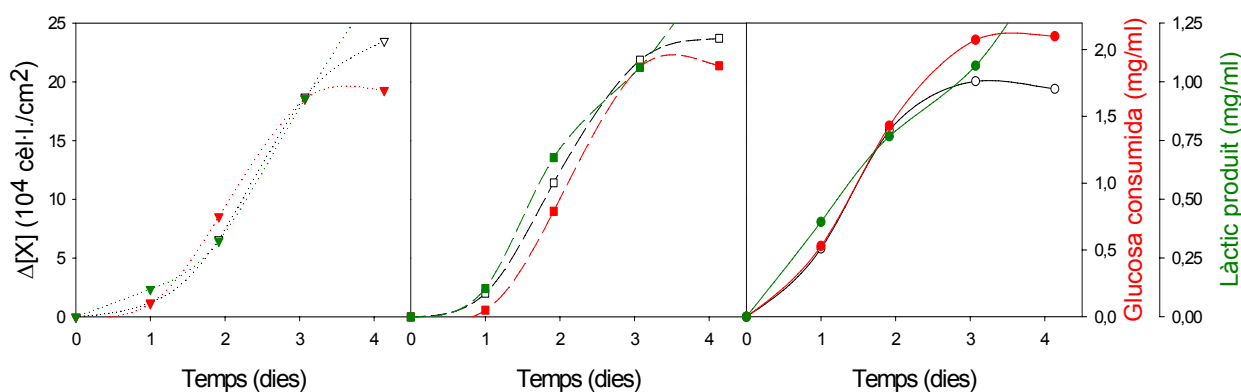


Figura 5.5 Seguiments, a partir de mesures fora de línia, de la variació de concentració cel·lular (línies en negre), de la glucosa consumida (línies en vermell) i de la producció d'àcid làctic (línies en verd) al llarg de tres cultius de cèl·lules *vero* efectuats amb inòculs de $2 \cdot 10^4$ (línia $\cdots$ i símbol ∇), $4 \cdot 10^4$ (línia $---$ i símbol $\square$) i $8 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (línia $—$ i símbol $\circ$).

Es pot observar que els perfils obtinguts de consum de glucosa i producció de làctic ressegueixen amb bastant exactitud els perfils de producció de cèl·lules, sigui quina sigui la concentració inicial del cultiu, un cop s'aplica un simple canvi d'escala per a cada un dels perfils. Aquest fet però, no s'observa al llarg de la totalitat del creixement, sinó que en la fase final del cultiu, quan aquest ja no es troba en creixement exponencial, els perfils dels metabòlits es separen del recorregut del perfil de concentració cel·lular. Aquesta separació, que es pot observar a partir del tercer dia en els cultius amb concentracions cel·lulars més baixes i a partir del segon dia pel cultiu amb la concentració cel·lular més elevada, ve donada per un canvi de metabolisme de la cèl·lula, ja que tot i que disposa de suficient medi per a continuar creixent, no disposa de suficient superfície de cultiu per a expandir-se més.

Així doncs, el seguiment de la concentració dels metabòlits, tant de la glucosa consumida com del làctic produït, podrien ésser utilitzades per a la mesura de l'activitat cel·lular, durant les fases de latència i

exponencial del creixement, pel seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents. D'aquesta manera, es podria obtenir una estimació fiable de la concentració cel·lular al llarg de la fase exponencial dels creixements cel·lulars i, per tant, es podria determinar la velocitat màxima de creixement dels cultius monitorats.

La principal problemàtica de la utilització d'aquest sistema recau en que per aconseguir la mesura en línia de la concentració d'algun dels metabòlits en concret suposa la utilització de sistemes complexos de presa de mostra i de tècniques cromatogràfiques per HPLC o d'anàlisi FIA que, a la vegada, necessiten de sistemes de filtrat de les mostres. Tot aquests aparells tornen a encarir el procés de mesura en línia de l'activitat cel·lular, a la vegada que suposen l'extracció d'una porció del volum del cultiu.

Per tal de solucionar aquesta problemàtica, s'ha de buscar una alternativa que sigui capaç de mesurar l'evolució dels metabòlits al llarg d'un cultiu amb bastant precisió i que no suposi un gran cost en equipament per a poder realitzar les mesures. La alternativa que es presenta més sòlida és la que té en compte les càrregues dels metabòlits. Aquesta alternativa es basa en que els substrats utilitzats (glucosa i glutamina com a components majoritaris) són molècules que no tenen cap tipus de càrrega i, per tant, no tenen un comportament àcid, mentre que els principals subproductes del metabolisme de les cèl·lules animals (majoritàriament l'ió amoni i l'àcid làctic) són molècules àcides. Per tant, a mesura que avança el creixement la concentració de glucosa i glutamina va disminuint, a la vegada que les concentracions d'àcid làctic i d'ió amoni van augmentant, fet fa que el pH del medi de cultiu es vagi acidificant. Aquest fet queda ratificat en els cultius de la figura 5.5, on els pH finals dels cultius (aproximadament 6.8, 7.0 i 7.2 pels cultius de major a inferior concentració cel·lular inicial respectivament) són clarament més àcids que el pH inicial del medi de cultiu, amb un pH aproximat de 7.4.

Aquets fet, fa que una mesura del pH en un cultiu de cèl·lules animals ens pugui donar informació de la quantitat de subproductes presents en el medi de cultiu i, per tant, de l'activitat cel·lular del cultiu, sempre i quan les condicions d'aeració estiguin controlades i quan les formulacions del medi siguin les adequades, sense que hi hagi exhauriments de nutrients, ja que implicarien canvis metabòlics i, per tant, una major acidificació del medi de cultiu. D'aquesta manera, es poden substituir els sistemes de mostreig i de mesura mitjançant tècniques cromatogràfiques per una sonda de pH, àmpliament utilitzada en cultius cel·lulars.

Tot i la existència de sondes de pH comercials, la necessitat d'adequació d'aquestes sondes als sistemes de cultiu utilitzats, és a dir els minibioreactors, sumat al fet que aquestes sondes són invasives i, per tant, comporten una sèrie de problemàtiques a l'hora de treballar amb sistemes de cultiu d'un sol ús, descarten

la possible adaptació d'aquestes sondes al sistema de cultiu descrit en aquest treball. Com a alternatives presents per a la mesura no invasiva del pH (per fluorescència o per absorbància), la més adequada deguda a la senzillesa d'adaptació és la mesura del pH a partir de la mesura d'absorbància del medi de cultiu en presència d'un indicador de pH, ja que no cal un desenvolupament d'una membrana amb un fluoròfor sensible a la variació de pH, ni l'adequació de cap sonda nova al sistema de cultiu per minibioreactors, al ja trobar-se desenvolupada la sonda òptica d'absorbància.

El desenvolupament d'aquesta tècnica de mesura del pH ha estat dut a terme en el propi grup d'investigació, dins el treball de tesi doctoral de l'Albert Soley en cultius de cèl·lules animals en suspensió (Soley·2010). A continuació s'exposarà breument la base de funcionament del seguiment òptic del pH i la seva adequació al cultiu de cèl·lules animals adherents.

5.1.4 SEGUIMENT ÒPTIC DEL pH

Tal i com s'acaba de comentar, el seguiment òptic de pH en cultius cel·lulars es basa en el viratge del color d'un indicador de pH a mesura que aquest va disminuint a causa de l'augment de subproductes àcids provinents del metabolisme cel·lular, com per exemple l'àcid làctic. L'indicador òptim en cultius de cèl·lules animals i, en concret les cèl·lules animals adherents és el roig de fenol, a l'haver estat utilitzat àmpliament en el cultiu de cèl·lules animals. Aquest, l'estructura molecular del qual es pot observar a la figura 5.6, presenta una forma àcida, que absorbeix a 430 nm, i una forma bàsica, que absorbeix a 560 nm.

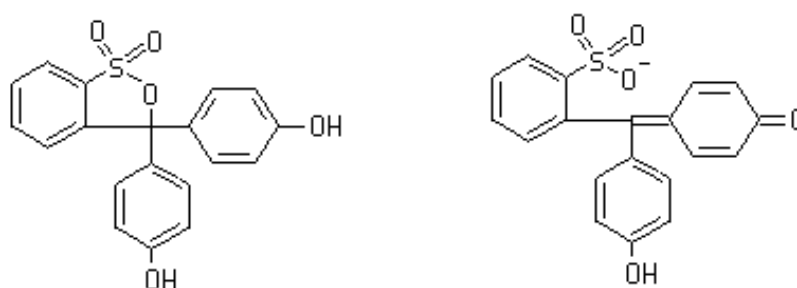


Figura 5.6 Estructures moleculars del roig de fenol en forma àcida (esquerra) i en forma bàsica (dreta).

Estudis realitzats mitjançant eines d'espectrofotometria (figura 5.7), estudiant la variació de l'absorbància d'una solució de 15 mg/L de roig de fenol en DMEM (concentració habitual d'indicador en medis de cultiu per a cèl·lules animals), han demostrat la viabilitat del roig de fenol com a indicador pel seguiment del pH.

Es pot observar com la variació del pH es veu reflectida en una variació de l'absorbància a dues longituds d'ona diferents. El primer dels pics de variació de l'absorbància, que es troba situat als 430 nm, correspon

a l'absorbància de la forma àcida de l'indicador i s'obté una variació bastant petita de l'absorbància, sobretot quan aquesta es compara amb el següent pic de variació, essent la variació d'absorbància unes 2,8 vegades superior. Aquest segon pic, que es troba situat als 560 nm i correspon a l'absorbància de la forma bàsica de l'indicador, té doncs una fiabilitat superior per a ser utilitzat pel seguiment del pH en cultius cel·lulars, fiabilitat encara més accentuada quan augmenta la turbidesa del medi, tot i que aquest augment és pràcticament inexistent en el cas del cultiu de cèl·lules animals adherents. Per tant, només s'utilitzarà la mesura de l'absorbància realitzada a 560 nm, amb una validesa ja demostrada, mitjançant un model de càlcul seqüencial.

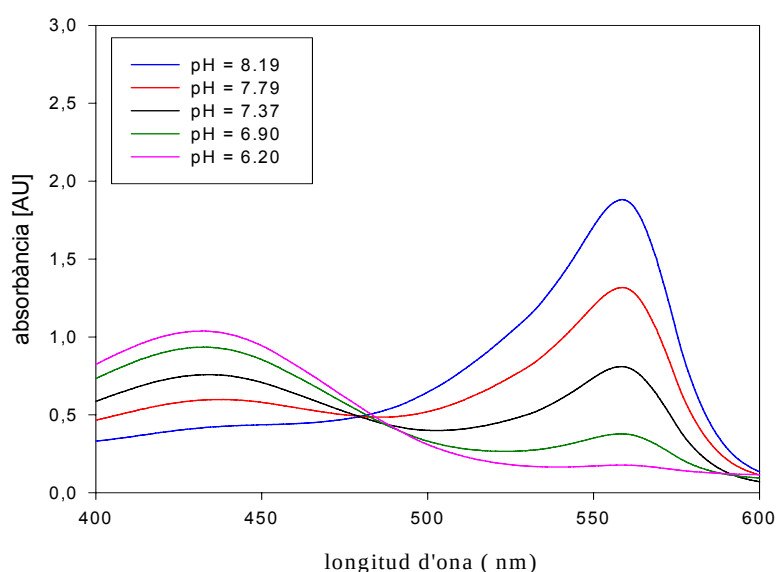


Figura 5.7 Perfils d'absorbància respecte la longitud d'ona a diferents pHs per a una solució de DMEM amb 15 mg/L de roig de fenol. L'absorció màxima per a la forma àcida es situa aproximadament als 430 nm mentre que per a la forma bàsica es situa als 560 nm. (Soley 2010)

Així doncs, el model de càlcul a utilitzar es basa en una primera mesura de l'absorbància a 700 nm, longitud d'ona a la que l'absorbància no es troba influenciada per la variació de pH i, seguidament, es realitza una segona mesura de l'absorbància a 560 nm a la que se li resta la mesura de densitat òptica realitzada a 700 nm (després de passar per un calibrat per transformar la densitat òptica de 700 nm a 560 nm) per evitar variacions de la densitat òptica del medi a causa de fragments de proteïnes o de cèl·lules mortes. Finalment, al valor resultant de la resta d'absorbàncies, se li ha d'aplicar un calibrat per a poder passar els valors d'absorbància a valors de pH.

Per adaptar doncs aquest seguiment òptic del pH en els cultius de cèl·lules animals adherents i, en concret, les cèl·lules vero utilitzades en aquest capítol, cal determinar, amb el corresponent medi de cultiu, aquest calibrat que relaciona l'absorbància mesurada en funció del pH. Per a fer-ho s'han posat 13 ml de

medi GMEM comercial suplementat amb un 10% de FBS (medi de cultiu) a l'interior d'un minibioreactor agitat i s'ha anat comparant, per a diferents pHs, les mesures d'absorbància realitzades mitjançant la sonda òptica del sistema de mesura, amb les mesures de pH realitzades en el mateix minibioreactor mitjançant una sonda comercial de pH. Per a obtenir les comparacions al llarg de tot l'espectre s'ha afegit inicialment al medi una quantitat suficient d'àcid clorhídric concentrat per arribar a un pH inferior a 5 i s'ha anat afegint gotes d'hidròxid de sodi concentrat fins a obtenir un pH superior a 10. La relació obtinguda entre l'absorbància, normalitzada respecte el valor d'absorbància pel pH més àcid, i el pH es pot observar a continuació a la figura 5.8.

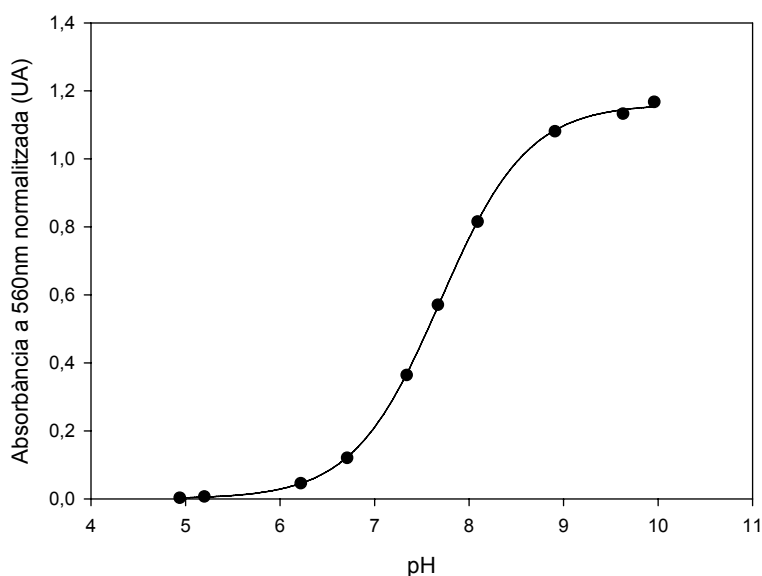


Figura 5.8 Relació entre l'absorbància mesurada a 560 nm i el pH corresponent. L'absorbància es troba normalitzada respecte el valor d'absorbància corresponent al pH més àcid.

Es pot observar que la relació resultant no és lineal, sinó que segueix una tendència sigmoïdal que s'ajusta perfectament a una regressió sigmoïdal de 4 constants, amb un coeficient de regressió de 0,9996. L'equació que relaciona l'absorbància a 560 nm amb el pH del medi a través de les quatre constants es troba representada a continuació:

$$Abs(560nm) = Abs_0 + \frac{a}{1 + \exp\left(-\frac{(pH - pH_0)}{b}\right)} \quad [\text{Eq. 5.1}]$$

on:

a és el paràmetre que ens indica l'amplitud d'absorbància obtinguda. $a = 1.317$ UA

b és el paràmetre que ens indica l'amplitud de pH mesurable. $b = 0.425$

pH_0 és el paràmetre que ens indica el valor de pH central de la sigmoïdal. $pH_0 = 7.474$

Abs_0 és el paràmetre que ens indica el valor d'absorbància central de la sigmoïdal. $Abs_0 = -0.612$ UA

Amb aquests paràmetres i efectuant el blanc òptic al pH inicial, que és conegut experimentalment per a cada medi mitjançant una mesura fora de línia estabilitzada a les condicions de treball utilitzades (37°C i atmosfera d'aire amb el 5% de CO₂), ja es poden realitzar mesures en línia del pH en cultius cel·lulars a partir de les mesures de l'absorbància a 560 i 700nm i l'aplicació d'aquesta fórmula que relaciona l'absorbància a 560nm modificada amb el valor del pH del medi.

5.1.5 MONITORATGE DEL pH

Així doncs, ja es pot procedir a la repetició de l'experiment de l'apartat 5.1.2 de cultius de cèl·lules *vero* a diferents inòculs ($2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) per a poder veure si el sistema de mesura del pH ens permet realitzar un seguiment quantitatiu del creixement cel·lular i ens permet la determinació dels paràmetres de cultiu, necessaris per a la comparació dels diferents creixements. Les condicions de l'experiment s'han mantingut constants, amb el monitoratge dels cultius per duplicat de cada una de les tres concentracions cel·lulars inicial, però s'ha realitzat el seguiment del pH (a partir d'una mesura cada 5 minuts) en comptes de realitzar mesures de la velocitat de consum d'oxigen. El perfil resultant de pH es pot observar a continuació a la figura 5.9.

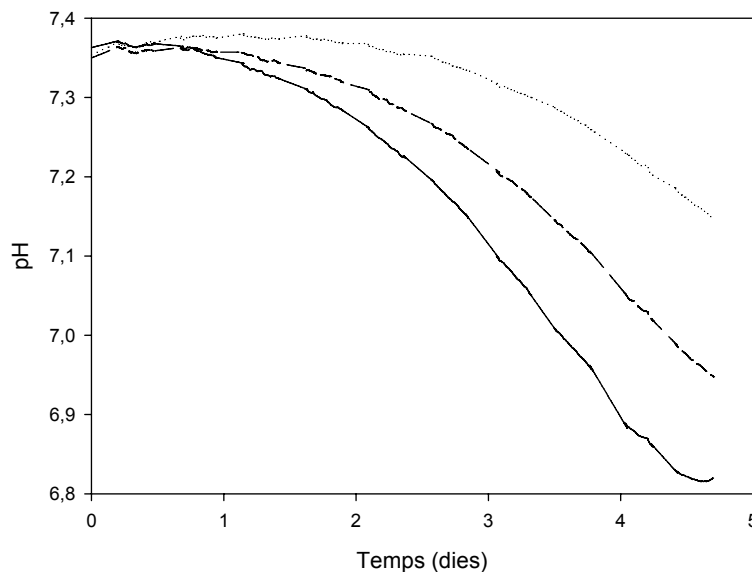


Figura 5.9 Seguiment del pH al llarg de cultius de cèl·lules *vero* per a diferents concentracions cel·lulars inicials. Les concentracions inicials monitorades són de $2 \cdot 10^4$ (···), $4 \cdot 10^4$ (—) i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules / cm² (—).

A partir dels perfils de pH obtinguts, es pot observar que s'obtenen unes corbes amb una sensibilitat molt bona, on a mesura que s'augmenta la concentració cel·lular inicial, els cultius arriben a uns valors de pH més àcids al final del cultiu. Es pot observar doncs que el cultiu de concentració cel·lular inicial més baixa ($2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) arriba a un valor de pH de 7,15 al final del cultiu, mentre que el cultiu de concentració cel·lular inicial mitja ($4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) arriba a un valor de pH de 6,95 i, finalment el cultiu amb la

concentració cel·lular inicial més elevada ($6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) arriba a un valor de pH de 6,82. Per aquest últim cultiu, es pot observar a més a més, que cap al final del cultiu, aproximadament als 4,5 dies de cultiu, hi ha un estancament del pH indicant que l'activitat cel·lular del cultiu ha decaïgut, essent la falta de superfície de creixement amb l'arribada del cultiu a confluència la causa més probable tal i com es comentarà posteriorment, mentre que aquest estancament no s'ha observat en la resta de cultius amb una concentració cel·lular inicial inferior.

Pel que fa a la exactitud de la mesura obtinguda, aquesta és molt bona, amb una desviació de 0,07 pel punt inicial respecte la mesura de pH del medi de cultiu temperat a 37°C i amb una atmosfera del 5% de CO₂, mentre que pels punts finals s'obté una desviació mitjana, respecte les mesures fora de línia realitzades un cop finalitzat el cultiu cel·lular mitjançant un pH-metre comercial, de 0,11.

Per a poder determinar els diferents paràmetres de cultiu, cal realitzar però un calibrat que ens permeti passar de l'actual perfil de pH, a un perfil de concentració cel·lular al llarg del temps. Per a realitzar doncs aquest calibrat, s'ha efectuat el seguiment del pH per a diferents cultius amb diferents concentracions inicials i durades de cultiu, és a dir, amb diferents variacions de concentració final. Als cultius efectuats, se'ls ha mesurat la variació de pH obtinguda mitjançant les sondes de pH del sistema i s'ha relacionat amb la variació de concentració cel·lular obtinguda amb el creixement cel·lular, variació mesurada a partir dels recomptes de concentració cel·lular efectuats al final dels cultius. El calibrat resultant es pot observar a la figura 5.10.

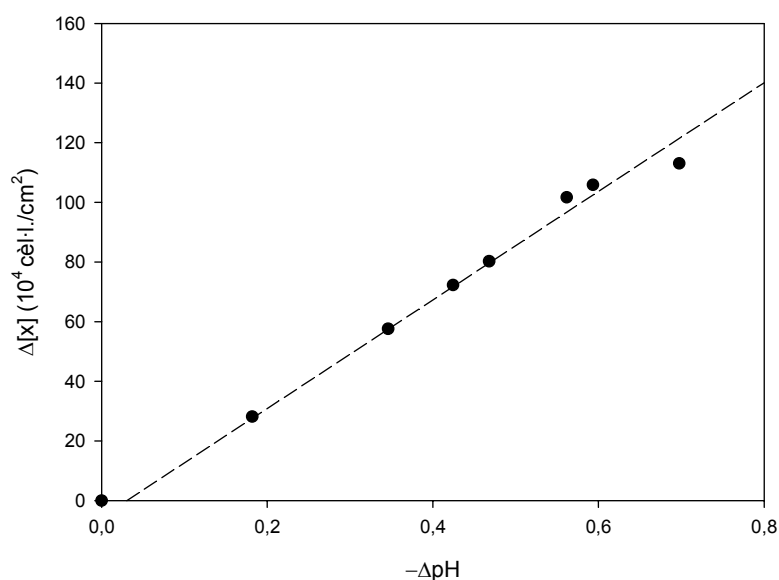


Figura 5.10 Recta de calibratge entre la variació de concentració cel·lular obtinguda i la variació de pH mesurada amb les sondes del sistema, a partir de cultius de cèl·lules *vero* realitzats en minibioreactors a diferents inòculs i diferents temps de cultiu.

Es pot observar amb el calibrat efectuat, que la relació entre l'augment de concentració cel·lular obtinguda als cultius cel·lulars i la variació de pH dels mateixos és lineal, a raó de $1,82 \cdot 10^6$ cèl·lules/cm² per unitat de pH, correlació amb un coeficient de regressió de 0,9955, indicant que aquest mètode de seguiment en línia de l'activitat cel·lular pot donar una informació suficientment quantitativa.

Així doncs, mitjançant els perfils de pH obtinguts anteriorment al llarg dels cultius cel·lulars a diferents inòculs s'obtenen els perfils de concentració cel·lular al llarg del creixement (figura 5.11). Per comprovar la fiabilitat dels resultats obtinguts s'han representat, al final del cultiu, les concentracions cel·lulars mesurades fora de línia mitjançant recomptes cel·lulars dels mateixos minibioreactors monitorats.

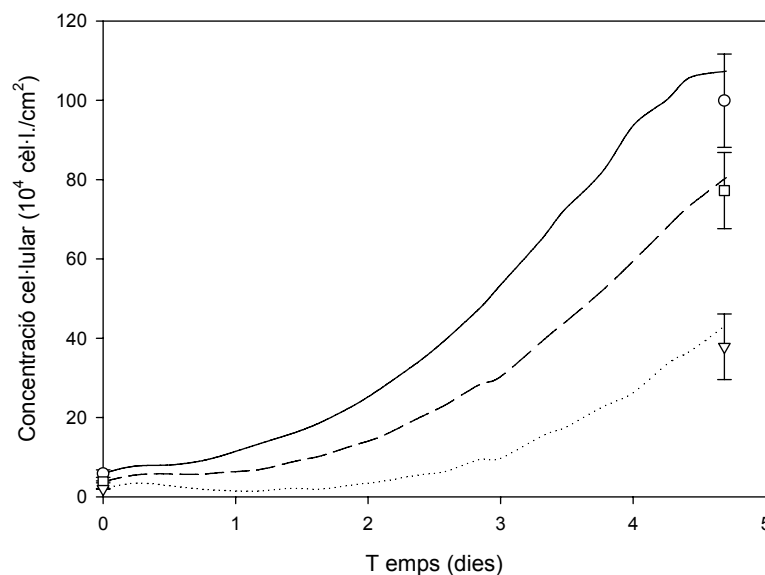


Figura 5.11 Perfils de concentració cel·lular obtinguts a partir del perfil de pH mesurat al llarg dels cultius de cèl·lules *vero* a diferents inòculs, pels inòculs de $2 \cdot 10^4$ (···), $4 \cdot 10^4$ (—) i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules / cm² (—). Comparació dels seguiments de concentració cel·lular obtinguts amb els recomptes cel·lulars dels minibioreactors monitorats realitzats fora de línia al final del cultiu (▽, □ i ○ respectivament).

Comparant doncs les concentracions estimades i recomptades, es pot comprovar la compatibilitat entre els resultats obtinguts, on l'error obtingut en el seguiment de la concentració cel·lular mesurada a partir del pH respecte les mesures de concentració cel·lular fora de línia és menor que la variabilitat del propi recompte, prenent valors 12, 4 i 7% pels cultius de $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² respectivament. Així, tal i com ja es podia preveure amb la recta de calibrat obtinguda, no només la sensibilitat d'aquest sistema d'estimació en línia de la concentració cel·lular al llarg de cultius de cèl·lules animals adherents és molt més bona que la sensibilitat de la mesura de la velocitat de consum d'oxigen, sinó que a més es poden realitzar moltes més mesures (mesures de pH cada 5 minuts respecte les 12 hores entre mesures d'OURs), i sense provocar cap alteració en el cultiu (les mesures d'OUR s'han d'efectuar en intervals espaiats de temps, ja que es tracta d'un protocol llarg amb estones amb concentracions d'oxigen molt baixes).

Si s'analitzen els perfils de concentració cel·lular obtinguts, es pot observar que pel cultiu cel·lular amb un inòcul de $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² s'arriba a un estancament del creixement a partir dels quatre dies de cultiu, estancament degut a la falta de superfície de creixement lliure, ja que ja ha arribat a valors de concentració cel·lular típics de confluència per a cultius en minibioreactor (aproximadament de $100 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², valors extrets dels apartats 3.4 i 3.5), confirmant les observacions realitzades a partir del perfils de pH dels creixements monitorats. Per altra banda, pel cultiu amb un inòcul de $4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², no és fins al final del cultiu (4,5 dies de cultiu) que el creixement es comença a veure lleugerament influenciat per la falta de superfície lliure de creixement, veient-se incapaç de seguir un perfil exponencial, mentre que pel cultiu amb un inòcul de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² es pot observar com encara es troba de ple en la fase exponencial del seu creixement.

Per a poder analitzar i comparar més detalladament els cultius de cèl·lules *vero* a diferents inòculs, s'ha mesurat la velocitat de creixement puntual al llarg dels cultius per a cada un dels inòculs diferents, velocitat puntual mesurada mitjançant les dades de concentració cel·lular incloses des dels 0,7 dies anteriors al punt de mesura de la velocitat de creixement puntual fins al mateix punt.

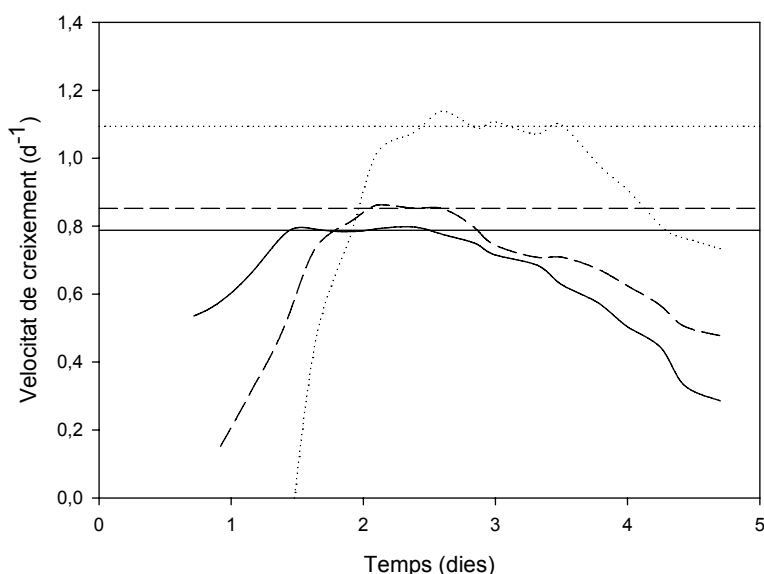


Figura 5.12 Perfils de la velocitat de creixement puntual obtinguts pels diferents cultius de cèl·lules *vero* amb inòculs de $2 \cdot 10^4$ (····), $4 \cdot 10^4$ (—) i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules / cm² (---). Les rectes corresponents indiquen la màxima velocitat de creixement puntual obtinguda per a cada un dels inòculs del promig de les velocitats puntual en la zona de màxims (valors a la taula 5.2).

D'aquesta manera, s'obtenen els perfils de la velocitat de creixement puntual al llarg dels diferents cultius (figura 5.12, corbes) que permeten la mesura de la màxima velocitat puntual de creixement per a cada un dels inòculs monitorats (figura 5.12, rectes i valors a la taula 5.2), així com la determinació del temps que tarda el cultiu a establir-se a aquesta velocitat màxima de creixement.

Taula 5.2 Valors de les velocitats puntuals màximes de creixement per a cada un dels inòculs utilitzats a partir del monitoratge del pH en cultius de cèl·lules *vero* amb diferents inòculs, juntament amb els corresponents temps de duplicació.

Concentració inòcul	μ (d ⁻¹)	t_{dup} (hores)
$2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm ²	1,09	15,3
$4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm ²	0,85	19,6
$6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm ²	0,79	21,1

Observant els perfils de velocitats puntuals de creixement obtinguts, es pot observar el mateix comportament per a tots els inòculs monitorats, amb una primera fase de latència, en que la velocitat de creixement va augmentant fins a arribar a la màxima velocitat puntual de creixement (rectes amb el format corresponent a l'inòcul monitorat), indicant-ne l'inici de la fase exponencial. Després de mantenir-se aquesta màxima velocitat de creixement al llarg de les fases exponencials dels cultius, comença a disminuir progressivament quan el cultiu es comença a veure influenciat per diferents aspectes com la disminució progressiva de la superfície lliure de creixement i de substrats i per la inhibició per contacte cel·lular en augment.

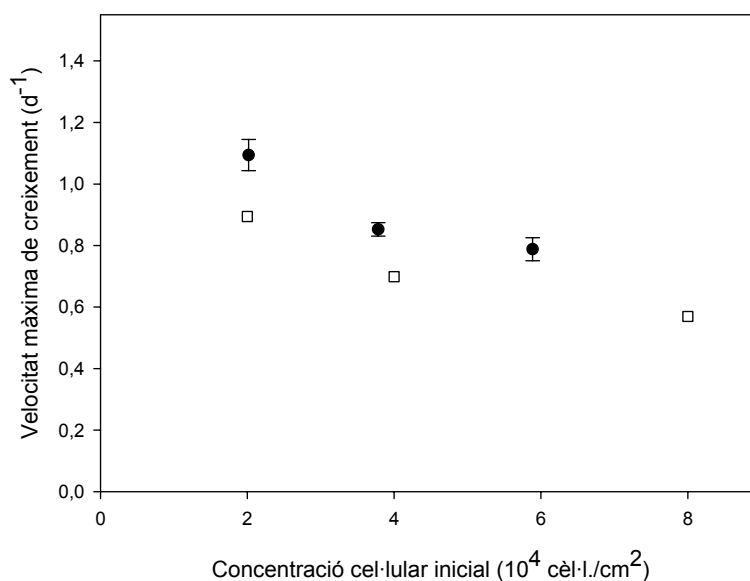


Figura 5.13 Comparació de les velocitats màximes de creixement obtingudes pels cultius de cèl·lules *vero* a partir de diferents inòculs (●) amb les velocitats màximes de creixement obtingudes a partir dels recomptes cel·lulars mesurats fora de línia (□, apartat 5.1.1).

Si es comparen els valors de les velocitats màximes de creixement pels diferents inòculs monitorats (figura 5.13, ●), es pot observar com hi ha una disminució d'aquesta velocitat màxima de creixement a mesura que la concentració cel·lular de l'inòcul va augmentant, obtenint una forta disminució de la velocitat

màxima de creixement al passar de $2 \cdot 10^4$ a $4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (disminució del 23%), i una disminució menor al passar de $4 \cdot 10^4$ a $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (disminució del 7%). Aquest fenomen de proporcionalitat inversa entre la concentració cel·lular inicial i la màxima velocitat puntual a la que arriba un cultiu, tot i no trobar-se present en els cultius de cèl·lules animals en suspensió (Ozturk i Palsson·1990), és un fet intrínsec pels cultius de cèl·lules animals adherents (Sekiya *i col.*·2002), que pateixen una inhibició per contacte cel·lular i, per tant, afecta en major grau com més elevada és la concentració cel·lular (Abercrombie i Ambrose·1962), tal i com s'exposa a continuació.

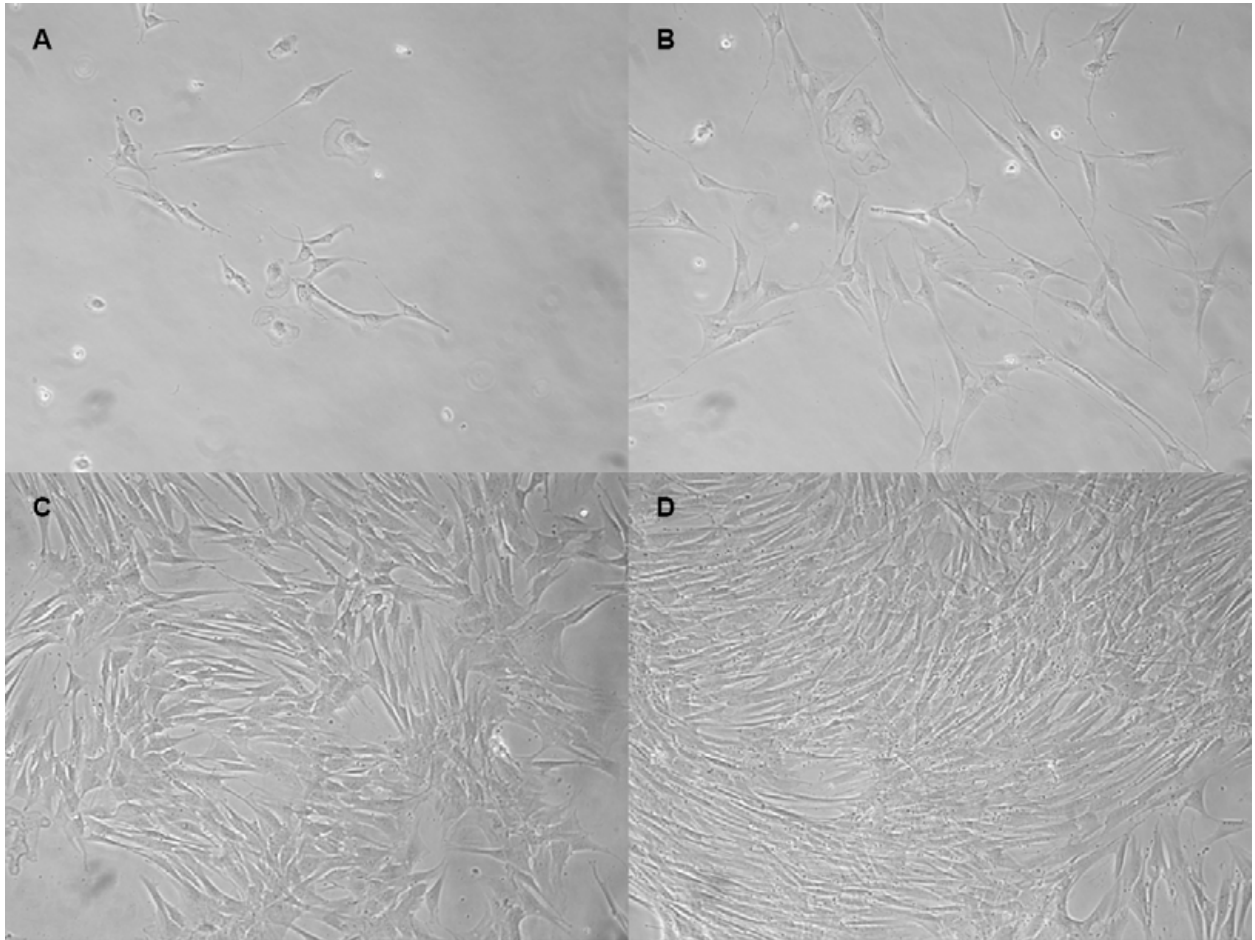


Figura 5.14 Fotografies de cultius de cèl·lules animals a diferents concentracions cel·lulars, on es poden observar els contactes cel·lulars. A, amb una concentració cel·lular baixa no hi ha pràcticament cap contacte cel·lular, podent créixer el cultiu a una velocitat màxima. B, si la concentració cel·lular augmenta, comencen a aparèixer agregats de cèl·lules en contacte, tot i que encara hi ha alguna cèl·lula aïllada. C, a més concentració, els grups de cèl·lules comencen a unir-se entre ells i ja no hi ha cèl·lules lliures. D, quan la concentració cel·lular és molt elevada, el cultiu és pràcticament un grup continu de cèl·lules en contacte entre elles (confluència), fent que el cultiu s'estanqui i pari de créixer.

Per tant, tal i com es pot observar a la figura 5.14, en un cultiu amb una concentració cel·lular baixa les cèl·lules es troben pràcticament aïllades les unes de les altres (foto A), de manera que pràcticament no es troben inhibides per contacte i, per tant, poden créixer a la seva velocitat màxima de creixement. Si la

concentració cel·lular inicial augmenta una mica (foto B), es comencen a formar grupets petits de cèl·lules que es troben en contacte, però sense tenir cèl·lules totalment envoltades per altres cèl·lules i, a més, encara es troben bastants cèl·lules aïllades d'aquests grupets. A mesura que es va augmentant la concentració cel·lular inicial, el número de grups de cèl·lules i la mida dels grups van augmentant fins a arribar a un moment (foto C) en que pràcticament ja no hi ha cèl·lules aïllades dels grups i, el número de cèl·lules que es troben totalment envoltades per altres cèl·lules es fa elevat. Això fa que es vagi incrementant progressivament la quantitat de cèl·lules que es troben inhibides per contacte cel·lular fent que la velocitat macroscòpica puntual del cultiu vagi disminuint significativament. Finalment, els grups de cèl·lules s'uneixen entre ells, quedant només alguna zona de superfície de creixement lliure (foto D), i en la que la inhibició del cultiu cel·lular per contacte és fa tant elevada que el creixement cel·lular s'atura.

Aquest fet fa que, per poder determinar la màxima velocitat de creixement d'un cultiu cel·lular, sigui necessari que el cultiu cel·lular no es trobi influenciat per aquesta inhibició cel·lular. Per tant, tal i com s'ha observat en les mesures de les màximes velocitats puntual dels cultius monitorats, els cultius amb una concentració cel·lular inicial més elevada (a $4 \cdot 10^4$ i a $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) no són adequats pel càlcul de la velocitat màxima de creixement dels cultius de cèl·lules *vero*, mentre que a partir del cultiu realitzat a una concentració cel·lular inicial menor (a $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²) ja s'obté una mesura fiable de la velocitat màxima de creixement sense influències d'inhibició per contacte.

Si continuem analitzant els resultats obtinguts i es comparen els valors de les màximes velocitats puntual de creixement obtingudes amb el monitoratge en línia amb les màximes velocitats puntual calculades a partir dels recomptes realitzats fora de línia dels cultius cel·lulars (apartat 5.1.1), es pot observar que, tot i obtenir un comportament similar respecte la concentració cel·lular inicial dels cultius, les velocitats obtingudes a partir de mesures fora de línia són lleugerament més lentes que les obtingudes mitjançant el monitoratge del pH. Aquest fet és lògic tenint en compte les problemàtiques que comporten les mesures fora de línia de concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents ja exposades anteriorment. Resumidament, aquestes problemàtiques es basen en la poca quantitat de punts de concentració cel·lular que es poden utilitzar per a determinar la màxima velocitat puntual de creixement (només s'ha utilitzat 3 punts per ajustar la línia de tendència). A més, existeixen altes probabilitats de que algun dels punts agafats no es trobi situat en la zona de màxim creixement del cultiu, sinó que es trobin situats dins de la fase de latència del cultiu o a la fase final del cultiu quan el cultiu ja s'està aturant.

Per altra banda, en el cas de les mesures de la velocitat màxima de creixement a partir de sistemes de mesura en línia de la concentració cel·lular, es disposa d'una quantitat molt elevada de punts de

concentració cel·lular per a poder determinar la màxima velocitat puntual de creixement i, a més, es pot determinar la zona de màxima velocitat de creixement amb gran exactitud, tal i com s'ha observat a la figura 5.12.

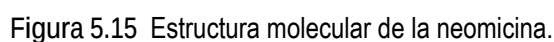
Finalment, a partir de la mesura en línia de la concentració cel·lular en un cultiu de cèl·lules animals adherents, es pot calcular també el temps de latència del cultiu amb bastant precisió. Tot i no ser un dels paràmetres més importants d'un cultiu cel·lular, aquest també és un dels aspectes a tenir en compte per a optimitzar el temps de cultiu necessari per a aconseguir el màxim creixement cel·lular, és a dir, intentant disminuir al màxim aquest temps de latència. Aquests temps s'obtenen a partir del temps que tarda el cultiu cel·lular a arribar a la velocitat màxima de creixement, als que se'ls ha restat els 0,7 dies d'interval de mesura de la velocitat puntual, ja que a l'obtenir com a velocitat puntual la màxima d'un cultiu significa que aquest cultiu ja porta els 0,7 dies creixent a aquesta velocitat. Comparant doncs la durada de la fase de latència pels diferents inòculs monitorats, s'obtenen uns temps de 1,5, 1,1 i 0,5 dies pels creixements de $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ i $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² respectivament. Tal i com era previsible, aquesta fase de latència és més llarga pels cultius amb una concentració cel·lular inicial menor (Levin·2002), fenomen conegut des de fa bastant temps, tant per a cultius de cèl·lules animals en suspensió (Sand i col··1977), com pels cultius de cèl·lules animals adherents (Hu i col··1985).

Així doncs, en resum es pot concloure que el seguiment de la concentració cel·lular al llarg d'un cultiu a partir de mesures fora de línia no és suficient per a la determinació de la velocitat màxima de creixement de cultius de cèl·lules animals adherents amb precisió. Per tant, és necessari disposar d'un sistema fiable de mesura en línia de la concentració cel·lular que permeti tant diferenciar les diferents fases del cultius, com l'obtenció de suficients punts de concentració cel·lular. Aquestes problemàtiques han quedat resoltes amb l'adequació d'un sistema de mesura de l'activitat cel·lular a partir del seguiment de l'evolució del pH que ha permès l'estimació de la concentració cel·lular al llarg de cultius de cèl·lules *vero* amb bastant exactitud i fiabilitat.

A més, amb els monitoratges en línia de diversos cultius cel·lulars a diferents concentracions cel·lulars inicials, s'ha pogut detectar que la realització de cultius de cèl·lules *vero* a una concentració cel·lular inicial de $4 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² o superior no es adequada per a la determinació de la velocitat màxima de creixement dels cultius, ja que aquests es troben influenciats per una inhibició del creixement cel·lular per contacte cel·lular de manera proporcional segons la corresponent concentració cel·lular inicial del cultiu. Per altra banda, els cultius amb una concentració cel·lular inicial de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², tot i tenir un temps de latència lleugerament superior als cultius amb concentracions cel·lulars inicials superiors, ja no es

Un altre dels processos a tenir en compte quan es tracta amb cèl·lules animals adherents, sobretot a nivell d'investigació i desenvolupament, es basa en el seguiment de cultius cel·lulars als que s'ha afegit alguna substància per determinar l'efecte que provoca sobre els diferents paràmetres de cultiu, com per exemple la velocitat de creixement, i sobretot, sobre la viabilitat del cultiu. Aquest procés és de gran importància a l'hora de testar els productes desenvolupats per teràpies biofarmacèutiques, així com en aplicacions cel·lulars com per exemple assaigs cel·lulars per a la realització de tests toxicològics o la realització d'escandalls de drogues, molècules i composts amb potencial per a ser utilitzats en la recerca contra cèl·lules tumorals entre d'altres. Aquestes processos es basen en el seguiment en paral·lel de varis cultius inoculats a una alta concentració cel·lular, normalment monocapes a confluència, als que se'ls va provant diferents concentracions d'una substància que inhibeix el creixement i/o baixa la viabilitat del cultiu.

Per comprovar doncs la funcionalitat del sistema de seguiment de la concentració cel·lular desenvolupat a partir de la mesura del pH a l'hora de monitorar aquest tipus de processos, es procedirà al seguiment de diversos cultius cel·lulars als que se'ls anirà variant la concentració d'una substància que afecta al creixement de les cèl·lules animals.



Per a aquests experiments, la substància escollida ha estat la neomicina (estructura molecular a la figura 5.15), que és un antibiòtic aminoglicòsid àmpliament utilitzat com a component en medicaments de caire tòpic pel tractament d'infeccions cutànies i que actua inhibint la síntesis de proteïnes a l'unir-se irreversiblement a la subunitat 30S dels ribosomes, fent que no pugui llegir el t-RNA i evitant que la cèl·lula pugui sintetitzar les proteïnes vitals per a la seva supervivència causant-li la seva mort.

Previ al monitoratge dels cultius cel·lulars, s'ha de determinar quines són les concentracions de neomicina a utilitzar per a poder veure la capacitat del sistema de mesura de la concentració cel·lular per seguir els diferents efectes de la neomicina en els cultius de cèl·lules animals adherents.

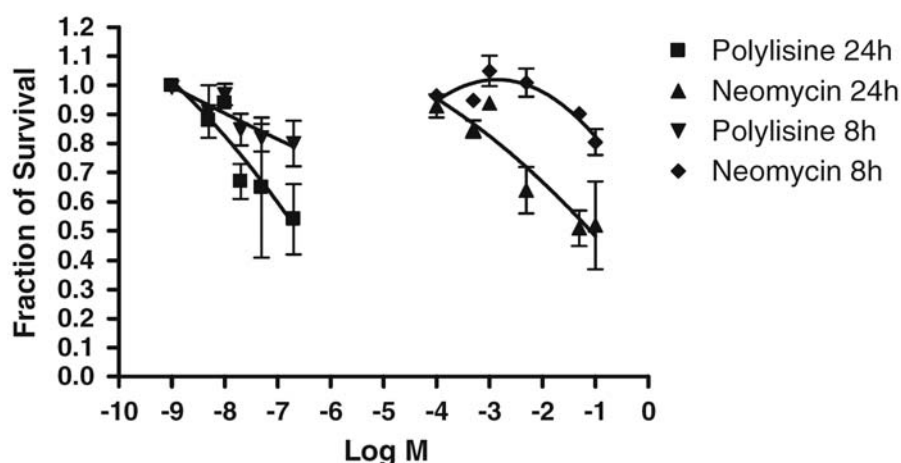


Figura 5.16 Efectes citotòxics de la Polilisina i la Neomicina (fracció de supervivència en tant per u) en cultius de cèl·lules *vero* en funció de la concentració (molaritat, log M) i del temps d'exposició de les molècules als cultius. (Aguilar i col.:2007).

Experiments bibliogràfics anteriors en cultius de cèl·lules *vero* (figura 5.16) indiquen que la viabilitat dels cultius es comença a veure afectada a partir una concentració de neomicina de 10^{-3} M (PM=392,45 g/mol) quan la neomicina es troba present com a mínim durant 24 hores de cultiu, amb una viabilitat entre el 80 i 90% respecte la viabilitat d'aproximadament el 100% per a una concentració de neomicina de 10^{-4} M. Per tal de minimitzar la quantitat de neomicina a utilitzar i abaratir al màxim l'experiment, es realitzarà un escandall inicial de la concentració de neomicina necessària per a obtenir diferents efectes quan aquesta es troba present en el medi de cultiu durant uns 3 dies.

Per a realitzar aquest escandall inicial, s'ha addicionat, a diferents cultius de cèl·lules *vero* cultivats en plaques de 6 pous a una concentració cel·lular elevada (aproximadament 10^5 cèl·lules/cm²), diferents concentracions de neomicina entre $10^{-3.5}$ M i 10^{-2} M (de 0,1 a 3,33 mg/ml de neomicina), juntament amb un control sense presència de neomicina. Al cap de 3 dies de cultiu, s'han efectuat els recomptes de concentració cel·lular, tant de les cèl·lules vives com de les cèl·lules mortes, i se n'ha calculat les viabilitats

obtingudes dels diferents cultius de cèl·lules vero. Els resultats obtinguts s'han representat a la figura 5.17, on es pot observar que la viabilitat dels cultius cel·lulars no es veu afectada per una concentració de neomicina inferior a 1 mg/ml, mentre que a partir d'aproximadament 3 mg/ml s'obté la mort del cultiu amb unes viabilitats inferiors al 20%

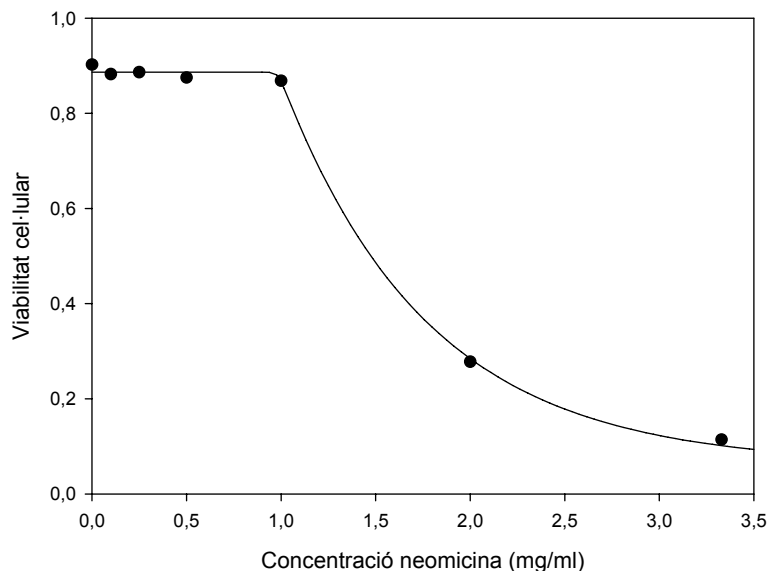


Figura 5.17 Viabilitat cel·lular en cultius de cèl·lules vero de 3 dies de durada en funció de la concentració de neomicina present en el medi de cultiu.

5.2.2 MESURES FORA DE LÍNIA

Vistos els resultats obtinguts anteriorment, s'utilitzaran unes concentracions de neomicina de 0, 1,5 i 3,5 mg/ml pel monitoratge en línia de la concentració cel·lular en cultius cel·lulars en presència d'una molècula que afecta el seu creixement normal. D'aquesta manera es pot observar la mort d'un cultiu al llarg dels 3 dies (3,5 mg/ml) i comparar-la, tant amb un cultiu en condicions normals sense la presència de neomicina en el medi (0 mg/ml), com amb un cultiu mitjanament afectat per la presència de neomicina en el medi (1,5 mg/ml).

Tal i com s'ha realitzat pel seguiment dels cultius efectuats a diferents concentracions inicials, es començarà realitzant mesures fora de línia per efectuar diversos seguiments de cultius de cèl·lules vero a les concentracions de neomicina escollides. D'aquesta manera, podrem comparar els resultats obtinguts del sistema de seguiment en línia utilitzat amb els resultats obtinguts amb aquest seguiment de la concentració cel·lular fora de línia. Els cultius, que es troben representats a continuació a la figura 5.18, s'han efectuat en plaques de 6 pous en condicions estàndards i amb una concentració cel·lular inicial elevada per a poder observar millor els efectes sobre la fracció de supervivència del cultiu (de $10 \cdot 10^4$

cèl·lules/cm²), tot realitzant recomptes de concentració cel·lular per triplicat (destrucció de 3 pous de cultiu per inòcul i mesura) cada aproximadament 24 hores de cultiu.

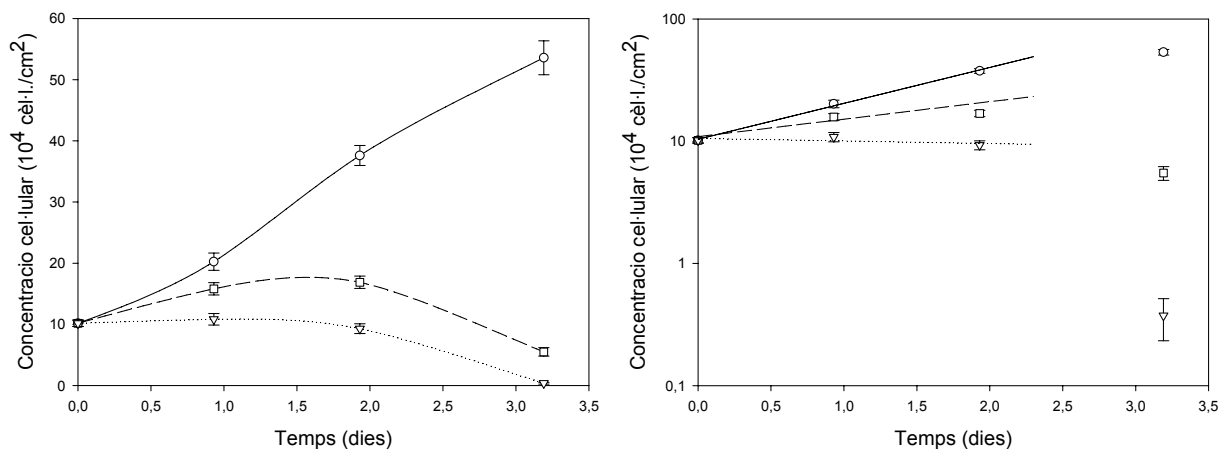


Figura 5.18 Perfils de concentració cel·lular mesurats fora de línia al llarg dels cultius de cèl·lules *vero* a diferents concentracions de neomicina (esquerra). Les concentracions seguides són de 3,5 mg/ml (línia ... i símbol ▽), 1,5 mg/ml (línia — — i símbol □) i 0 mg/ml (línia — i símbol ○). A la dreta es troben representades les rectes de tendència usades per a la mesura de les velocitats puntuals màximes de creixement per a cada una de les concentracions de neomicina utilitzades (valors a la taula 5.3).

Els valors de les màximes velocitats puntual de creixement per a cada una de les concentracions de neomicina utilitzades es poder observar a la següent taula.

Taula 5.3 Valors de les màximes velocitats puntual de creixement per a cada una de les concentracions de neomicina utilitzades determinades a partir de les mesures fora de línia de la concentració cel·lular, juntament amb els corresponents temps de duplicació.

Concentració neomicina	μ (d ⁻¹)	t_{dup} (hores)
0 mg/ml	0,68	24,6
1,5 mg/ml	0,33	50,4
3,5 mg/ml	-0,05	----

Amb els perfils de concentració obtinguts es pot observar com els tres cultius han tingut un creixement diferent. Mentre el cultiu sense presència de neomicina ha tingut un comportament normal, obtenint un creixement exponencial durant els 2 primers dies de cultiu i a menor velocitat de creixement la resta del cultiu (concentració cel·lular al final del cultiu de 53,6·10⁴ cèl·lules/cm²), els creixements dels cultius amb presència de neomicina s'han vist inhibits amb un grau elevat.

En el cas del cultiu amb presència de 1,5 mg/ml de neomicina al medi de cultiu, s'ha obtingut una primera zona de creixement, essent la màxima velocitat puntual de creixement del cultiu (pendent de la gràfica de

concentració cel·lular en escala semilogarítmica) molt més lenta que la màxima velocitat puntual obtinguda pel cultiu cel·lular sense la presència de neomicina en el medi, passant dels $0,68 \text{ d}^{-1}$ sense presència de neomicina als $0,33 \text{ d}^{-1}$ en presència de $1,5 \text{ mg/ml}$ de neomicina (més d'un 50% de disminució). A més, a partir de 1-1,5 dies de cultiu, aquesta fase de creixement s'atura donant lloc a una fase de mort cel·lular (concentració cel·lular al final del cultiu de $5,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²).

Finalment, amb el cultiu amb presència de $3,5 \text{ mg/ml}$ de cultiu es pot observar com ja no existeix la fase inicial de creixement (velocitat puntual de "creixement" de $-0,05 \text{ d}^{-1}$), de manera que durant els primers 1-1,5 dies de cultiu només es capaç de mantenir la concentració cel·lular inicial i, a partir d'aquest moment, el cultiu entra en fase de mort fins al final del cultiu, moment en que la concentració cel·lular obtinguda és pràcticament nul·la (concentració cel·lular al final del cultiu de $0,37 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²).

5.2.3 MONITORATGE DEL pH

Un cop ja s'han caracteritzat l'efecte de la neomicina en cultius de cèl·lules *vero* a partir de recomptes fora de línia, ja es pot procedir al monitoratge d'aquests cultius mitjançant el sistema de seguiment en línia desenvolupat. Per a realitzar-ho, s'ha efectuat el seguiment per duplicat de cultius de cèl·lules *vero* amb una concentració inicial de $10 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² i amb presència de 0, 1,5 i $3,5 \text{ mg/ml}$ de neomicina al medi de cultiu.

Aquests cultius, a l'igual com els anteriors cultius monitorats en línia, s'han dut a terme a l'interior dels minibioreactors equipats amb les sondes desenvolupades i situats a l'interior d'un Hexascreen® (Hexascreen C.T., descrit àmpliament a l'apartat 8.4.3 de Materials i Mètodes), amb el que s'ha operat a condicions estàndards. Per a cada una de les concentracions de neomicina de treball, al medi de cultiu se l'hi ha afegit el volum corresponent de neomicina concentrada (50x) per tal d'obtenir la concentració final de neomicina desitjada amb el volum final de 13ml per minibioreactor (volum de treball estàndard). Finalment un cop passats els 3 dies de cultiu, s'ha procedit al recompte de la concentració cel·lular en el mateix minibioreactor monitorat al final del cultiu, per tal de comprovar el correcte seguiment dels diferents creixements cel·lulars. Els resultats obtinguts es troben representats a continuació a la figura 5.19, on es pot observar com s'han obtingut tres creixements diferents per a cada una de les concentracions de neomicina utilitzades, de manera que mentre amb el cultiu sense la presència de neomicina en el medi s'ha obtingut el perfil d'un creixement típic d'un cultiu de cèl·lules *vero*, amb el cultiu amb $1,5 \text{ mg/ml}$ de neomicina s'obté un cultiu amb una lleugera fase de mort cel·lular, mentre que amb el cultiu amb $3,5 \text{ mg/ml}$ de neomicina ja s'obté un perfil clar de mort cel·lular.

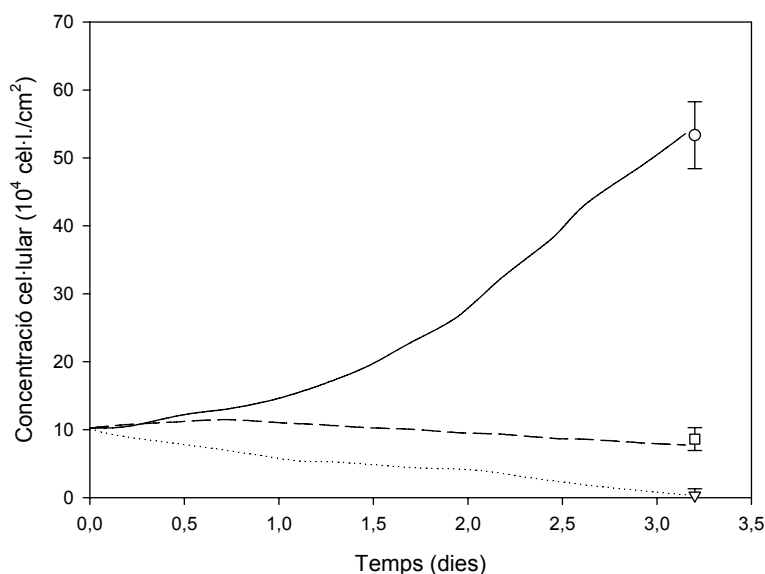


Figura 5.19 Perfils de concentració cel·lular obtinguts a partir del perfil de pH mesurat al llarg dels cultius de cèl·lules *vero* a diferents concentracions de neomicina en el medi de cultiu. Les concentracions de neomicina monitorades són de 3,5 mg/ml (···), 1,5 mg/ml (— · —) i a 0 mg/ml (—), actuant aquest últim com a control positiu de creixement. Comparació dels seguiments de concentració cel·lular obtinguts amb els recomptes cel·lulars dels minibioreactors monitorats realitzats fora de línia al final del cultiu (▽, □ i ○ respectivament).

Per a poder analitzar més detalladament els cultius de cèl·lules *vero* realitzats amb les diferents concentracions de neomicina en el medi, s'ha mesurat la velocitat de creixement puntual al llarg dels cultius per a cada un dels diferents cultius, que ha estat calculada de la mateixa manera que en l'apartat 5.1.5 en l'anàlisi de cultius cel·lulars a diferents inòculs inicials, per tal d'obtenir la màxima velocitat puntual de creixement pel cultiu sense presència de neomicina en el medi de cultiu i les velocitats de mort cel·lular pels cultius en presència de neomicina. Els valors de velocitat amb els corresponents temps de duplicació i temps de divisió (temps per a que la concentració cel·lular sigui la meitat de la inicial, mesurades en els casos de les fases de mort) es poden observar a la següent taula.

Taula 5.4 Valors de les màximes velocitats puntual de creixement o de velocitats puntual de mort per a cada una de les concentracions de neomicina utilitzades determinades a partir de les mesures en línia del pH, juntament amb els corresponents temps de duplicació pels creixements i temps de divisió per a les fases de mort.

Concentració neomicina	μ (d ⁻¹)	t_{dup} (hores)	μ_{mort} (d ⁻¹)	$t_{1/2}$ (hores)
0 mg/ml	0,68	24,6	----	----
1,5 mg/ml	----	----	-0,15	109,6
3,5 mg/ml	----	----	-0,47	35,4

Observant els creixement obtinguts, es pot observar primerament que el cultiu sense presència de neomicina en el medi de cultiu (—) segueix el mateix patró de creixement que els cultius de cèl·lules *vero* amb diferents inòculs, amb una primera fase de latència de poca durada, i seguint el creixement a una màxima velocitat puntual de creixement de $0,68 \text{ d}^{-1}$.

Comparant aquest valor amb les velocitats màximes en els cultius realitzats a diferents inòculs, s'obté que la velocitat de creixement obtinguda en aquest cultiu és lleugerament inferior a la obtinguda per l'anterior cultiu amb la concentració cel·lular inicial més elevada, passant d'una velocitat màxima de creixement de $0,79 \text{ d}^{-1}$ a $0,68 \text{ d}^{-1}$, però seguint el perfil de velocitats màximes de creixement en cultius de cèl·lules *vero* (figura 5.13). Aquest fet reafirma que en els cultius de cèl·lules animals adherents, l'augment de l'efecte de la inhibició per contacte cel·lular en la velocitat màxima de creixement a mesura que la concentració cel·lular inicial es va augmentant (observat al canviar d'una concentració cel·lular inicial anterior de $6 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² a la utilitzada en aquest experiment de $10 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²).

Per altra banda, si es compara aquest valor amb el valor de la màxima velocitat puntual mesurada a partir de les mesures de concentració cel·lular realitzades fora de línia, es pot observar que donen exactament la mateixa velocitat, indicant que els punts de concentració cel·lular escollits pel càlcul de la màxima velocitat puntual de creixement també es trobaven tots en la fase de creixement exponencial, encara que a partir del perfil de concentració cel·lular mesurat fora de línia no es pogués determinar ni l'inici ni el final de la fase exponencial dels cultius efectuats.

Si analitzem els cultius en presència de neomicina en el medi de cultiu, es pot observar que el perfil obtingut pel cultiu amb $1,5 \text{ mg/ml}$ de neomicina segueix el perfil de creixement del cultiu sense presència de neomicina en el medi durant aproximadament el primer mig dia de cultiu, moment en que la neomicina comença a provocar efectes significatius en el cultiu, fent que la concentració cel·lular vagi davallant lleugerament a una velocitat de mort cel·lular de $-0,15 \text{ d}^{-1}$ durant la resta de cultiu.

Per altra banda, quan la concentració de neomicina en el medi de cultiu s'eleva fins a $3,5 \text{ mg/ml}$, aquesta desviació respecte el creixement sense presència de neomicina en el medi es dona pràcticament des del mateix inici del cultiu, obtenint una constant davallada considerable de la concentració cel·lular, amb una velocitat de mort cel·lular de $-0,47 \text{ d}^{-1}$, valor que augmenta lleugerament en l'últim dia de cultiu. Al final dels tres dies de cultiu, pràcticament ja no queden cèl·lules vives.

Així doncs, mentre una concentració de 1,5 mg/ml només és suficient per a parar el metabolisme cel·lular sense provocar una fase de mort gaire marcada, amb una concentració de 3,5 mg/ml fa que el cultiu de cèl·lules vero es trobi immers de seguida en una clara fase de mort cel·lular. Aquest fet es pot observar més clarament a la figura 5.20, on s'ha representat la viabilitat cel·lular mesurada respecte la concentració cel·lular inicial del cultiu, i en la que es pot veure que una concentració de neomicina de 1,5 mg/ml en el medi de cultiu només provoca una disminució del 20% de la concentració cel·lular al final dels tres dies de cultiu, mentre que si al medi de cultiu se li afegeix una concentració de neomicina de 3,5 mg/ml, obtenim la mateixa reducció del 20% amb només mig dia de cultiu i, al final dels tres dies de cultiu, ja s'ha produït pràcticament la mort del cultiu, quedant aproximadament un 5% residual de la concentració inicial.

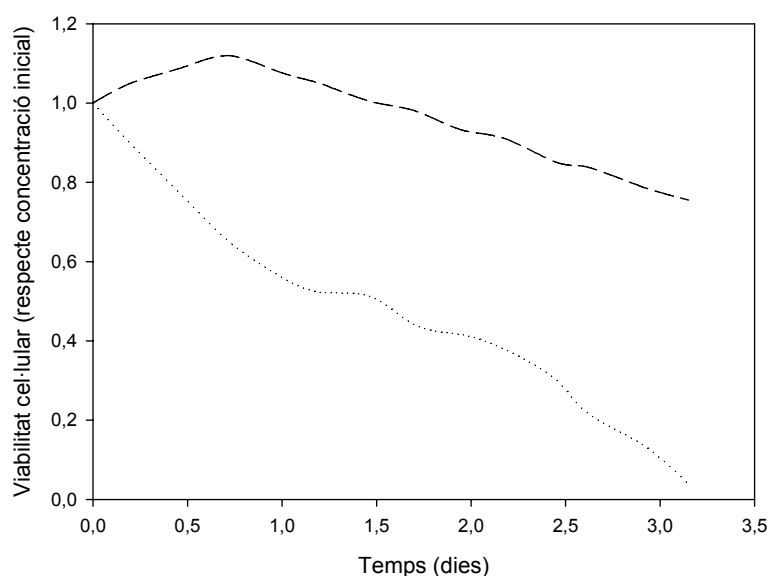


Figura 5.20 Perfils de viabilitat cel·lular al llarg dels cultius de cèl·lules vero en presència de neomicina al medi a les concentracions de 3,5 (···) i 1,5 (—) mg/ml. Els perfils de viabilitat s'han mesurat respecte la concentració cel·lular inicial.

A partir doncs del seguiment de l'activitat cel·lular en aquest tipus de cultius es pot realitzar escandalls de diferents substàncies que permetin causar la mort de línies cel·lulars, podent determinar tant la concentració de la substància necessària per a provocar una mort en el cultiu, com el temps de cultiu necessari per a aquest efecte, essent aquest, tal i com s'ha explicat anteriorment, un procés de gran importància tant a l'hora de testar productes desenvolupats en teràpies biofarmacèutiques, com en aplicacions cel·lulars per a la realització de tests toxicològics o la realització d'escandalls de drogues, molècules i composts amb potencial per a ser utilitzats en la recerca contra cèl·lules tumorals.

5.3 CARACTERITZACIÓ CREIXEMENT SOBRE MICROSUPORTS

L'últim aspecte important a estudiar de les cèl·lules animals adherents és el monitoratge de cultius a gran escala per a la obtenció de grans quantitats de cèl·lules animals adherents per a la producció massiva de vacunes per a les teràpies víriques (Brands *i col.*·1997; van Wezel *i col.*·1979), vectors per a teràpies gèniques (Wu *i col.*·2002), per a teràpies cel·lulars (Ryan *i col.*·1980; Tatard *i col.*·2005), proteïnes d'alt valor terapèutic (Clark i Hirtenstein·1981) i, cada cop més, anticossos monoclonals (Voigt i Zintl·1999) per a teràpies biofarmacèutiques.

La principal problemàtica per a poder realitzar cultius a gran escala de cèl·lules animals adherents era la limitació de la superfície de cultiu present aquests cultius de cèl·lules animals adherents, que desestimava la utilització d'aquests tipus de cèl·lules a l'exigir la utilització de quantitats extremadament elevades de sistemes de cultiu elevant enormement els costos de medi de cultiu (figura 5.21, esquerra). Aquesta problemàtica es va solucionar amb el descobriment (van Wezel·1967) i desenvolupament dels microsuports (Levine *i col.*·1979; Levine *i col.*·1977), obrint un camí per a realitzar cultius de cèl·lules animals adherents en suspensió i que van fer possible arribar a cultius d'alta densitat amb cèl·lules animals adherents (densitat més de 100 vegades superior a la obtinguda en cultius en monocapa), obrint les portes de la utilització de cèl·lules animals adherents per a la producció a gran escala (figura 5.21, dreta) de tot tipus de molècules, composts i virus que fins aleshores només es podien realitzar mitjançant cultius de cèl·lules animals que creixessin en suspensió.



Figura 5.21 Comparació de les necessitats d'un sistema de cultiu en monocapa estàndard (ampolles rodants, esquerra), amb la quantitat de superfície equivalent obtinguda mitjançant tres tipus de microsuports (cercle, esquerra). Planta pel cultiu de cèl·lules vero en microsuports per a la producció de vacunes (dreta). (Amersham·2005)

Els materials amb els que es produeixen els microsuports són importants, influenciant tant en aspectes químics ja sigui la seva toxicitat o si els microsuports que s'obtenen són hidrofòbics o hidròfils, com en aspectes físics i geomètrics, com la microporositat, la estabilitat mecànica, la difusivitat de l'oxigen o els components del medi, permeabilitat i la forma, mida i gruix. Actualment, s'han utilitzat una gran varietat de materials per a produir microsuports (figura 5.22), com plàstics (poliestirè, polietilè, políester i polipropilè), vidres, acrilamides, sílices, silicones, cel·luloses, dextrà, col·lagen i glicosaminoglicans, mentre que les formes utilitzades han estat la forma esfèrica com a més comuna, però també en forma de fibres, de discs plans o bombats i cubs entre altres formes menys comuns i les mides van dels 10 µm als 5 mm. Totes aquestes característiques dels microsuports determinaran quines línies cel·lular es podran adaptar al creixement cel·lular sobre aquestes superfícies i quines no, fent que la tria del microsuport a utilitzar és una de les parts més importants a l'hora de dissenyar un procés de producció en microsuports.

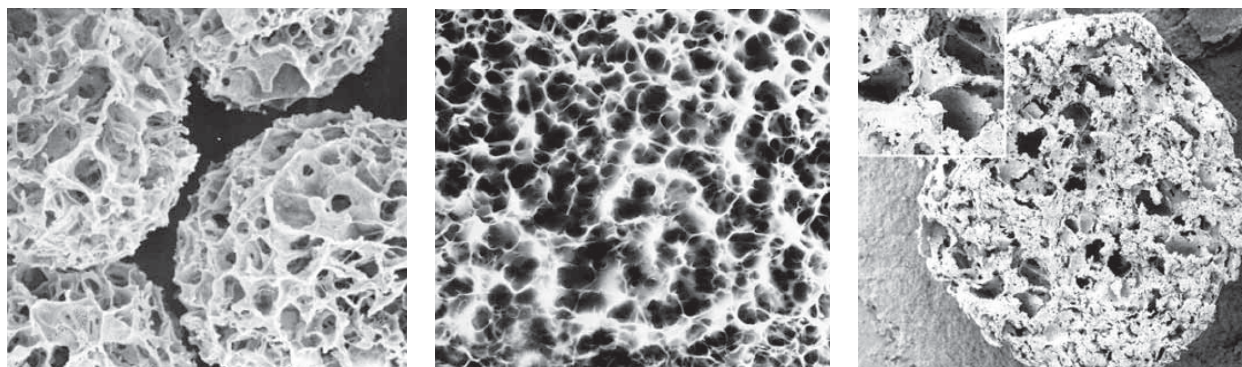


Figura 5.22 Exemples de microsuports i les seves microestructures poroses. A l'esquerra s'observa la microestructura d'un microsuport de cel·lulosa amb grans porus que permeten el pas de les cèl·lules, al centre s'observa la microestructura d'un microsuport de dextrà amb uns porus petits que no són accessibles a les cèl·lules i a la dreta es pot observar la microestructura d'un microsuport de polietilè, amb uns porus suficientment grans per a permetre el pas de cèl·lules.

Aquests cultius es realitzen a través de diferents etapes. La primera de les etapes es basa en l'adhesió i colonització de les cèl·lules als microsuports i consta de petits polsos d'agitació alternats amb temps d'espera per a facilitar l'adhesió total de les cèl·lules als suports. Aquesta, és una etapa molt important, ja que tots aquells microsuports que no quedin colonitzats en aquesta etapa ja no es colonitzaran durant la resta del cultiu cel·lular i, per tant, es perdria superfície de creixement. Aquest fet, fa que la concentració inicial de la que es parteix sigui un punt molt important en els cultius en microsuports, ja que una concentració inicial massa petita deixaria la majoria de microsuports sense colonitzar (Mendoza i col. 1999), mentre que una concentració inicial massa elevada de cèl·lules resultaria en una poca capacitat de creixement en el cultiu.

Un cop ja es troben les cèl·lules adherides al microsuport, ja es pot procedir al creixement cel·lular en el que s'afegeix el medi de cultiu restant i en el que s'aplica una agitació suau per a mantenir els microsuports en suspensió però sense provocar el desenganxament de les cèl·lules adherides mentre el cultiu cel·lular va creixent. Finalment, un cop s'ha obtingut la quantitat cel·lular desitjada (microsuports a confluència, figura 5.23), ja es pot procedir a la inducció del cultiu per a la producció de proteïnes o la seva infecció per a la producció de virus per a vacunes (Yokomizo *i col.* 2003).

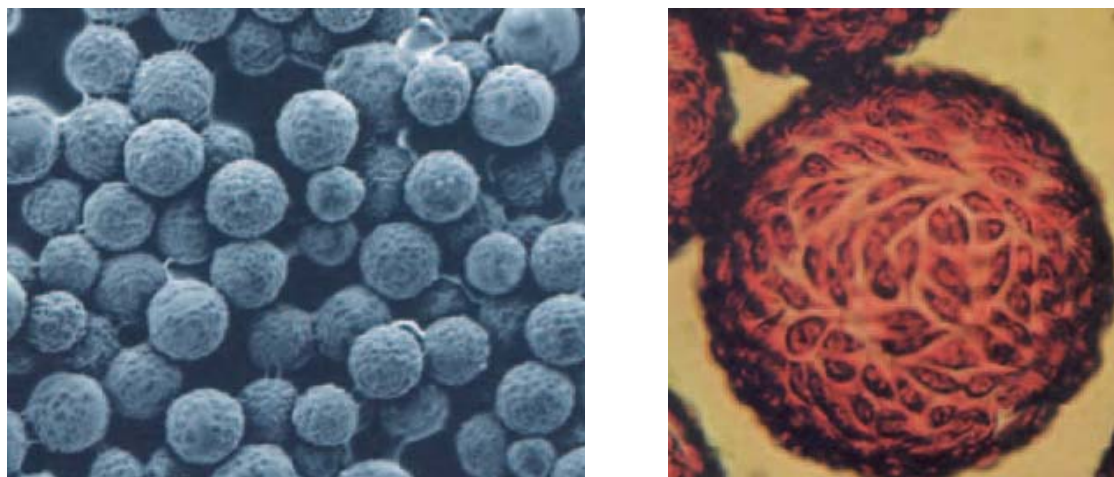


Figura 5.23 Imatges de microsuports (cytotoxic) totalment colonitzats per cèl·lules animals (cèl·lules de ronyó de porc, esquerra i CHO, dreta).

Es pot veure doncs, que és important de disposar d'un sistema de monitoratge de la concentració cel·lular en aquests processos de cultius cel·lulars en microsuports que permeti optimitzar el creixement cel·lular obtingut en l'etapa de creixement a partir de la millora tant de l'etapa de colonització en el protocol d'adhesió (temps d'agitació i espera, agitació, volum de medi utilitzat...), com en el microsuport utilitzat, en la concentració cel·lular inicial i al llarg la mateixa etapa de creixement (medi utilitzat, agitació, concentració de microsuport...), però també a l'hora de seguir el procés a nivell industrial per a poder obtenir informació a temps real de l'estat del procés de creixement i, d'aquesta manera, poder actuar sobre el procés amb la major rapidesa possible. Per tant, es procedirà al monitoratge de l'etapa de creixement cel·lular a partir del sistema de seguiment desenvolupat per tal d'observar el funcionament d'aquest sistema en aquest tipus de processos en els que es varia una de les condicions inicials.

5.3.1 MESURES FORA DE LÍNIA

Inicialment, es procedirà al seguiment fora de línia d'aquest procés de cultiu en microsuports per tal de poder comparar els resultats obtinguts amb el sistema desenvolupat de mesura de la concentració cel·lular. La condició inicial a variar per a la realització del seguiment de la concentració cel·lular al llarg del cultiu en microsuports serà la concentració cel·lular inicial. Els microsuports utilitzats són els de *citodex 3*

(Amersham Biosciences), que està format a partir de dextrà amb una làmina de col·lagen desnaturalitzat químicament i s'ha utilitzat àmpliament no només pel cultiu de cèl·lules animals en general, sinó que també en el cultiu específic de cèl·lules *vero* (Frazzati-Gallina *i col.* 2001; Kistner *i col.* 1998; Shao *i col.* 2002; White i Ades 1990).

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, la concentració cel·lular inicial és molt important per a obtenir un creixement òptim en el màxim nombre de microsuports. Es troba descrit bibliogràficament per a cultius de cèl·lules *vero* (Mendoça *i col.* 1999), que una concentració inicial que aportï una quantitat entre 4 i 8 cèl·lules per cada microsuport és òptima per a l'obtenció d'un bon creixement cel·lular. Aquesta quantitat de cèl·lules correspon a una concentració inicial entre 0,7 i $1,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² quan s'utilitza *cytodex 3* com a suport. Per tant, s'utilitzarà una concentració cel·lular inicial dins d'aquest interval de concentració òptima (concentració de 10^4 cèl·lules/cm²) i una situada fora d'aquest rang, en aquest cas, per sobre (concentració de $2,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²). La resta de condicions de cultiu utilitzades són les estàndards pel cultiu de microsuports en minibioreactors, així com l'ús de 3 mg/ml de *citodex 3* com a microsuport. Finalment i cada 24 hores de cultiu, s'ha efectuat l'extracció de 0,1 ml de medi amb microsuports per a la mesura de la concentració cel·lular fora de línia mitjançant recomptes per exclusió nuclear (metodologia del recompte exposada a l'apartat 8.6.1.2 de Materials i Mètodes).

Els resultats obtinguts, corresponents als promigs realitzats de les mesures de concentració cel·lular en cultius triplicats per a cada una de les concentracions inicials, es poden observar a la figura 5.24.

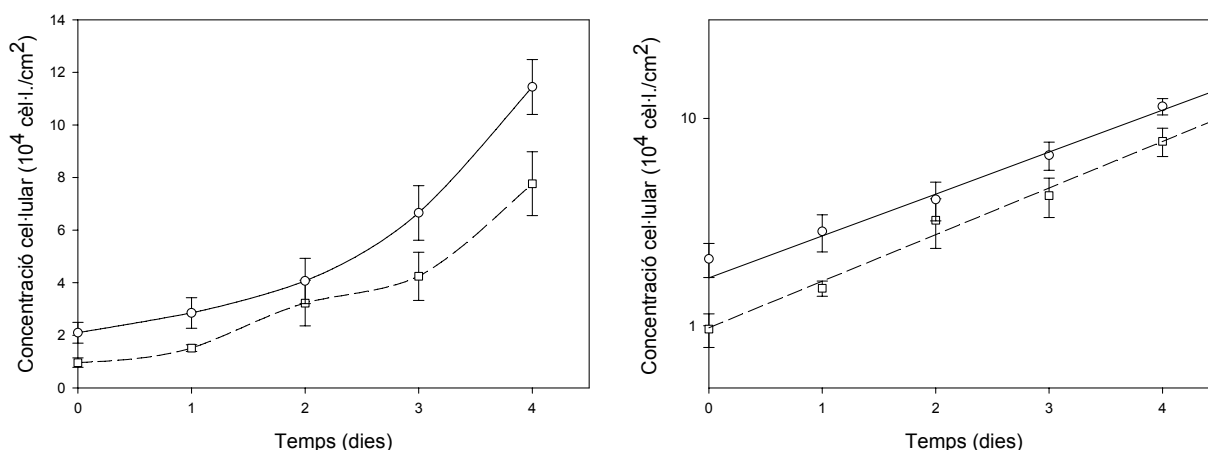


Figura 5.24 Perfils de concentració cel·lular al llarg dels cultius en microsuports de cèl·lules *vero* a diferents inòculs mesurats fora de línia mitjançant recomptes per exclusió cel·lular (esquerra). Els inòculs seguits són de $1 \cdot 10^4$ (línia — i símbol $\square$) i $2,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (línia — i símbol $\circ$). A la dreta es troben representades les rectes de tendència usades per a la mesura de les velocitats màximes de creixement per a cada un dels inòculs utilitzats.

Amb les corbes de concentració cel·lular obtingudes, es pot observar que el seguiment fora de línia dona uns resultats força acceptables, tot i el propi error intrínsec a la tècnica del recompte cel·lular per exclusió nuclear, que és bastant elevat. Tot i això, la mesura fora de línia de la concentració cel·lular implica la extracció de una mostra del cultiu cel·lular, convertint a la tècnica de mesura com a tècnica invasiva i, per tant, amb major possibilitat de contaminació externa i suposa una pèrdua per a cada mesura de una part del cultiu cel·lular significativa, ja que aquesta mostra ha de ser prou gran per a poder ser representativa del cultiu mesurat. A més, aquesta tècnica de mesura de la concentració cel·lular dona la informació amb un retràs considerable, ja que la tècnica de mesura inclou uns temps d'espera elevats per a poder obtenir unes mesures fiables (per a poder aconseguir l'alliberació dels nuclis de la totalitat de les cèl·lules presents).

Si s'analitzen les corbes obtingudes, obtenim que les velocitats de creixement mesurades són de 0,47 i 0,52 d⁻¹ respectivament pels cultius amb concentració inicial de 1 i 2,5·10⁴ cèl·lules/cm². Tot i que aquests valors són bastant baixos si es comparen amb els valors de velocitats màximes obtinguts per a les mesures fora de línia dels creixements de cèl·lules *vero* realitzats en monocapa a l'inici del capítol (apartat 5.1.1), són valors normals si es comparen amb valors obtinguts per a cultius de cèl·lules *vero* realitzats en microsuports, amb valors situats entre 0,4 i 0,65 d⁻¹ (Mendoça *i col.* 1999; Nahapetian *i col.* 1986). Aquesta disminució de la velocitat màxima de creixement ve donada en part pel canvi de sistema d'un cultiu estàtic a un de dinàmic, que tot i ser més eficient per a la producció de cèl·lules a gran escala, comporta un augment dels efectes d'estrès inherents a aquest sistema de cultiu. Majoritàriament però, aquesta disminució de la velocitat de creixement bé donada pel canvi realitzat en la superfície de cultiu, ja que la superfície de creixement dels microsuports utilitzats (*cytodex* 3, format per dextrà amb una làmina de col·lagen desnaturalitzat) pot no trobar-se tant optimitzada pel creixement cel·lular com la superfície de creixement que es troba en els sistemes de cultiu estàtic (plàstic tractat per a la adherència mitjançant plasma), fent que l'adhesió de les cèl·lules sigui més problemàtica i, per tant, la velocitat a la que pot créixer el cultiu disminueix.

5.3.2 MONITORATGE DEL pH

Un cop ja s'ha realitzat el seguiment dels creixements cel·lulars amb recomptes fora de línia, ja es pot procedir al monitoratge d'aquests a partir del sistema de seguiment en línia desenvolupat. Les condicions de cultiu utilitzades es mantenen constants, amb unes concentracions de cèl·lules inicials de 1 i 2,5·10⁴ cèl·lules/cm² i una concentració de microsuports de 3 mg/ml de *citodex* 3, tot i que no es realitza l'extracció de medi amb cèl·lules al llarg del cultiu i només es realitza un recompte cel·lular per exclusió nuclear al final de l'experiment.

Per a aquest tipus de cultius en microsuports, s'ha de tenir en compte que la superfície de creixement no és la mateixa que pels cultius de cèl·lules *vero* en monocapa, de manera que s'ha de recalculat el calibrat entre el pH i la concentració cel·lular del cultiu per a la superfície de creixement actual, ja que el consum de substrats i la producció de metabòlits que viren l'indicador de pH són funció de la quantitat total de cèl·lules i del volum de medi utilitzat i no de la concentració cel·lular per unitat de superfície. Així doncs, com que la quantitat de medi utilitzat és la mateixa per ambdós casos, només cal aplicar un factor de correcció de la quantitat de superfície de cultiu present, passant dels 7,07 cm² de superfície de cultiu pels creixements en monocapa als 105,3 cm² (= 3 mg/ml · 13 ml medi · 2,7 cm²/mg) de superfície pels cultius en microsuports. Per tant, el nou factor de calibrat de concentració cel·lular per unitat de pH passa a ser el següent:

$$1,82 \cdot 10^6 \frac{\text{cèl·lules}}{\text{cm}^2 \cdot (\text{unitat pH})} \cdot \frac{7,07 \text{ cm}^2 \text{ monocapa}}{105,3 \text{ cm}^2 \text{ microcàrriers}} = 1,22 \cdot 10^5 \frac{\text{cèl·lules}}{\text{cm}^2 \cdot (\text{unitat pH})}$$

Aplicant doncs aquest nou factor de calibrat, els resultats provinents del monitoratge de tres cultius per a cada una de les concentracions cel·lulars inicials es poden observar a la figura 5.25 on, per comprovar la fiabilitat dels resultats obtinguts, també s'han representat les concentracions cel·lulars mesurades fora de línia mitjançant recomptes de concentració cel·lular per exclusió nuclear dels mateixos minibioreactors monitorats, un cop finalitza el cultiu.

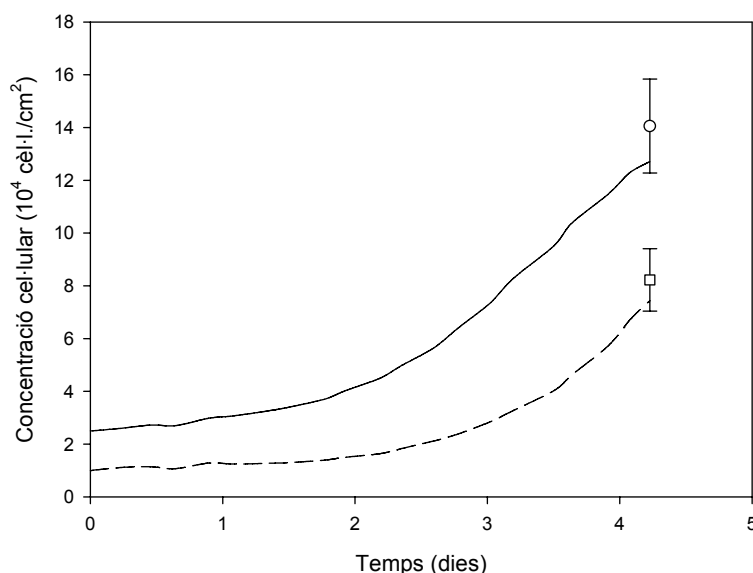


Figura 5.25 Perfils de concentració cel·lular obtinguts a partir del perfil de pH mesurat al llarg dels cultius en microsuports de cèl·lules *vero* a diferents inòculs, pels inòculs de 1·10⁴ (—) i 2,5·10⁴ cèl·lules/cm² (---). Comparació dels seguiments de concentració cel·lular obtinguts amb els recomptes cel·lulars per exclusió nuclear dels minibioreactors monitorats realitzats fora de línia al final del cultiu (□ i ○ respectivament).

Amb els recomptes de concentració cel·lular dels propis minibioreactors al final del cultiu, es pot observar com aquests valors de concentració cel·lular mesurats fora de línia tenen una concordança acceptable amb els valors de concentració mesurats a partir del sistema de mesura desenvolupat, indicant-ne una bona fiabilitat de la mesura en aquest tipus de cultius cel·lulars.

Si s'analitzen les corbes de concentració obtingudes, es pot observar com ambdós cultius comencen amb una fase de latència bastant elevada si es comparen amb els creixements anteriors sobre plàstic (apartat 5.1.5), indicant possibles problemes d'adherència de les cèl·lules als microcàrrers utilitzats. Després d'aquesta fase de latència, es pot observar que els cultius entren en la fase de creixement exponencial, fase en la que la velocitat puntual de creixement, representades a la figura 5.26, va augmentant constantment fins al final del cultiu en el cas del cultiu amb una concentració inicial de $1 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², arribant a una velocitat de creixement màxima de $0,82 \text{ d}^{-1}$, mentre que aquest augment de la velocitat puntual de creixement per a l'inòcul de $2,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² només es dona durant aproximadament 3 dies de cultiu fins a arribar a una velocitat de creixement màxima de $0,59 \text{ d}^{-1}$, moment en el que es pot observar una disminució de la velocitat puntual de creixement indicant l'estancament del cultiu.

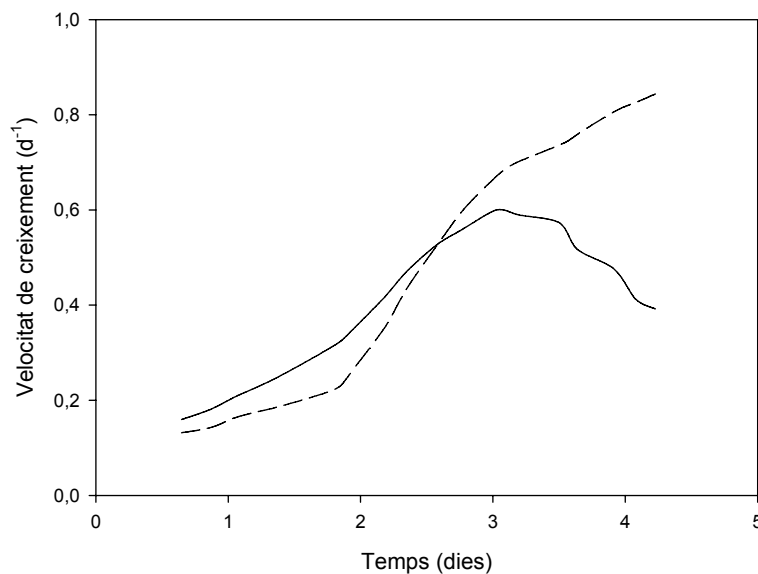


Figura 5.26 Perfils de la velocitat de creixement puntual obtinguts pels diferents cultius cel·lulars en microsuports amb concentracions cel·lulars inicials de $1 \cdot 10^4$ (—) i $2,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (— · —).

Si es comparen els valors de les màximes velocitats puntuals amb les obtingudes en els anteriors creixements sobre plàstic, amb una velocitat màxima de creixement de $1,09 \text{ d}^{-1}$ (obtinguda per a una concentració cel·lular inicial de $2 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², taula 5.2), es pot observar que les actuals són bastant més lentes, tot i trobar-se en valors de concentració cel·lular inicial en els que no s'ha observat efectes d'inhibició per contacte cel·lular (figura 5.12). Concretament, les disminucions de les màximes velocitats

puntuals de creixement obtingudes són d'un 25% més pel cultiu amb l'inòcul de $1 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² (tenint en compte que s'aconsegueix al final dels 4 dies de cultiu i, per tant, encara podria augmentar lleugerament) i un 46% pel cultiu amb l'inòcul de $2,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm².

Aquestes màximes velocitats puntuals obtingudes en creixement sobre microsuports, essent més lentes que les velocitats màximes de creixement per a cultius de cèl·lules *vero*, tot i partir de concentracions inicials en les que no s'ha observat efectes d'inhibició per contacte cel·lular, juntament amb l'augment de la durada de la fase de latència, són uns indicadors clars que els microsuports utilitzats (*cytodex 3*) no són els òptims pel cultiu de cèl·lules *vero*, segurament degut a problemes d'adhesió de les cèl·lules en el microsuport o bé de manteniment d'aquesta adhesió.

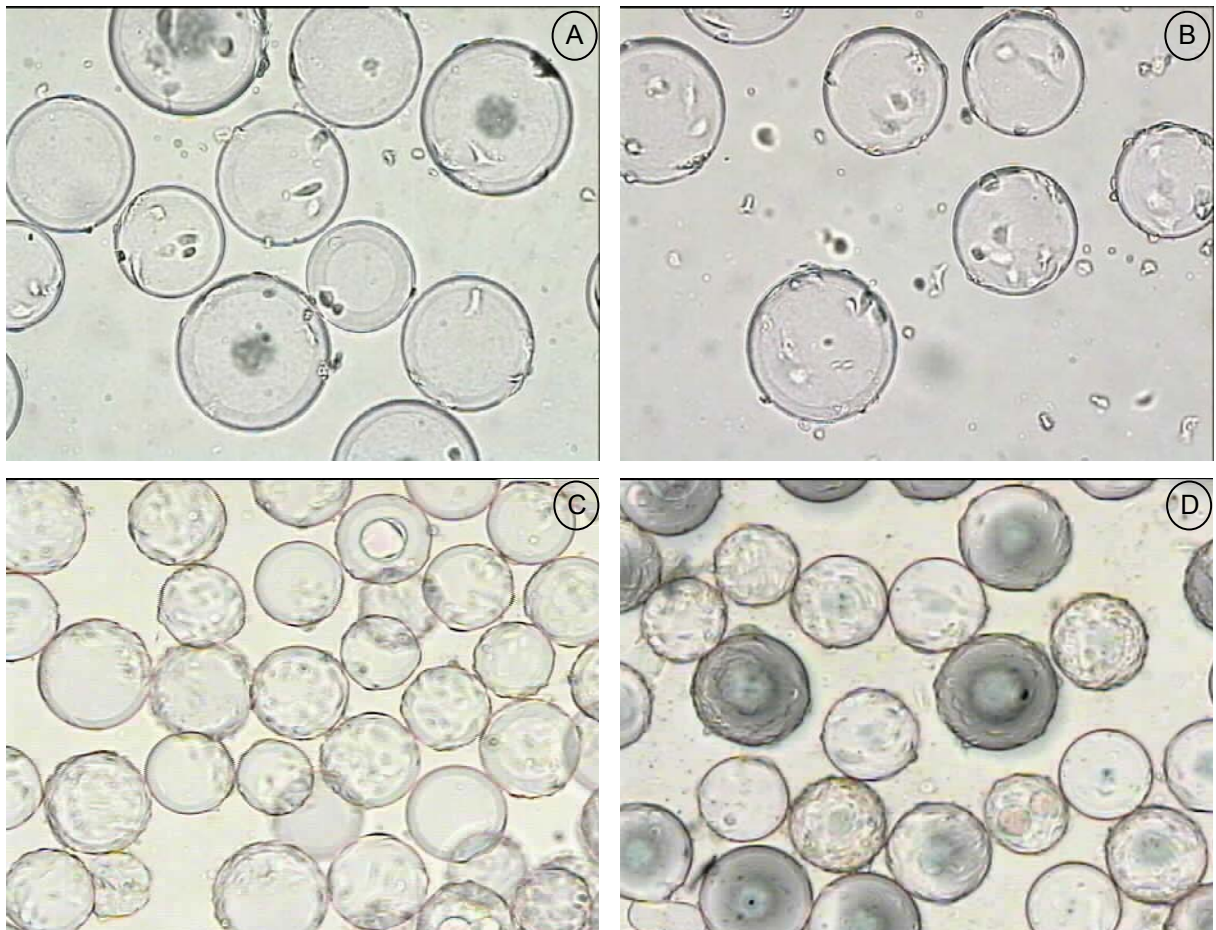


Figura 5.27 Fotografies d'una mostra de microsuports efectuades al final del protocol d'adhesió cel·lular (fotografies A i B) i al final del cultiu cel·lular (fotografies C i D). Es mostren fotografies dels suports tant pel cultiu amb un inòcul de $1 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm (fotografies A i C) com pel cultiu amb un inocul de $2,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm (fotografies B i D).

Per altra banda, si es té en compte el cultiu cel·lular amb una concentració cel·lular inicial de $2,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² i s'observa la concentració final a la que ha arribat al final del cultiu (concentració cel·lular de

$14 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm²), es pot veure que tot i que el cultiu ja es trobi limitat, aquesta és bastant inferior a les concentracions de confluència tant de cultiu de cèl·lules *vero* en minibioreactors com en plaques de 6 pous, indicant que la limitació que està patint aquest cultiu no és per superfície, sinó que ha de trobar-se limitat per l'esgotament del medi de cultiu. Aquest fet queda reafirmat amb les fotografies dels microsuports efectuades al final del cultiu cel·lular (figura 5.27, fotografies C i D), on es pot observar per a ambdues concentracions inicials, que encara disposen d'una gran quantitat de superfície de creixement lliure en els microsuports.

A més, tot i que la concentració cel·lular a la que arriba el cultiu és inferior, el fet que es disposi de molta més superfície de creixement fa que la quantitat total de cèl·lules sigui superior que la obtinguda en els cultius en monocapa, passant de les $7,6 \cdot 10^6$ cèl·lules totals obtingudes en un cultiu en monocapa dins un minibioreactor (concentració final de l'inòcul més elevat de la figura 5.11 en 7,07 cm² de superfície de creixement) a les $13,4 \cdot 10^6$ cèl·lules totals d'aquest cultiu en microsuports (un augment aproximat del 75%), mentre que el medi de cultiu utilitzat per a ambdós cultius és el mateix.

És per aquesta raó que, quan es realitzen cultius de cèl·lules animals en microsuports per a la producció a gran escala d'aquestes (Frazzati-Gallina *i col.* 2001; Kistner *i col.* 1998; Mendonça i Pereira 1998; Shao *i col.* 2002; White i Ades 1990), s'utilitzen sistemes de cultiu en perfusió o en semi-discontinuu, en el que s'atura l'agitació per decantar els microsuports i es recanvia part del medi de cultiu esgotat per un medi fresc.

Així doncs, la mesura de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules *vero* realitzats sobre microsuports *cytodex 3* a partir del seguiment de l'evolució del pH del medi de cultiu, ha permès realitzar un seguiment bastant acurat de la concentració cel·lular present en els cultius monitorats a dues concentracions cel·lulars inicials, així com el càlcul de les corresponents velocitats de creixement. Amb aquests perfils de creixement i de velocitat s'ha pogut observar una fase de latència extremadament llarga, així com una disminució de la màxima velocitat puntual a la que arriben els cultius (respecte els creixements efectuats en sistemes de cultiu estàtic), indicant la necessitat d'optimització dels microsuports utilitzats i d'un sistema d'alimentació en continu.

5.4 ANÀLISI DE LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR EN CULTIUS DE CÈL·LULES VERO

El seguiment de cultius de cèl·lules *vero* ha manifestat la necessitat de la utilització d'un sistema de mesura en línia de la concentració cel·lular que aportés informació més quantitativa que la obtinguda a partir del seguiment de la velocitat de consum d'oxigen, ja que la quantitat total de cèl·lules presents en el cultiu és massa petita per a que la seva variació al llarg d'un cultiu sigui suficientment significativa, limitant a aquest sistema de seguiment en línia a resultats qualitius.

Per a dotar al sistema d'una mesura acurada i quantitativa de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents, s'ha escollit com a alternativa el monitoratge de l'activitat cel·lular basat en el seguiment dels principals substrats i subproductes del metabolisme cel·lular, la glucosa i el làctic. Tot i que s'ha demostrat la possibilitat del seguiment de l'activitat cel·lular a partir de la mesura directe de les concentracions d'aquests metabòlits, s'ha optat pel seu seguiment indirecte a partir del seguiment en línia de la variació del pH al llarg dels cultius cel·lulars, variació deguda a l'acumulació de subproductes àcids del metabolisme cel·lular. D'aquesta manera s'ha adaptat, pel cultiu de cèl·lules animals adherents (cèl·lules *vero*), un sistema de seguiment del pH desenvolupat en el propi grup d'investigació pel seguiment del pH en cultius de cèl·lules animals en suspensió (Soley-2010) basat en la variació a una determinada longitud d'ona de l'absorbància d'un indicador de pH.

Amb aquests nou sistema de seguiment de l'activitat cel·lular, s'ha pogut realitzar el seguiment dels principals processos referents al cultiu de cèl·lules animals adherents d'una manera quantitativa, tant per a la caracterització del creixement cel·lular en monocapa, per a la determinació de la toxicitat d'una molècula en cultius cel·lulars i per a la caracterització del creixement cel·lular quan s'utilitzen suports com a superfície de cultiu. Amb el seguiment en línia d'aquests processos, s'ha pogut mesurar tant la concentració cel·lular al llarg dels cultius com la velocitat puntual de creixement, mesures que han permès la determinació de propietats bàsiques dels cultius cel·lulars, com la velocitat màxima de creixement pels cultius de cèl·lules *vero*, variables necessàries pel disseny i implementació d'estratègies de cultiu.

Així doncs, es disposa d'un sistema funcional de mesura de la concentració cel·lular per a cultius de cèl·lules animals adherents per a una gran quantitat de les seves aplicacions, com aplicacions en teràpies víriques, teràpies gèniques i teràpies bioquímiques i biofarmacèutiques, així com en aplicacions cel·lulars com per exemple assaigs cel·lulars per a la realització de tests toxicològics o la realització d'escandalls de

drogues, molècules i composts amb potencial per a ser utilitzats en la recerca contra càncers entre d'altres.

Un cop s'ha comprovat el seu funcionament en línies cel·lulars productives (cèl·lules *vero*), ja es pot procedir al seguiment d'aplicacions per a d'altres sistemes de cultiu per a la generació d'altres productes terapèutics, com la teràpia cel·lular i tissular, que requereix de diferents necessitats de cultiu, com pot ser la utilització d'altres línies cel·lulars amb activitats metabòliques diferents, altres medis de cultiu més complexos amb factors de creixement o de diferenciació cel·lular i ambients cel·lulars diferents entre d'altres.

CAPÍTOL 6

APLICACIONS EN TERÀPIES TISSULARS

Una altra de les aplicacions terapèutiques relacionades amb cultiu de cèl·lules animals adherents amb un elevat interès és la teràpia tissular. Degut a la dificultat en el procés d'el·laboració d'aquests productes, el desenvolupament de tecnologies que permetin dotar-les amb un sistema de monitoratge en línia de la concentració i/o activitat cel·lular pren una gran importància. Així doncs, es procedirà a l'aplicació en teràpies tissulars dels elements desenvolupats al llarg d'aquest treball. Prèviament però, a entrar en el detall del treball realitzat, és important ubicar dins de quin àmbit es focalitza i quina és la situació actual de l'entorn en que es veu immers.

6.1 PROBLEMÀTICA TERAPÈUTICA

Un dels problemes més freqüents i costosos de la sanitat, amb un número molt elevat d'afectats i d'alta gravetat en molts dels casos, és la pèrdua o mal funcionament d'un òrgan o teixit, podent ésser causat per diferents patologies, tals com traumatismes per accident, o per diferents tipus de malalties com ara infeccioses, congènites, autoimmunes i neurodegeneratives (Lanza *i col.* 2000). En conseqüència, la necessitat de substituir, reemplaçar o reparar teixits i òrgans degut a malalties o traumatismes, esdevé una necessitat present i de futur.

Actualment, les teràpies clíniques que es duen a terme per tal de substituir un teixit o òrgan no funcional són l'al·lotransplantament, que es basa en el transplantament de l'òrgan malalt per un de sa provinent d'un donant, l'autotrasplantament, on el donant és el propi pacient, del que s'extreu una part d'òrgan o de teixit sa es trasplanta al lloc on sigui necessari i els transplantaments de materials biomimètics, que es basen en

la implantació de materials no biològics que intenten reproduir les característiques funcionals dels teixits i òrgans sans per substituir els teixits i òrgans no sans. Aquestes teràpies però, tenen grans limitacions per tal d'assegurar una substitució totalment satisfactòria d'un teixit o òrgan danyat, com per exemple l'ús de immunosupressors, la descompensació entre nombre de donants i pacients (OCATT·2006), així com l'empitjorament dels pacients i la toxicitat dels materials entre altres.

En aquest context, per intentar solucionar les deficiències observades en les teràpies actuals de reparació de teixits i òrgans, ha sorgit el que es coneix com a enginyeria de teixits o tissular. Dins de l'enginyeria tissular, ens centrarem en dues aplicacions: la regeneració condrocitària i la regeneració cardíaca.

6.1.1 FONT CEL·LULAR

Tal i com ja s'ha comentat a la introducció, les característiques de les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) fan que aquestes siguin les més adequades per a la utilització en teràpies cel·lulars i tissulars, ja que no presenten un rebuig immune a l'esser extretes del propi pacient, on el procés utilitzat no suposa greus perjudicis pel malalt, presenten a més una elevada capacitat de divisió o proliferació *in vitro*, no formen teratomes i poden donar lloc a un gran nombre de tipus cel·lulars amb les mateixes característiques estructurals i funcionals que les cèl·lules del teixit o òrgan sa a regenerar (H. P. Li *i col.*·2007; Maitra *i col.*·2000). En aquest capítol s'utilitzarà aquest tipus cel·lular per a aplicar els diferents sistemes de monitoratge desenvolupat al llarg dels capítols anteriors.

La recerca bàsica efectuada *in-vitro* en estudis de diferenciació condrogènica es troba en un estat molt avançat i s'ha efectuat bàsicament en sistemes murins i humans. La utilització d'animals experimentals de petita mida és adequada per a la recerca bàsica però, prèviament al transferiment d'aquesta tecnologia en una teràpia, és interessant introduir-la en sistemes amb animals grans on la biomecànica és més similar als humans (Aerssens *i col.*·1998; Kon *i col.*·2000; Liu *i col.*·2002). Per aquesta raó s'utilitzaran les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella (oMSC, apartat 8.1.2 de Materials i Mètodes) (Johnstone *i col.*·1998) per a l'apartat de diferenciació condrogènica *in-vitro*. Per altra banda, per a l'apartat de l'enginyeria tissular per a la diferenciació cardíaca, on els avanços realitzats *in-vitro* no són tant extensos com els avanços en la diferenciació condrogènica, s'utilitzaran cèl·lules mare mesenquimals humanes (hMSC, apartat 8.1.3 de Materials i Mètodes) (Pittenger i Martin·2004)

Degut a que les cèl·lules mare mesenquimals, tant d'ovella com humanes, es troben en baixa concentració al cartílag i moll de l'os respectivament, sempre serà necessària efectuar una expansió *ex vivo* per tal d'assolir un nombre de cèl·lules que pugui fer possible la seva aplicació clínica. Alhora, aquest procés

d'expansió s'ha d'acomplir amb la major rapidesa possible per a poder aconseguir que el temps per a la obtenció de les cèl·lules necessàries sigui el més petit possible, de manera que és necessària la seva optimització (Stute *i col.* 2004), ja sigui del medi de cultiu utilitzat, suplementos, factors de creixement o concentracions cel·lulars d'inoculació entre moltes d'altres variables.

Queda palesa, doncs, la necessitat de dotar aquest procés d'expansió amb un sistema de monitoratge en línia que permeti obtenir informació de la concentració cel·lular present, no només per a poder saber en quin moment s'arriba a les concentracions necessàries per a l'aplicació clínica, sinó també per a l'optimització del mateix.

Així doncs, per tal d'observar com s'adapta el sistema de mesura en línia desenvolupat al llarg d'aquest treball en uns nous models cel·lulars (unes cèl·lules d'ovella i unes cèl·lules humanes amb unes velocitats de creixement més lentes que les utilitzades al llarg dels capítols anteriors), amb uns requeriments diferents de medi de cultiu (menys glucosa però més factors de creixement necessaris) i amb la utilització d'uns sèrums diferents (sèrum autòleg de les pròpies ovelles i sèrum AB derivat de sang humana, que contenen citoquines i factors de creixement necessaris pel cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes), el primer que s'haurà de realitzar serà el monitoratge de la concentració cel·lular en cultius per a l'expansió de cèl·lules mare mesenquimals.

6.1.2 ESTÍMULS FÍSICS I QUÍMICS

Tal i com s'ha comentat anteriorment a la introducció, en el cas de la regeneració cel·lular, tan si la font cel·lular prové de cèl·lules adultes autòlogues diferenciades, com si es tracta de cèl·lules mare embrionàries, aquestes poden presentar certes limitacions pel que fa a la seva capacitat de proliferació o de diferenciació cap a les característiques pròpies del teixit que es vol regenerar. Aquest fet fa que l'aplicació de factors físics i químics tingui una gran importància dins les teràpies regeneratives com a estimuladors de la proliferació, la diferenciació i la migració cel·lular.

Per una banda, els reguladors físics representen totes aquelles forces externes que es poden aplicar en una cèl·lula, ja sigui mitjançant la pressió exercida al fer circular un fluid, per la pressió exercida per un element sòlid o a l'aplicar un corrent elèctric. Aquestes forces provoquen una resposta cel·lular en forma de migració (S. Li *i col.* 2005), proliferació (Q. Li *i col.* 1997), diferenciació cel·lular (Chicurel *i col.* 1998; Riha *i col.* 2005) o, fins i tot, de totes tres a la vegada. Per altra banda, els reguladors bioquímics són proteïnes que s'uneixen a receptors de membrana cel·lular i provoquen un seguit de cascades de senyals intracel·lulars que deriven cap a l'activació de la proliferació, la diferenciació i la migració cel·lular. Els

reguladors bioquímics que s'utilitzen actualment en major quantitat són els factors de creixement i les citoquines.

Així doncs, el següent pas dins dels estudis de diferenciació condrogènica i cardíaca serà el monitoratge de cultius de cèl·lules mare mesenquimals en presència d'agents de diferenciació químics i/o físics, amb el subseqüent anàlisis de l'efecte de diferenciació produït en les cèl·lules.

6.1.3 ENTORN TRIDIMENSIONAL: POLÍMERS

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment en la introducció, la necessitat d'utilització de polímers en l'enginyeria tissular ve donada per la capacitat regenerativa i migratòria del teixit a regenerar, així com del grau i tipus de lesió que presenti el teixit o òrgan, però la utilització dels polímers també té utilitat a l'hora d'obtenir matrius amb una estructura tridimensional de teixit amb capacitat de generar estímuls de creixement i de diferenciació cel·lular.

A l'hora d'escollir el polímer a utilitzar, s'ha de tenir en compte el teixit al que s'ha d'aplicar, que en determinarà el conjunt de propietats necessàries pel que fa a les seves propietats físiques (estructura, propietats de transport i propietats biològiques entre altres), així com les capacitats d'estímul corresponents.

Finalment, l'últim pas serà el monitoratge de cultius de cèl·lules mare mesenquimals en presència del corresponent medi de diferenciació (si aquest produeix uns efectes positius en les corresponents diferenciacions condrogènica i cardíaca), però situades en un entorn tridimensional que intenta mimetitzar el nínxol habitual en el que es troben les cèl·lules *in-vivo* per tal d'afavorir-ne la diferenciació.

6.2 ENGINYERIA TISSULAR PER A LA REGENERACIÓ CONDROCITÀRIA

Les malalties degudes a lesions de cartílag, entre les que trobem les derivades per traumatismes o les que deriven d'una degeneració progressiva pel desgast del temps o de seqüeles de fractures, són el tipus de malalties cròniques més extenses tant a nivell europeu (Liga Bundesverband·2001b) com mundial (Arthritis Care·2007), malalties que es relacionen amb un 25% de les visites mèdiques realitzades a Europa (Liga Bundesverband·2001a). Aquest fet fa que els costos socioeconòmics generats per malalties relacionades amb aquest tipus de lesions sigui extremadament alt.

La degeneració progressiva del cartílag deguda al desgast pel temps, comunament anomenada Osteoartritis és la principal afectació entre les diferents tipus d'artritis, i s'estima que afecta a més d'un milió de persones (variable entre un 15 i un 18% de la població) a Catalunya (Sociedad española de reumatología·2009) i fins a més de 100 milions de persones (fins a un 25% de la població) a tota Europa (EULAR·2004).

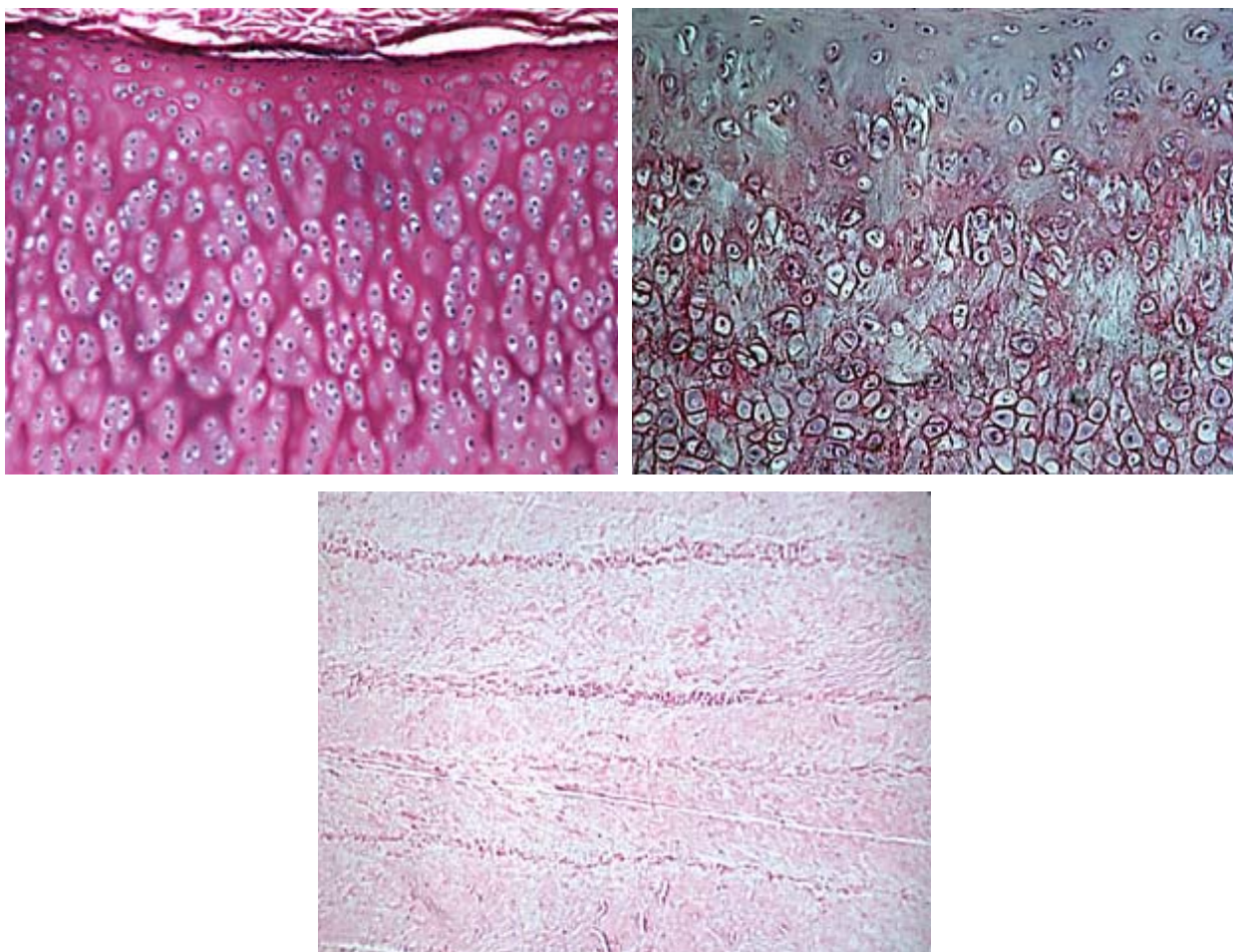


Figura 6.1 Imatges de la histologia dels tres tipus de cartílags existents: el cartílag hialí o articular (foto superior esquerra), el cartílag elàstic (foto superior dreta) i el fibrocartílag (inferior).

Donada la incapacitat regeneradora que presenta el teixit cartilaginós en mamífers, tal i com ja s'ha comentat anteriorment a la taula 1.6 en l'apartat 1.3.1.1 de la introducció (el teixit connectiu només disposa de capacitat reparadora), es fa necessària la creació d'un nou teixit funcionalment equivalent al teixit sa. Aquest teixit cartilaginós, que és un tipus de teixit connectiu que forma part del sistema esquelètic, es troba compost per fibres d'elastina, col·lagen i condrocits en una composició determinada de cada un d'ells que en determina el tipus de cartílag (figura 6.1): hialí o articular, elàstic i fibrocartílag.

Tot i que existeixen ja algunes teràpies de regeneració de cartílag, com són el Transplantament Autòleg de Condròcits (TAC) o la Mosaicoplàstia (o transplantament de cartílag), i que disposen d'un èxit considerable quan es tracta de petits defectes (Bentley *i col.*·2003), aquestes tècniques tenen algunes problemàtiques que fan que encara no siguin del tot satisfactòries pels pacients. Alguns exemples d'aquestes problemàtiques en són la impossibilitat d'utilització en defectes de mides grans, la substitució de la síntesi de cartílag hialí per fibrocartílag (Grigolo *i col.*·2005; Tins *i col.*·2005) amb el corresponent canvi en les propietats mecàniques del teixit, el requisit d'obtenció de condrocits mitjançant la destrucció d'una petita zona sana que incrementa el risc de patir d'Osteoartritis en el futur (Hunziker·2002), o el fet de ser tractaments molt cars (Clar *i col.*·2005). És per aquestes raons que es necessària l'enginyeria tissular a l'hora de generar teixits amb unes característiques adequades.

Per tal d'aconseguir la creació d'aquest teixit funcional serà necessària la utilització dels quatre pilars bàsics de l'enginyeria tissular (figura 1.14 de la introducció), és a dir, d'una font cel·lular, de senyals químicofísics i de polímers, tots a l'interior d'un entorn controlat que permeti l'estimulació física, així com poder obtenir la correcta combinació d'ells per a generar el teixit desitjat. Així doncs, per tal de comprovar que el sistema de monitoratge cel·lular desenvolupat al llarg dels anteriors capítols permet realitzar el seguiment d'aquest procés terapèutic, s'anirà observant i evolucionant el seu funcionament a mesura que es van incorporant en el sistema la resta dels pilars o eines de l'enginyeria tissular.

6.2.1 EXPANSIÓ DE LA FONT CEL·LULAR

A l'hora de dur a terme qualsevol teràpia basada en l'enginyeria tissular per a la creació d'un teixit de característiques morfològiques i mecàniques adequades, es requereix un elevat nombre de cèl·lules per a poder-la iniciar, número que dependrà de l'àrea a regenerar. Així, per tal d'aconseguir aquesta quantitat de cèl·lules per a iniciar una teràpia, serà necessari realitzar una expansió de la font cel·lular escollida.

Així doncs, amb aquesta necessitat d'obtenir una elevada quantitat de cèl·lules, sorgeix la subseqüent necessitat d'obtenir un mètode d'expansió que sigui suficientment ràpid i eficient. Per tant, el primer pas a realitzar ha de ser una caracterització de la font cel·lular, les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella, per a la determinació del principal paràmetre clau, és a dir, la velocitat de creixement. Per a poder comparar els resultats obtinguts amb el sistema de mesura en línia desenvolupat, inicialment es procedirà al seguiment d'un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes mitjançant recomptes de concentració cel·lular mesurats fora de línia.

Degut a l'elevat preu i la baixa disponibilitat dels components necessaris del medi de cultiu, juntament amb la lentitud del creixement cel·lular obtingut en cultius de cèl·lules mare mesenquimals, que comporten uns temps d'espera elevats per a la obtenció del número de cèl·lules necessàries per a engegar l'experiment, s'ha vist adequat realitzar solament el seguiment per duplicat de l'estudi de concentració cel·lular inicial. La concentració cel·lular inicial escollida és de $5000 \text{ cèl·lules/cm}^2$, per a que permeti partir d'una quantitat de cèl·lules significativa (menys error d'inoculació i major repetibilitat en els cultius paral·lels) però que a la vegada disposi d'un recorregut de concentració cel·lular llarg fins a la confluència del cultiu (Peris 2007).

La resta de condicions utilitzades pel seguiment fora de línia són la utilització de sistemes de cultiu en plaques de 6 pous en condicions estàndards de cultiu i la realització de recomptes de concentració cel·lular per duplicat (destrucció de 2 pous de cultiu per mesura) cada aproximadament 48 hores. Pel que fa als recanvis de medi de cultiu, aquests es duran a terme cada 4 dies de cultiu, per tal de que el cultiu no es vegi limitat per esgotament d'algun dels nutrients o d'algun component del sèrum fetal. El perfil de concentració cel·lular obtingut es pot observar a continuació a la figura 6.2

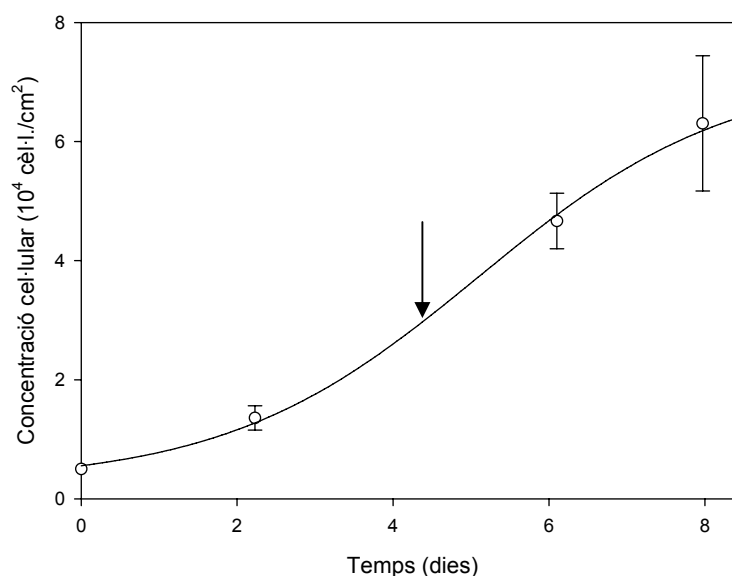


Figura 6.2 Perfil de concentració cel·lular al llarg d'un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella obtingut a partir de recomptes cel·lulars efectuats fora de línia (línia —). La fletxa indica la realització d'un recanvi de medi.

Tal i com es pot observar amb el seguiment efectuat, el cultiu, que comença a créixer des de l'inici de l'experiment sense que s'observi cap fase de latència clara, seguint un creixement exponencial durant els primers 6 dies de cultiu, moment en que s'observa que el cultiu comença a minvar fins al 8è dia de cultiu, arribant a una concentració cel·lular de $6,1 \cdot 10^4 \text{ cèl·lules/cm}^2$.

Tal i com ja s'ha comentat en anteriors capítols, la velocitat de creixement és un paràmetre molt important al realitzar una caracterització cel·lular permetent la comparació entre diferents cultius cel·lular i, pel que fa a les teràpies tissulars, és també un paràmetre molt important que permet la determinació del temps mínim necessari per a efectuar la expansió de la font cel·lular fins a la concentració cel·lular necessària per a poder començar la teràpia. En aquest cultiu, el càlcul de la velocitat de creixement s'ha realitzat mitjançant un ajust exponencial de les dades de concentració cel·lular obtingudes fora de línia, obtenint un valor de $0,361 \text{ d}^{-1}$, velocitat de creixement equivalent a un temps de duplicació de 1,92 dies.

Tal i com ens passava en el capítol anterior en les mesures de concentració cel·lular realitzades mitjançant recomptes fora de línia, la corresponent determinació de la velocitat de creixement del cultiu mesurat es troba fortament influenciada pel fet de disposar només d'un número molt petit de punts de concentració cel·lular. A més, aquests punts poden no trobar-se dins de la fase exponencial del cultiu deguda la dificultat de diferenciar les diferents fases del cultiu i, per tant, incorporen a la mesura una elevada incertesa. Aquestes problemàtiques estimulen la utilització de sistemes de mesura en línia de la concentració cel·lular com els que s'han desenvolupat al llarg dels anteriors capítols.

Així doncs, un cop ja s'ha efectuat la caracterització a partir de recomptes cel·lulars mesurats fora de línia, ja es pot procedir al monitoratge d'aquests cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella a partir del sistema d'estimació de la concentració cel·lular basat en la mesura en línia del pH del medi de cultiu. Per a fer-ho es monitoraran amb aquest sistema dos cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella a la mateixa concentració cel·lular inicial que per a l'anterior experiment ($5000 \text{ cèl·lules/cm}^2$), cultius efectuats a l'interior d'un minibioreactor a unes condicions de cultiu estàndards.

Prèviament però, per tal d'obtenir la concentració cel·lular a partir de la mesura de la concentració de pH, tal i com s'ha efectuat en el capítol anterior pel seguiment de cultius de cèl·lules *vero*, cal efectuar un calibrat entre els dos paràmetres per a la nova font cel·lular utilitzada, les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella. Aquest calibrat, que es pot observar a continuació (figura 6.3), s'ha efectuat a partir de mesures de les variacions en la concentració cel·lular i del pH obtingudes en cultius de les cèl·lules a diferents inòculs inicials i temps de cultiu. Amb aquest calibrat, s'ha obtingut una relació entre la variació dels dos paràmetres de $8,86 \cdot 10^5 \text{ cèl·lules/cm}^2$ per unitat de pH.

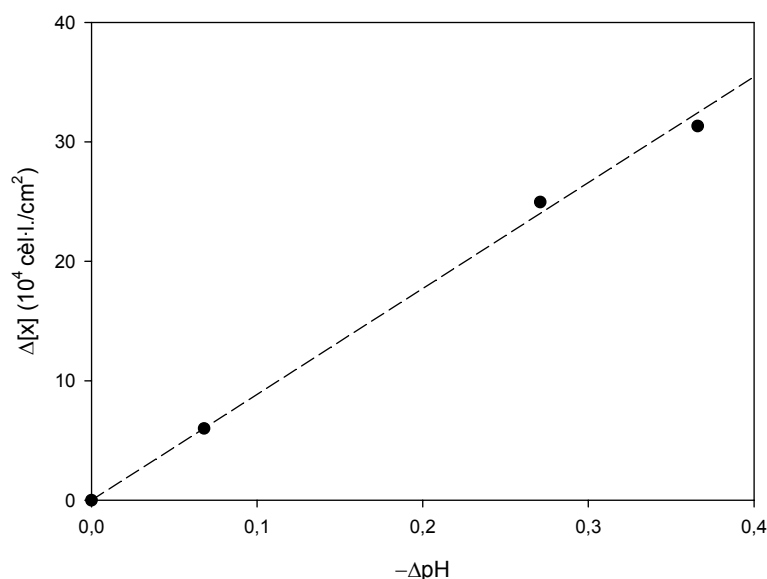


Figura 6.3 Recta de calibratge entre la variació de concentració cel·lular obtinguda i la variació de pH mesurada amb les sondes del sistema, a partir de cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella realitzats en minibioreactors a diferents inòculs i diferents temps de cultiu.

Amb aquesta relació ja es pot obtenir el perfil de concentració cel·lular pels cultius als que s'ha monitorat el seguiment del pH. A la figura 6.4, en el que només s'ha representat un dels cultius monitorats al donar uns resultats sense diferències significatives, es poden observar els resultats obtinguts. A més del perfil de concentració cel·lular obtinguda a partir de la mesura del pH del medi de cultiu, s'ha representat també els valors de concentració cel·lular obtinguts en el monitoratge efectuat fora de línia de l'anterior experiment.

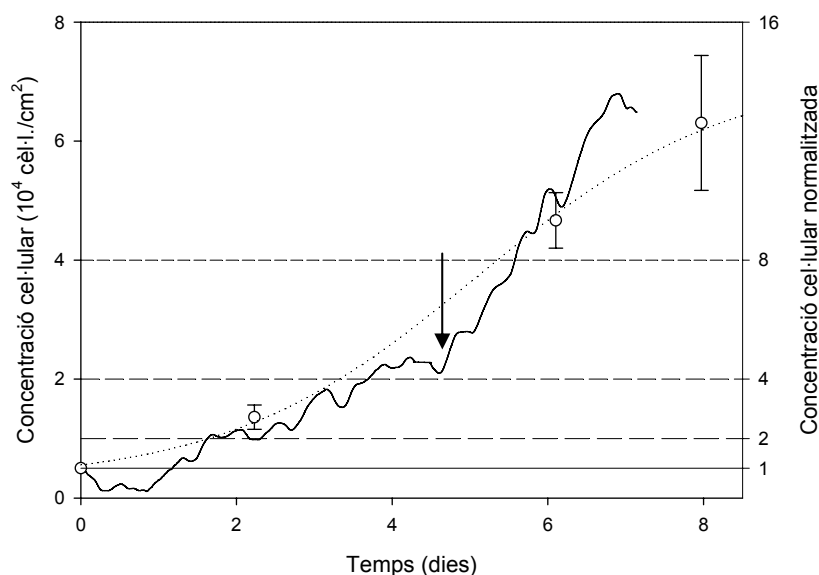


Figura 6.4 Seguiment de la concentració cel·lular a partir del monitoratge en línia del pH (línia —) en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella. La fletxa indica la realització d'un recanvi de medi. S'ha representat també a la figura el perfil de concentració cel·lular obtingut anteriorment (figura 6.2) a partir de recomptes cel·lulars efectuats fora de línia i un eix secundari amb la concentració cel·lular normalitzada (cada línia representa una duplicació).

Per a poder fer unes comparacions entre els creixements obtinguts al llarg d'aquest apartat, a mesura que es van afegint els diferents elements al sistema de monitoratge de l'activitat cel·lular, s'ha vist interessant afegir, a les gràfiques corresponents al monitoratge, un eix secundari amb la concentració cel·lular normalitzada respecte el valor de concentració cel·lular inicial, així com les línies corresponents a cada una de les duplicacions que s'han dut a terme durant el cultiu monitorat.

Si analitzem els resultats obtinguts, primerament es pot observar com la estimació de la concentració cel·lular a partir de la mesura del pH del medi en cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella es troba emmascarada per una variabilitat significativa, sobretot quan es compara amb altres seguiments realitzats anteriorment, en cultius de cèl·lules *vero* (exemples al llarg del capítol 5). S'ha de tenir en compte però, que les concentracions cel·lulars presents en cultius d'aquests dos tipus cel·lulars és molt diferent. Mentre que el cultiu de cèl·lules *vero* arriba a valors de confluència d'unes $100 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², el cultiu de cèl·lules mesenquimals d'ovella arriba a unes $7 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², és a dir, una concentració cel·lular unes 15 vegades menor.

A més, si es comparen els consums de glucosa i les produccions de làctic (taula 6.1), també s'observa com el consum de glucosa i la producció de làctic de les cèl·lules mesenquimals d'ovella (oMSC) són significativament inferiors, amb disminucions d'un 37% i d'un 21% respectivament. Aquests fets fan que la producció de làctic total sigui molt inferior en els cultius de cèl·lules mare i, per tant, que també ho sigui l'acidificació del medi i la corresponent variació del pH, traduint-se amb la major variabilitat en la mesura del pH del medi de cultiu, observada en la corresponent estimació de la concentració cel·lular.

Taula 6.1 Valors de les velocitats de consum de glucosa i velocitats de producció de làctic per a les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella (oMSC) i les cèl·lules *vero*. Càlculs efectuats a l'apartat 8.8.2 de Materials i Mètodes.

línia cel·lular	oMSC	vero
qs ($\mu\text{mols glucosa} / (106 \text{ cèl·l.} \cdot \text{dia})$)	10,89	17,39
qp ($\mu\text{mols làctic} / (106 \text{ cèl·l.} \cdot \text{dia})$)	23,38	29,66

Tot i aquesta variabilitat detectada en la mesura, tornant a la figura 6.4 es pot observar una bona correlació entre les mesures fora de línia i el monitoratge en línia realitzat a partir de la mesura del pH del medi de cultiu. Amb aquest perfil en línia de la concentració cel·lular, ja es pot procedir a la determinació de la velocitat màxima de creixement per a les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella. Pel càlcul de cada valor de velocitat puntual, s'ha tingut en compte les mesures efectuades durant l'últim període de $\frac{1}{2}$ dia respecte el temps de mesura, mentre que per a la velocitat acumulada s'han tingut tots els valors de concentració cel·lular obtinguts fins el temps corresponent a la mesura de la velocitat. S'ha de tenir en compte però, que

la variabilitat detectada anteriorment en la mesura del pH pels cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella també aporta un augment de la incertesa a la mesura de les velocitats de creixement, en major grau per a la mesura de la velocitat puntual, en la que només es tenen en compte les mesures en un interval de $\frac{1}{2}$ dia de cultiu.

A la figura 6.5 (esquerra) s'han representat els perfils de les velocitats de creixement puntual i acumulada obtingudes a partir de les mesures de pH del medi de cultiu, juntament amb els corresponents perfils de velocitat puntual i acumulada (figura 6.5, dreta) obtinguts a partir de les anteriors mesures efectuades fora de línia. Aquestes velocitats corresponents a les mesures fora de línia han estat calculades amb la totalitat dels punts fins al moment de la mesura per a la velocitat acumulada, mentre que per a la velocitat puntual s'han utilitzat només els últims dos punts de concentració cel·lular obtinguts fins al moment de la determinació de la velocitat.

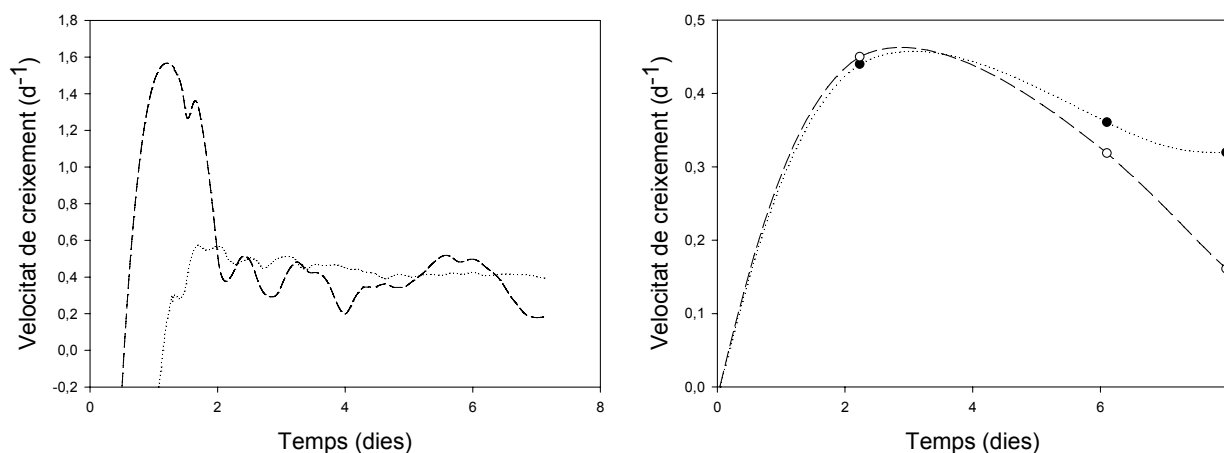


Figura 6.5 Perfils de les velocitats de creixement puntual (línies – –) i acumulada (línies ···) al llarg dels dos cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella, el cultiu monitorat a partir de la mesura en línia del pH del medi (esquerra) i el cultiu monitorat a partir de mesures fora de línia de la concentració cel·lular (dreta)

Si ens fixem amb els perfils obtinguts a partir de les mesures de pH, es pot observar que la velocitat de creixement puntual va augmentant ràpidament a l'inici del cultiu fins a arribar a un valor màxim aproximadament als 1,5 dies de cultiu. S'ha de tenir en compte però, que la variabilitat de la mesura és bastant elevada en els moments inicials del cultiu, on la concentració cel·lular és molt baixa (primers 2 dies de cultiu de la figura 6.4) i, per tant, el valor obtingut de velocitat màxima de creixement (aproximadament 1,5 d⁻¹) porta incorporat un error molt elevat. Un cop arriba a aquesta velocitat màxima, la velocitat de creixement disminueix fins a estabilitzar-se a una velocitat puntual de 0,4 d⁻¹ (equivalent a un temps de duplicació de 1,7 dies) que es manté fins al 6è dia de cultiu en el que es pot observar un descens significatiu fins al final del cultiu.

Per altra banda, la velocitat acumulada segueix un camí similar, arribant a un màxim al 2on dia de cultiu a partir del qual es va disminuint paulatinament fins al final del cultiu. Igualment com passa en la velocitat de creixement puntual, els valors obtinguts al principi del cultiu es troben influenciats per la variabilitat de la mesura a concentracions cel·lulars baixes, tot i que per a la mesura de velocitat acumulada a mesura que avança el cultiu el número de punts utilitzats augmenta, fent que cada cop la mesura es trobi menys influenciada per la variabilitat de la mesura i, per tant, que comporti menys error. Aquest fet, fa que el màxim obtingut per a la velocitat de creixement acumulada ($0,57 \text{ d}^{-1}$, que correspon a un temps de duplicació de 1,21 dies) sigui més fiable que el màxim obtingut per a la velocitat de creixement puntual per tal de determinar la velocitat màxima de creixement pel cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella.

Observant el perfil de velocitats obtingut a partir de les mesures fora de línia, es pot veure que al disposar només d'un nombre molt petit de mesures de concentració cel·lular, fa que els perfils de velocitats puntual i acumulada per a les mesures efectuades fora de línia siguin pràcticament iguals. Si es comparen aquests perfils de les velocitats de creixement amb els obtinguts per a les mesures de concentració cel·lular efectuades en línia, es pot observar que tenen uns comportaments similars. Primerament hi ha un augment de la velocitat de creixement fins al segon dia de cultiu (temps de mesura de concentració cel·lular), a partir del qual va disminuint lleugerament fins al 6è dia de cultiu i més marcadament fins al final del cultiu al 8è dia de cultiu.

Tot i el comportament similar obtingut, el fet de disposar d'un nombre molt baix de mesures de concentració cel·lular fa que el valor de la màxima velocitat de creixement de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella obtingudes a partir de les mesures fora de línia difereixin molt de la màxima velocitat obtinguda a partir de les mesures realitzades en línia, passant de $0,57 \text{ d}^{-1}$ a $0,44 \text{ d}^{-1}$ (aproximadament un 25% de variació), indicant la importància de l'obtenció d'aquesta mesura en línia de la concentració cel·lular.

Així doncs, s'ha pogut comprovar que el sistema de monitoratge de l'activitat cel·lular i estimació de la concentració cel·lular basat en la mesura del pH desenvolupat anteriorment és idoni per a realitzar la caracterització del creixement cel·lular per a aquesta font, obtenint uns resultats en línia que permeten l'estimació dels principals paràmetres de cultius cel·lulars amb una millor exactitud que les metodologies actuals pel seguiment de la concentració cel·lular (mesures de concentració cel·lular efectuades fora de línia) i sense la necessitat de realitzar experiments en paral·lel. Amb aquesta caracterització, ja es poden començar a afegir la resta de pilars de l'enginyeria tissular en el sistema desenvolupat, per tal de poder observar com aquest s'adapta als efectes provocats en el creixement de la font cel·lular.

6.2.2 ESTÍMULS QUÍMICS: MEDI DE DIFERENCIACIÓ

Varis grups de recerca han mostrat, dins de l'enginyeria tissular per a la regeneració condrocitària, que l'addició d'un Factor Transformador del Creixement (Transforming Growth Factor, TGF- β 1) i de la Dexametasona en el medi de cultiu indueix les cèl·lules mare mesenquimals a la diferenciació condrogènica. Aquesta inducció s'ha dut a terme en línies de cèl·lules mare mesenquimals de diferents espècies, incloent models murins (Seyedin *i col.*·1985), canins (Kadiyala *i col.*·1997), conill (Johnstone *i col.*·1998), humans (Mackay *i col.*·1998), equins (Worster *i col.*·2000), bovins (Bosnakovski *i col.*·2004).

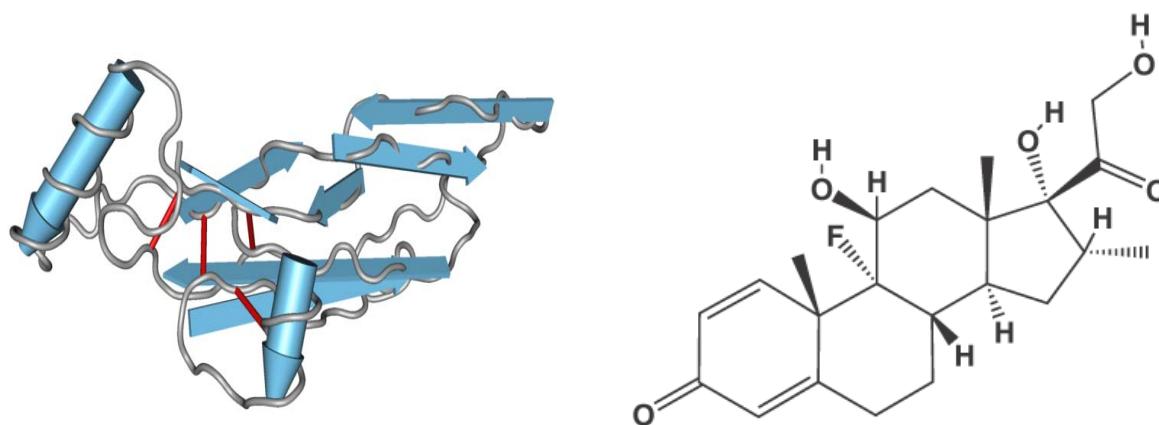


Figura 6.6 Estructures moleculars del TGF- β (esquerra) i de la Dexametasona (dreta).

El TGF- β 1 (figura 6.6, esquerra) és una proteïna de regulació del creixement cel·lular que es va identificar per primer cop al 1978, i que forma part d'una família (TGF- β) de tres proteïnes (β 1, β 2 i β 3) estructuralment molt similars que activen el mateix receptor cel·lular. Aquesta família de proteïnes es troba involucrada en una gran varietat de processos biològics com per exemple en el desenvolupament de l'embrió, en la reparació de teixits danyats, l'apoptosi i l'angiogènesis entre altres (A. B. Roberts *i col.*·1985; Russo *i col.*·2009; Todaro *i col.*·1980). Per altra banda, la Dexametasona (figura 6.6, dreta) és un glucocorticoide sintètic amb varies propietats terapèutiques com per exemple anti-inflamatòries, anti-oncològiques i endocrines entre altres (Keith·2008; Slater *i col.*·1959).

Respecte als estímuls físics i químics que s'utilitzaran en aquest apartat de treball d'enginyeria tissular per a la diferenciació condrogènica, ens centrarem en l'efecte d'inducció a la diferenciació cap a condrocit d'un medi de cultiu en presència de TGF i Dexametasona (medi complet d'inducció condrogènica (Tanabe *i col.*·2008), descrit a l'apartat 8.3.5 de Materials i Mètodes), en cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella.

6.2.2.1 MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR I ESTUDI METABÒLIC

Així doncs, per tal d'estudiar l'efecte que provoca l'ús d'aquest medi complet d'inducció condrogènica (MCIC) com a agent de diferenciació cap a condrocit, es realitza el seguiment en línia de la concentració cel·lular, estimada a partir de la mesura del pH del medi de cultiu, en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cultivat amb aquest medi de cultiu. Tot i que la durada del procés d'expansió cel·lular fins a la concentració de confluència sigui de 8 dies, en el procés de diferenciació cel·lular es prolonga per tal d'assegurar una diferenciació més completa. Bibliogràficament, s'utilitzen temps de cultiu d'entre 7 i 21 depenent de l'estudi a realitzar (figura 6.7), de manera que en aquest estudi s'allargarà el cultiu fins als 14 dies de cultiu per permetre la completa expressió genètica dels marcadors condrogènics com el col·lagen II i que el procés de diferenciació ja es trobi ben entrada en la última fase d'acumulació de glucosaminoglicans (GAGs), fase que dirigeix ja a la formació de condrocits madurs.

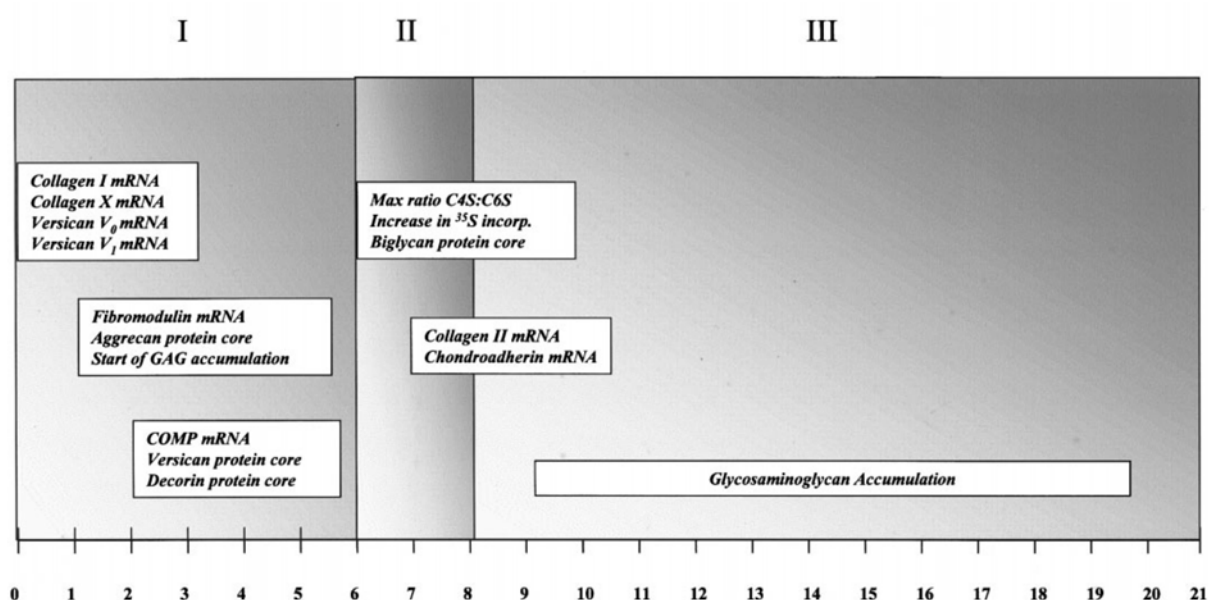


Figura 6.7 Esquema de successos, determinats per l'expressió dels components extracel·lulars secretats, al llarg de la diferenciació de cultius de cèl·lules mare mesenquimals cultivades amb medi complet d'inducció condrogènica (MCIC). (Barry i col·l·l: 2001)

La concentració cel·lular utilitzada és la concentració de confluència obtinguda en el procés d'expansió efectuat anteriorment, és a dir, unes $7,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm². D'aquesta manera, al trobar-se limitades per espai, no poden créixer amb normalitat i induint el cultiu cap a la diferenciació cel·lular. El cultiu monitorats s'ha dut a terme en un minibioreactor situats a l'interior d'un Hexascreen amb el que s'han mantingut unes condicions de cultiu estàndards (descrites a l'apartat 8.4.3.1 de Materials i Mètodes). Els resultats es poden observar a continuació a la figura 6.8.

Si es compara el perfil obtingut amb el seguiment del procés d'expansió efectuat anteriorment, es pot veure com la sensibilitat de la mesura ha millorat significativament en aquest cultiu. Aquesta millora es deguda a l'augment de les concentracions de cèl·lules de treball que augmenten el consum total de glucosa i la producció total de làctic i, per tant, també augmenten la variació obtinguda en el pH del medi de cultiu amb la conseqüent millora de la sensibilitat de la mesura.

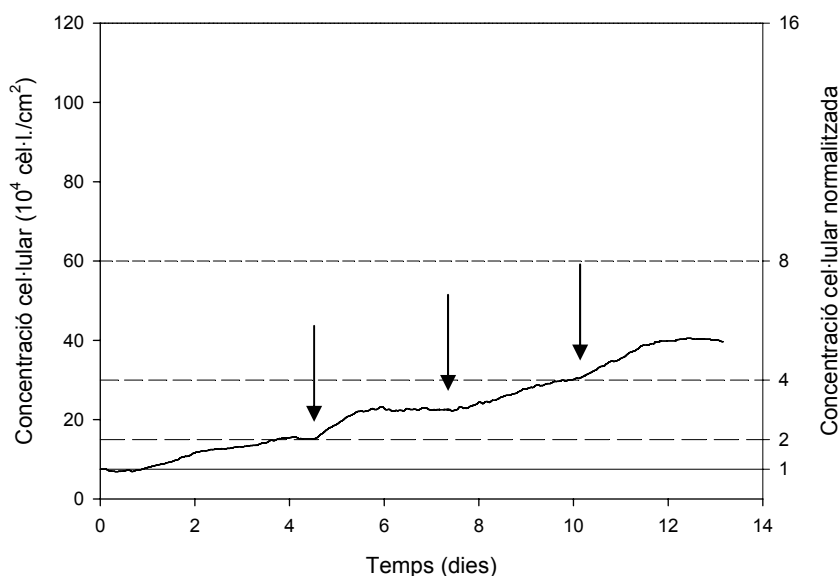


Figura 6.8 Seguiment de la concentració cel·lular a partir del monitoratge en línia del pH (línia —) en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella efectuat amb medi de diferenciació condrogènic. Les fletxes indiquen la realització d'un recanvi de medi. Per a poder comparar millor els creixements, s'ha mantingut la mateixa escala de l'eix normalitzat que en la figura 6.4, corresponent al creixement amb medi normal.

Tal i com es pot observar en el perfil del cultiu, tot i que es pot observar un creixement continu al llarg de pràcticament tot el cultiu, aquest s'ha disminuït clarament si es compara amb el corresponent creixement de l'apartat de monitoratge del procés d'expansió cel·lular, en el que les cèl·lules s'havien duplicat 3 cops en només 6 dies de cultiu, mentre que en aquest cultiu només s'han duplicat 2 cops en 10 dies de cultiu. Així doncs, tot i haver inoculat al valor de concentració cel·lular de confluència obtingut en sistemes de cultiu estàndards i haver utilitzat un medi de diferenciació, aquest es capaç de créixer, encara que molt lleugerament, arribant a una concentració cel·lular de $40 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm².

Tot i que els recanvis de cultiu es realitzaven cada 4 dies, a causa de l'estancament momentani entre el 6è i 7è dia, un altre durant l'últim dia de cultiu i els valors elevats de la concentració cel·lular, s'ha vist adequat disminuir el període de temps entre recanvis a 3 dies. Per tal de realitzar un anàlisi més complert, s'han representat a continuació a la figura 6.9 les velocitat de creixement puntual i acumulada obtingudes en aquest cultiu amb medi de diferenciació. Tal i com es pot observar i, a l'igual que en els creixements

anterior, el perfil de la velocitat puntual de creixement té un pic inicial que conté la màxima velocitat puntual a la que ha arribat el cultiu, mentre que després es manté en valors positius més petits.

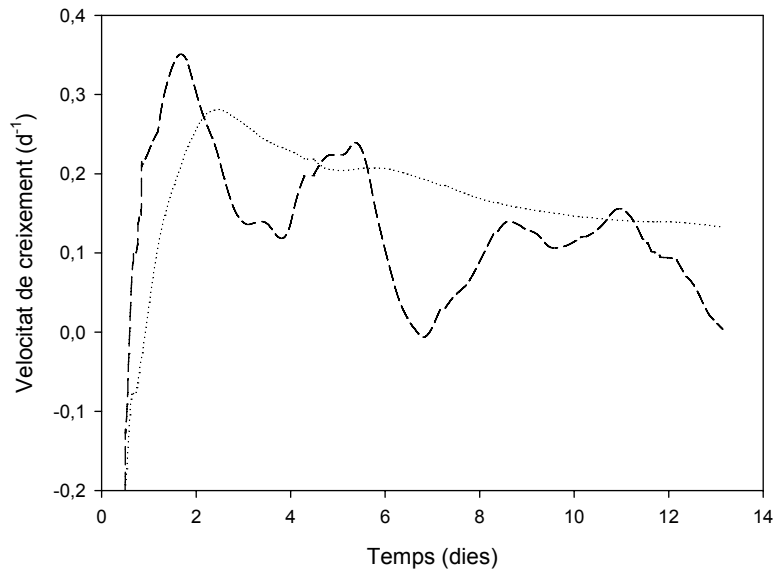


Figura 6.9 Perfils de les velocitats de creixement puntual (línia --) i acumulada (línia ···) obtinguts a partir de la mesura en línia del pH, mesurades al llarg del cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella efectuat amb medi de diferenciació.

Igual que en el cultiu anterior, les fluctuacions obtingudes amb el monitoratge de la velocitat puntual fan que sigui més idoni agafar com a màxima velocitat de creixement la obtinguda a partir de la mesura de la velocitat acumulada que, en aquest cultiu, arriba a un valor de 0,28 d⁻¹ (temps de duplicació de 2,5 dies). Aquesta màxima velocitat de creixement, obtinguda als dos dies de cultiu, és significativament inferior als valors obtinguts durant l'experiment d'expansió cel·lular (sense la utilització del medi de diferenciació MCIC), que arriba a valors de 0,44 i 0,57 d⁻¹ (figura 6.5, temps de duplicació de 1,58 i 1,21 dies respectivament) mesurades mitjançant els seguiments fora de línia i en línia respectivament. També disminueix significativament el valor de la velocitat a la que s'estabilitza després d'assolir el màxim valor de la velocitat puntual de creixement, que en aquest creixement es situa a valors de 0,14 d⁻¹ (temps de duplicació de 5 dies) respecte el valor de 0,40 d⁻¹ (temps de duplicació de 1,7 dies) obtingut sense el medi de diferenciació. També en aquest tram del cultiu un cop ja ha passat el primer pic inicial de màxima velocitat de creixement, es poden observar fluctuacions en la mesura de la velocitat situades al voltant d'una velocitat puntual de 0,1-0,2 d⁻¹ (temps de duplicació aproximat de 3,5-7 dies), tot i que aquestes fluctuacions són degudes a l'esgotament de nutrients i als recanvis de medi, realitzats durant els dies 4, 7 i 10 del cultiu.

Així doncs, amb el monitoratge de la concentració cel·lular al llarg del cultiu amb presència de medi de diferenciació, s'ha pogut observar que no hi ha hagut una aturada total del creixement com correspondria en un cultiu de cèl·lules totalment diferenciades (cèl·lules que han perdut la capacitat de divisió), però sí que s'ha pogut observar una clara disminució de la màxima velocitat de creixement obtinguda per ambdós cultius (variació del 55%), així com de la velocitat puntual a la que s'estabilitza després d'arribar a aquesta velocitat màxima (variació del 65%). El fet que el creixement no s'aturi i que el cultiu continuï creixent, és un fet normal, ja que la diferenciació cel·lular és un procés lent que es dona al llarg d'un temps elevat (Antonitsis *i col.*:2007; Fukuda:2001), mentre que la màxima velocitat de creixement del cultiu es dona en la primera fase del cultiu i, a partir d'aquest moment, la velocitat puntual va decreixent significativament al llarg del cultiu.

Tot i això, s'ha de tenir en compte el fet que la concentració inicial d'aquest cultiu és pràcticament la de confluència del cultiu anterior i, per tant, el cultiu es troba influenciat, com tots els cultius de cèl·lules animals adherents, per una inhibició per contacte cel·lular que afecta en major grau com més elevada és la concentració cel·lular (Abercrombie i Ambrose:1962). Per tant, tot i que la disminució obtinguda en la velocitat de creixement pugui indicar un inici en la diferenciació cel·lular de les oMSC, aquesta diferenciació s'haurà de comprovar genèticament.

Per poder comparar els resultats obtinguts amb mesures efectuades fora de línia, s'ha efectuat el seguiment dels consums acumulats de glucosa i les produccions acumulades de làctic en cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella, tant cultivades amb medi de diferenciació MCIC com cultivades amb medi normal de creixement. El seguiment s'ha efectuat en duplicats de cultius, mitjançant mesures de concentració de glucosa i làctic en el medi de cultiu durant el recanvi de medi dels minibioreactors, amb el posterior càlcul del consum de glucosa i producció de làctic resultants a partir de les equacions següents:

$$\Delta Glucosa_{consumida} = [Glucosa]_0 \cdot V_0 - [Glucosa]_f \cdot V_f \quad [Eq. 6.1]$$

$$\Delta Làctic_{produït} = [Làctic]_f \cdot V_f - [Làctic]_0 \cdot V_0 \quad [Eq. 6.2]$$

Els resultats obtinguts es poden observar a continuació a la figura 6.10, on s'han representat els perfils de glucosa consumida (esquerra) i el làctic produït.

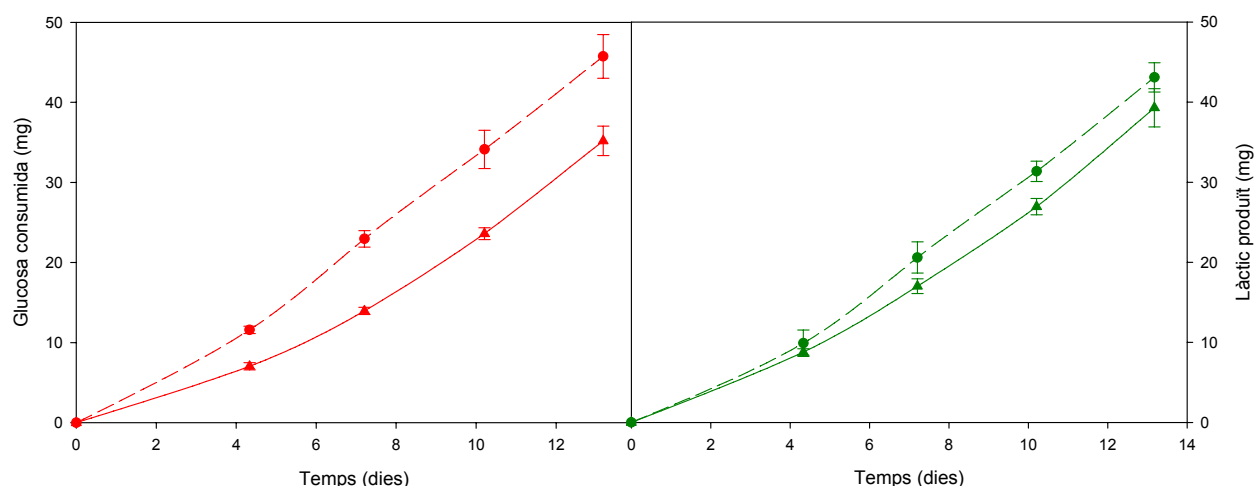


Figura 6.10 Seguiments de la variació de la glucosa consumida (esquerra, línies en vermell) i de la producció d'àcid làctic (dreta, línies en verd) al llarg dels diferents cultius, a partir de mesures fora de línia efectuades durant els recanvis de medi efectuats. Els cultius analitzats són de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cultivades amb medi de creixement normal (línies — i símbols ▲) i cultivades amb medi de diferenciació (línies – – i símbols ●).

Tot i que amb el seguiment del consum de glucosa i la producció de làctic sembla que les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cultivades amb medi de diferenciació presentin un metabolisme significativament més elevat que les mateixes cèl·lules cultivades en un medi normal de creixement, s'ha de tenir en compte que la concentració cel·lular és unes 6 vegades superior en els cultius de cèl·lules cultivades amb medi de diferenciació (concentració cel·lular final de 40 i $7 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² respectivament). Per tant, el que realment es té és una disminució molt elevada del metabolisme cel·lular, passant d'un consum de glucosa de 35,5 mg/(10⁴ cèl·lules finals) del cultiu sense medi de diferenciació als 8,1 mg/(10⁴ cèl·lules finals) en medi de diferenciació MCIC i d'una producció de làctic de 39,7 a 7,6 mg/(10⁴ cèl·lules finals) respectivament (disminucions del 77% pel consum de glucosa i del 81% per la producció de làctic).

6.2.2.2 ESTUDI GENÈTIC I MORFOLÒGIC

Tot i que aquestes disminucions del metabolisme i de la velocitat de creixement es poden atribuir a la diferenciació cel·lular, cal comprovar que realment han començat a produir-se canvis interns en les cèl·lules mare mesenquimals a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació. Aquesta comprovació es realitza mitjançant un estudi genètic i morfològic, tant dels cultius als que s'ha realitzat el tractament com als que no se'ls ha realitzat. En el cas de diferenciació condrogènica de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cultivades en monocapa, l'estudi morfològic no aporta informació útil (figura 6.11), ja que els condrocits adults diferenciats tenen una morfologia esfèrica, morfologia que no podria agafar cap línia cel·lular mentre es cultivi en monocapa, inclòs els propis condrocits diferenciats, que pateixen una desdiferenciació quan es cultiven en monocapa (Goessler *i col.* 2005).

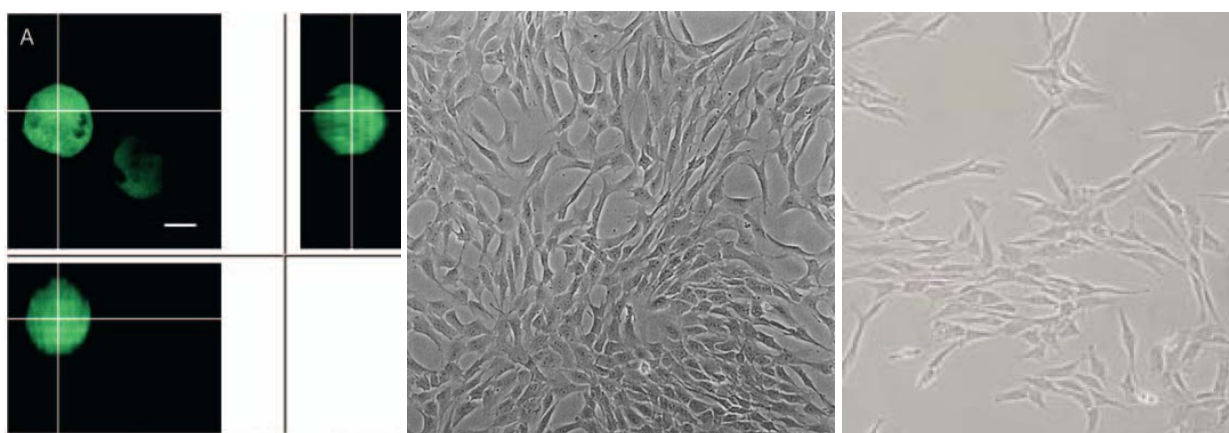


Figura 6.11 Fotografies de la morfologia de condrocits i de oMSC. A l'esquerra es mostren imatges (mitjançant microscòpia confocal) dels talls superficials en els eixos x-y-z d'un condrocit en la seva morfologia esfèrica natural (Blanc *i col.*·2005). En el centre es mostra una imatge d'un cultiu de condrocits cultivat en monocapa (desdiferenciat). A la dreta es mostra una imatge de les pròpies oMSC cultivades en monocapa.

Així doncs, aquest apartat en el que les cèl·lules es cultiven en monocapa, només es basarà en el seguiment de marcadors genètics per a la determinació del grau de diferenciació cap a condrocit absolut en el cultiu de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cultivades amb medi de diferenciació, amb el corresponent control amb el seguiment dels mateixos marcadors genètics quan aquestes es cultiven en un medi normal de creixement. Per a efectuar aquesta caracterització genètica s'analitzarà, mitjançant la tècnica de la *RT-PCR*, l'expressió dels gens (marcadors) GAPDH, Aggrecan, Biglycan, TGF- β , Col·lagen I i Col·lagen II.

El primer de tots els marcadors genètics, el gen del GAPDH (Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa), al ser un gen que expressa de forma constitutiva un dels enzims involucrats en la glicòlisis, és un marcador que ha de donar positiu en totes les cèl·lules i, per tant, s'utilitza com a control positiu de l'estat de l'RNA extret de la població cel·lular a analitzar (Antonitsis *i col.*·2007).

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, el TGF- β és una proteïna de regulació del creixement cel·lular i la seva presència en el medi de cultiu és un dels principals actius per a la diferenciació condrogènica de les cèl·lules. Com a marcador genètic, l'expressió del TGF- β endogen es troba relacionada en els primers estats, tant *in vivo* en l'embrió (Frenz *i col.*·1992), com *in vitro* durant la diferenciació condrogènica induïda mitjançant TGF- β exogen (Leonard *i col.*·1991).

El Col·lagen I, com tots els tipus de col·lagen, està constituït per unes proteïnes fibril·lars que consten de tres cadenes polipeptídiques (cadenes α) formant una estructura de triple hèlix (Beck i Brodsky·1998). Aquesta estructura li proporciona al col·lagen I unes propietats mecàniques òptimes (Rabotyagova *i col.*·2008), de manera que la seva principal funció és de mantenir la integritat dels diferents teixits, fins i tot el cartílag (Bastiaansen-Jenniskens *i col.*·2008), a través de les seves interaccions amb superfícies cel·lulars, altres molècules de la matriu extracel·lular, factors de creixement i de diferenciació (Di Lullo *i col.*·2002). Pel que fa a la expressió del col·lagen I, aquesta es troba associada a les cèl·lules condrocitàries desdiferenciades, així com en un estadi primerenc en la diferenciació condrogènica (Mallein-Gerin *i col.*·1991).

El Col·lagen II és un altre tipus de col·lagen i, tal i com ja s'ha comentat, la seva funció és la de mantenir la integritat d'un teixit. En el cartílag hialí (Miller i Mathews·1974), aquest tipus de col·lagen n'és el predominant, amb aproximadament un 90% del col·lagen total (Burgeson i Hollister·1979). Com a marcador genètic, la seva expressió indica una fase mitjana-avançada en la diferenciació condrogènica (Treilleux *i col.*·1992).

L'Aggrecan és una proteïna amb un alt contingut de cadenes de polisacàrids carregades negativament que contribueix a la creació d'un entorn osmòtic responsable de la resposta del cartílag a la pressió. Aquesta pressió és contrarestada per la resistència de les fibres de col·lagen donant al cartílag les propietats característiques de resistir les forces de compressió i de tracció (Kuettner *i col.*·1991). La degradació de l'aggrecan es troba associada amb el desenvolupament de diferents formes d'artritis (Lark *i col.*·1997; Neame i Sandy·1994). L'expressió d'aquest gen es troba relacionada amb l'acumulació d'agregats de proteoglicans (C. R. Roberts i Pare·1991) i, per tant, la seva expressió indica una fase avançada en la diferenciació condrogènica (Treilleux *i col.*·1992).

Finalment, el Biglycan es una proteïna de la família dels petits proteoglicans rics en leucina (Scott i Haigh·1985), que es troba formada per dues cadenes de glicosaminoglicans unides a una part globular central (Fisher *i col.*·1989). El Biglycan és el proteoglicà d'aquesta família més abundant en el cartílag articular (L. C. Rosenberg *i col.*·1985) i, juntament amb una altra proteïna molt similar de la mateixa família, Decorin, formen el subgrup dominant de la matriu fibril·lar (Schonherr *i col.*·1995), a partir d'unions amb les fibres de col·lagen. L'expressió del Biglycan en el procés de diferenciació es troba relacionada amb la fase avançada de la diferenciació d'acumulació de glicosaminoglicans.

Així doncs, al final del procés de diferenciació condrogènica mitjançant estímuls químics, s'ha efectuat el seguiment d'aquests 5 marcadors genètics diferents, on les corresponents estructures moleculars es poden observar a continuació a la figura 6.12 (excepte pel TGF- β , que es pot observar a la figura 6.6), dels quals dos s'expressen en etapes més inicials de la diferenciació (TGF- β i Col·lagen I), un en etapes més avançades (Col·lagen II) i finalment dos més en les etapes finals (Aggrecan i Biglycan).

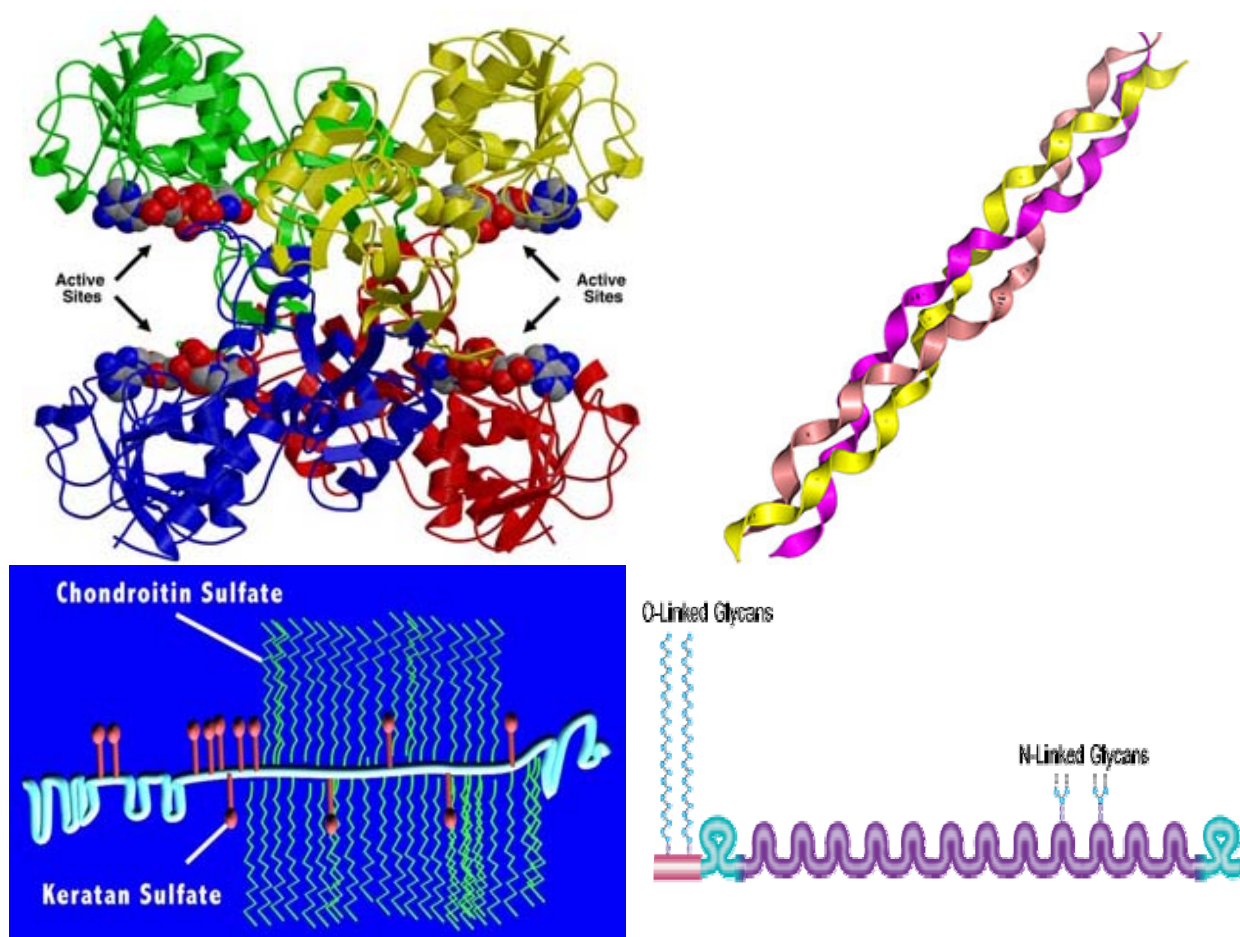
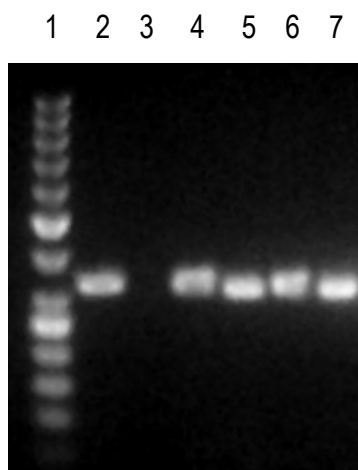


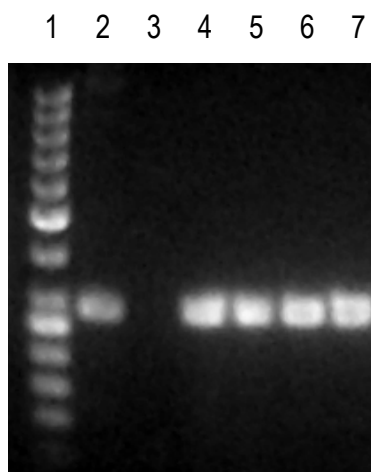
Figura 6.12 Estructures moleculars de les proteïnes corresponents als marcadors genètics. Les proteïnes són (d'esquerra a dreta i de dalt a baix) el GAPDH, els col·làgens, l'aggrecan i el biglycan.

Pel seguiment dels diferents marcadors genètics, s'ha efectuat la RT-PCR de les mostres (protocols a l'apartat 8.6.3 de Materials i Mètodes) i, posteriorment, s'ha realitzat una electroforesi en gel d'agarosa a l'1%. Els gels resultants es mostren a continuació a la figura 6.13 pel GAPDH, a la figura 6.14 pel TGF- β , a la figura 6.15 pel Col·lagen I, a la figura 6.16 pel Col·lagen II, a la figura 6.17 per l'Aggrecan i finalment a la figura 6.18 pel Biglycan.



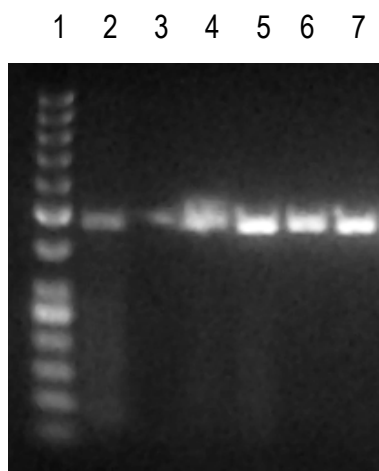
- Carril 1: Marcador de pes molecular
- Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
- Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
- Carril 4: amb medi normal (a)
- Carril 5: amb medi normal (b)
- Carril 6: amb medi de diferenciació (a)
- Carril 7: amb medi de diferenciació (b)

Figura 6.13 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres del GAPDH per a duplicats de les oMSC cultivades amb medi de cultiu normal i amb medi de diferenciació.



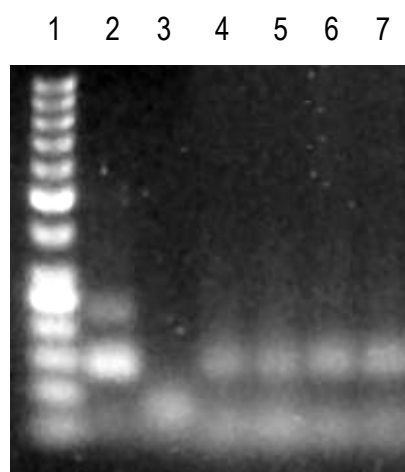
- Carril 1: Marcador de pes molecular
- Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
- Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
- Carril 4: amb medi normal (a)
- Carril 5: amb medi normal (b)
- Carril 6: amb medi de diferenciació (a)
- Carril 7: amb medi de diferenciació (b)

Figura 6.14 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres del TGF- β per a duplicats de les oMSC cultivades amb medi de cultiu normal i amb medi de diferenciació.



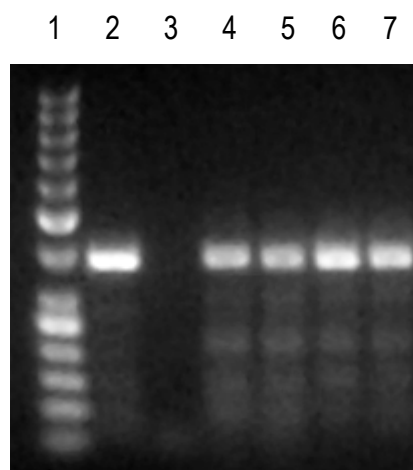
- Carril 1: Marcador de pes molecular
- Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
- Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
- Carril 4: amb medi normal (a)
- Carril 5: amb medi normal (b)
- Carril 6: amb medi de diferenciació (a)
- Carril 7: amb medi de diferenciació (b)

Figura 6.15 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres del Col·lagen I per a duplicats de les oMSC cultivades amb medi de cultiu normal i amb medi de diferenciació.



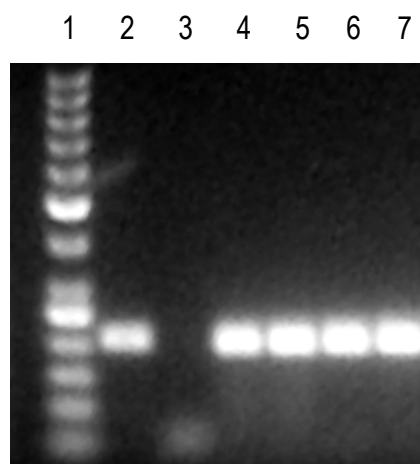
- Carril 1: Marcador de pes molecular
- Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
- Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
- Carril 4: amb medi normal (a)
- Carril 5: amb medi normal (b)
- Carril 6: amb medi de diferenciació (a)
- Carril 7: amb medi de diferenciació (b)

Figura 6.16 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres del Col·lagen II per a duplicats de les oMSC cultivades amb medi de cultiu normal i amb medi de diferenciació.



- Carril 1: Marcador de pes molecular
- Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
- Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
- Carril 4: amb medi normal (a)
- Carril 5: amb medi normal (b)
- Carril 6: amb medi de diferenciació (a)
- Carril 7: amb medi de diferenciació (b)

Figura 6.17 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres de l'Aggrecan per a duplicats de les oMSC cultivades amb medi de cultiu normal i amb medi de diferenciació.



- Carril 1: Marcador de pes molecular
- Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
- Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
- Carril 4: amb medi normal (a)
- Carril 5: amb medi normal (b)
- Carril 6: amb medi de diferenciació (a)
- Carril 7: amb medi de diferenciació (b)

Figura 6.18 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres del Biglycan per a duplicats de les oMSC cultivades amb medi de cultiu normal i amb medi de diferenciació.

Primerament, es pot comprovar a partir de la mesura de l'expressió del GAPDH (control positiu, figura 6.13), que la tècnica de la RT-PCR s'ha aplicat correctament al donar positiu a la totalitat dels cultius analitzats excepte pel control negatiu corresponent, en el que s'ha mesurat l'expressió del gen en una mostra d'aigua. Si s'observa la resta de figures amb la corresponent expressió dels diferents gens analitzats, no es troba cap diferència significativa entre els cultius en monocapa cultivats amb medi normal i els cultivats amb medi de diferenciació, indicant que no s'ha obtingut cap diferència genètica significativa en la diferenciació cap condrocit mitjançant la utilització del medi de diferenciació condrogènic.

Analitzant les expressions pels diferents gens, es pot observar els marcadors que donen un clar positiu són la majoria, tant el TGF- β i el Col·lagen I, que s'expressen en etapes més inicials de la diferenciació, així com l'Aggrecan i el Biglycan, que s'expressen en les etapes finals. Per a aquests gens doncs, es pot observar com l'expressió obtinguda és més elevada que la expressió obtinguda amb els corresponents controls positius efectuats amb mostres de condrocits d'ovella, indicant que el grau de diferenciació obtingut cap a condrocit és molt elevat.

Per altra banda, si ens fixem amb l'expressió obtinguda pel Col·lagen II (figura 6.16), es poden observar uns resultats més difusos i, tot i que es pot observar una banda situada a l'alçada teòrica marcada pel control positiu, aquesta es troba molt més difusa i fluixa si es compara amb el corresponent control positiu o si es compara amb la resta de marcadors genètics. Si es té en compte que l'expressió del Col·lagen II es relaciona amb la presència de cartílag hialí, aquesta poca expressió del Col·lagen II que s'ha obtingut indica que aquest entorn pot no ser el més adequat per a la regeneració del cartílag hialí.

Així doncs, es pot concloure que amb el monitoratge de la concentració cel·lular, a partir de la mesura del pH, en cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella en presència de medi de diferenciació cel·lular que conté tant TGF- β com Dexametasona ha permès observar una clara disminució en la velocitat de creixement cel·lular així com en el metabolisme de les cèl·lules. Tot i això, amb l'estudi genètic efectuat, s'ha vist que la utilització, durant els 12 dies de cultiu, d'aquest medi de diferenciació condrogènic, no ha causat cap diferència genètica en les oMSC, indicant que aquesta disminució es troba més relacionada amb la inhibició per contacte de les cèl·lules animals adherents que pel fet diferenciador del medi.

Per tant, cal aportar altres factors diferenciadors que permeti la obtenció tant d'una millor expressió del col·lagen II, com la obtenció d'una morfologia esfèrica de les oMSC que emuli la morfologia d'un condrocit quan es troba en el seu estat natural. El factor escollit per a intentar obtenir aquests resultats és l'adequació d'una matriu polimèrica per a les oMSC que intenti mimetitzar l'entorn tridimensional en el que

es troben els condrocits en el cartílag hialí. Tot i que no ha aportat canvis genètics significatius, es seguirà utilitzant medi de diferenciació pels cultius tridimensionals ja que, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, varis grups de recerca han utilitzat aquest medi de diferenciació amb uns bons resultats finals.

6.2.3 ENTORN TRIDIMENSIONAL: POLÍMERS

Per a escollir el polímer a utilitzar per a la regeneració condrocitària, ens centrarem amb aquells que es troben més utilitzats en aplicacions de l'enginyeria tissular: els gels d'alginat, la fibrina i els gels d'agarosa dins del grup de polímers naturals i el poli-L-Lactic-co-glicolic (PLGA) com a representant dels polímers sintètics.

Els gels d'alginat són una classe de polímers naturals que estan formats per seqüències lineals de dos tipus de monòmers de l'àcid poliurònic diferents (figura 6.19), l'àcid α -L-glucurònic i l'àcid β -D-manurònic. Aquestes seqüències poden estar formades exclusivament per un dels dos tipus de residus (M-M-M-M o G-G-G-G), o bé poden trobar-se alternats blocs dels dos tipus de residus (M-G-M-G).

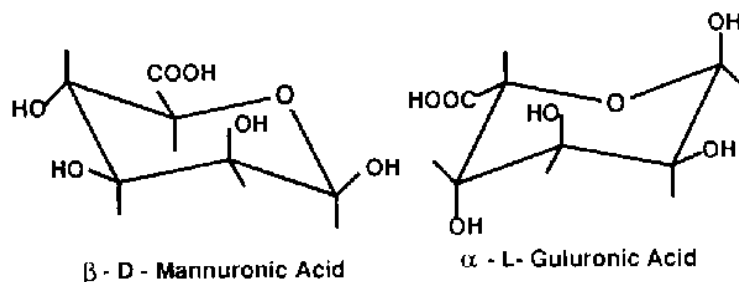


Figura 6.19 Estructura molecular dels dos residus d'àcid poliurònic que formen els gels d'alginat, l'àcid α -L-gulurònic (dreta) i l'àcid β -D-mannurònic (esquerra).

La formació del polímer d'alginat es dona mitjançant la interacció d'ions de calci (també entre d'altres cations divalents i fins i tot trivalents) amb els blocs de monòmers de gulurònic, formant ponts iònics entre les diferents cadenes del polímer (Johnson *i col.* 1997), de manera que les qualitats físiques del gel format (propietats mecàniques, de transport de nutrients i interaccions polímer-cèl·lules) venen determinades per la proporció dels tres tipus de blocs de que es compona l'alginat (Smidsrød 1974; Smidsrod i Haug 1972). Finalment, els productes de degradació s'han descrit com a no tòxics i amb baixa reacció immune (Smidsrød i Skjåk-Bræk 1990). L'alginat sòdic utilitzat en aquest treball (sigma) per a la formació dels gels d'alginat es troba format majoritàriament per blocs de subunitats d'àcid manurònic.

Un altre dels polímers més utilitzats en l'enginyeria tissular és la fibrina humana. Aquesta és una proteïna fibril·lar amb capacitat de formar xarxes tridimensionals que presenta el certificat d'aprovació per la FDA,

és utilitzat en gran número d'aplicacions mèdiques (Borst *i col.*·1982; Currie *i col.*·2001) i es pot obtenir tant clínicament del propi pacient, com de crioprecipitats de plasma sanguini comercials. A més, té l'avantatge que la seva degradació es produeix per acció de la plasmina, que és un enzim del propi cos humà, de manera que al tractar-se d'una macromolècula present en els teixit humans, els productes de la seva degradació no presenten toxicitat i la reacció immune no s'aprecia pel seu alt grau de purificació.

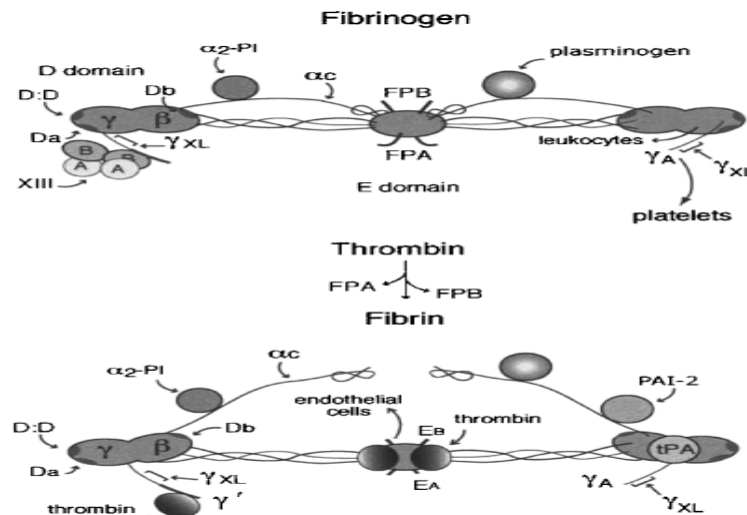


Figura 6.20 Estructura molecular del fibrinogen (superior) i els canvis soferts mitjançant l'addició de la trombina per a la formació de la fibrina (inferior).

La polimerització de la fibrina (figura 6.20) té lloc a partir del fibrinogen, que consisteix en tres parells de cadenes polipeptídiques covalentment enllaçades mitjançant ponts disulfur. Mitjançant la trombina (un enzim), es converteix el fibrinogen en monòmers de fibrina eliminant els fibrinopèptids A i B dels finals n-terminals de les cadenes $A\alpha$ i $B\beta$ respectivament, permetent als monòmers de fibrina formar un gel de polímers llargs, amb els monòmers de fibrina enllaçats entre ells de manera no covalent.

L'últim dels polímers naturals utilitzats són els gels d'agarosa. L'agarosa és un polímer format per cadenes de polisacàrids que es pot extreure de certes algues marines, les unitats monomèriques del qual són disacàrids formats pels monosacàrids D-galactosa i 3,6-anhidre-L-galactopyranose (figura 6.21) i la seva utilització en cultius cel·lulars no presenta activitat tòxica (Nilsson *i col.*, 1983). Tal i com succeeix amb els gels d'alginat, els gels d'agarosa tampoc es formen a partir de polimeritzacions, sinó que l'estructura que uneix les cadenes d'agarosa són interaccions no covalents com els ponts d'hidrogen o interaccions electrostàtiques, de manera que quan la temperatura és superior a uns 35-45°C es trenquen aquestes interaccions no covalents i un cop es refreda per sota aquesta temperatura, les interaccions es restableixen formant-se el gel.

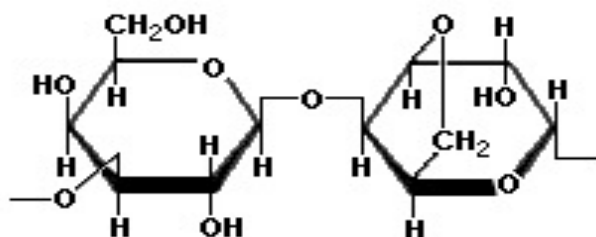


Figura 6.21 Estructura molecular dels monòmers del polímer d'agarosa. Aquesta unitat monomèrica és un disacàrid format pels monosacàrids D-galactosa i 3,6-anhidre-L-galactopyranose

Finalment i per la banda dels polímers sintètics, un dels més comunament utilitzats en l'enginyeria tissular (Herrmann *i col.*·1970) i aprovat per la FDA per a productes terapèutics és el poliester de PLGA (Holland *i col.*·1986; Jain·2000). El PLGA és un copolímer biodegradable i biocompatible (Anderson i Shive·1997; Panyam i Labhasetwar·2003), sintetitzat a partir de la copolimerització de dos monòmers diferents, l'àcid glicòlic i l'àcid làctic units per enllaços d'ester (figura 6.22).

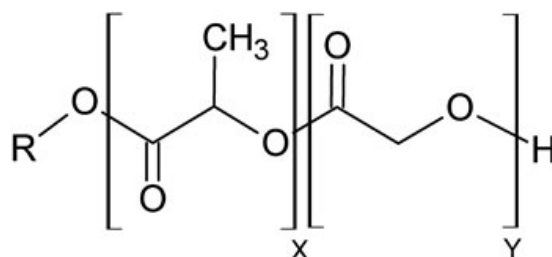


Figura 6.22 Estructura molecular del polímer de PLGA formada per X molècules d'àcid làctic i Y molècules d'àcid glicòlic unides mitjançant enllaços ester.

Depenent de la relació entre l'àcid làctic i l'àcid glicòlic es poden obtenir varies formes de polímer de PLGA, amb les característiques físiques (propietats mecàniques, de transport de nutrients, interaccions polímer-cèl·lules i degradació) determinades per aquesta proporció utilitzada, essent el més comú el PLGA 75:25 (75% d'àcid làctic i 25% d'àcid glicòlic).

Per escollir el polímer a utilitzar en teràpies d'enginyeria tissular, tant per a la regeneració cardíaca com per a la regeneració condrocitària, es fa necessària la mesura d'alguna de les propietats físiques dels polímers candidats. Unes d'aquestes propietats més importants en són les propietats mecàniques del polímer, ja que no només ha de ser suficientment robust per permetre la seva manipulació al llarg de la teràpia, sinó que també en determinarà si el polímer serà capaç de mimetitzar el teixit a regenerar, suportant els esforços de compressió, de torsió o d'estirament en els que es veurà immers un cop es trobi en un entorn funcional.

Per tal de poder comparar aquestes propietats, s'ha realitzat la mesura del mòdul d'elasticitat de cada un dels polímers a l'aplicar cicles d'esforços de compressió amb la conseqüent relaxació (figura 6.23) mitjançant un estimulador mecànic desenvolupat pel grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC (descriu a l'apartat 8.8.3 de Materials i Mètodes). A partir dels diagrames de força-compressió obtinguts pels diferents polímers, s'ha pogut mesurar el mòdul elàstic per a cada un dels polímers mesurats, valors dels quals es poden observar a continuació a la taula 6.2.

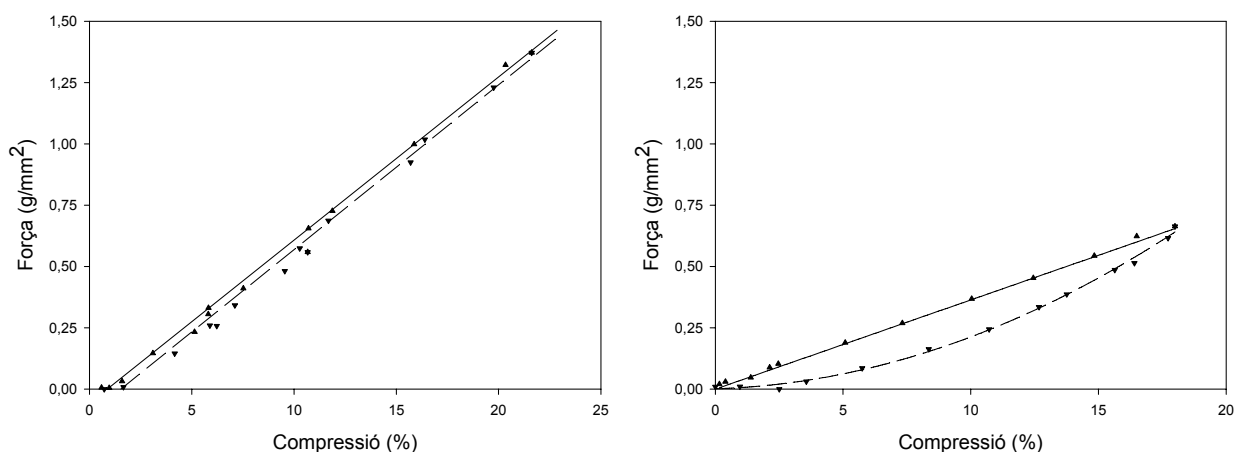


Figura 6.23 Exemples dels diagrames de força-compressió obtinguts pel polímer de PLGA (esquerra) i el gel d'alginat (dreta) i utilitzats per a la mesura del mòdul d'elasticitat (taula 6.2). Al diagrama es troben representats els camins al llarg de la compressió del polímer ($\blacktriangle$) i al llarg de la relaxació del polímer ($\blacktriangledown$).

Taula 6.2 Mòduls d'elasticitat pels diferents polímers obtinguts a partir de mesures de força i desplaçament durant cicles d'esforços de compressió i relaxació aplicats als polímers mitjançant un estimulador mecànic (exemples de càlcul a l'apartat 8.8.3 de Materials i Mètodes).

Polímer	Mòdul d'elasticitat (N/mm ²)
Alginate gel	$3,56 \cdot 10^{-3}$
PLGA	$6,54 \cdot 10^{-2}$
Fibrina	$6,65 \cdot 10^{-1}$
Gel d'agarosa	$6,92 \cdot 10^{-3}$
Cartílag	$6,32 \cdot 10^{-2}$

Tal i com es pot observar a la taula 6.2, tant el gel d'alginate com el gel d'agarosa tenen un mòdul d'elasticitat molt petit i, a més, al cap de varis cicles de compressió i relaxació, el polímers s'acaben trencant. Aquest trencament és degut al comportament mostrat al llarg de les mesures, on s'observa que tot i tenir un comportament elàstic durant la compressió dels gels (figura 6.23 dreta pel gel d'alginate i

mateix comportament amb el gel d'agarosa), aquest comportament queda truncat durant la relaxació dels polímers, on s'observa un comportament plàstic, en el que no és necessària la mateixa força aplicada durant la compressió per a mantenir el mateix percentatge de compressió durant la relaxació del polímer, fent que el polímer tingui molt poca resistència a la fatiga i s'acabi trencant. Per tant, els resultats obtinguts pels polímers gel indiquen que no són uns candidats aptes ni per a la regeneració condrocitària, ni per a la regeneració cardíaca.

Per altra banda, tant el polímer de PLGA com el de fibrina, tenen un mòdul d'elasticitat superior als obtinguts pels gels i, a més, tenen un comportament totalment elàstic al llarg dels cicles de compressió i relaxació (figura 6.23 esquerra pel polímer de PLGA i mateix comportament amb el de fibrina), amb un comportament totalment lineal tant en les etapes de compressió com en les de relaxació dels polímers. Aquesta propietat, indica que ambdós són, en general, uns candidats ideals per a la regeneració tissular condrocitària i cardíaca

Aquesta diferència en les propietats mecàniques obtingudes entre els gels i els altres dos polímers es poden explicar si es tenen en compte les forces que regeixen les unions en la formació dels polímers. Per una banda, els polímers de PLGA i fibrina es formen mitjançant la polimerització dels monòmers o de les cadenes entre ells mitjançant enllaços forts (enllaços ester pel PLGA i ponts de disulfur en la fibrina), mentre que en el cas dels gels no es formen per polimerització, sinó que la formació del polímer es dona per interaccions no covalents entre les diferents cadenes del polímer (ponts iònics pels gels d'alginat i ponts d'hidrogen o electrostàtics pels gels d'agarosa), unions molt més febles que en el cas dels polímers de PLGA i fibrina.

Pel tal d'escollir el polímer ideal per a la regeneració condrocitària, es necessari comparar els dos polímers entre ells així com amb el propi cartílag i les seves necessitats tissulars. Primerament, es pot observar com els mòduls elàstics, tot i indicar un clar comportament elàstic pels dos polímers, són significativament diferents, essent 10 vegades superior pel polímer de fibrina. Aquest fet fa que, per una banda, el polímer de fibrina sigui més dúctil i resistent a la fatiga que el polímer de PLGA, però per altra banda, fa que el polímer de PLGA tingui una estructura més robusta que el polímer de fibrina.

Si es tenen en compte les necessitats a mimetitzar per a la regeneració condrocitària, el polímer a utilitzar ha de rebre una gran quantitat d'esforços de compressió i cisalla, però també es necessari el manteniment d'una estructura robusta, tal i com fan les pròpies fibres de col·lagen del cartílag hialí. Aquest fet es pot corroborar comparant els valors d'elasticitat obtinguts pels dos polímers (taula 6.2), amb el mòdul

d'elasticitat del cartílag hialí, amb un valor de $4,27 \times 10^{-2}$ N/mm² obtingut a partir de la mesura mitjançant el mateix estimulador mecànic, d'una secció de cartílag hialí humà. Es pot observar doncs, que el valor del mòdul d'elasticitat del cartílag hialí és molt més similar al polímer de PLGA (1,5 vegades superior al cartílag) que pel que fa al polímer de fibrina (15,6 vegades superior al cartílag). Això fa que el polímer de PLGA sigui més idoni per a la regeneració de cartílag que el polímer de fibrina.

Per altra banda, s'ha de tenir en compte que la fibrina és degradable pel propi cos i, per tant, no presenta cap mena de toxicitat ni de reacció immune, el polímer de PLGA és un polímer sintètic que podria presentar reaccions adverses en utilitzacions *in vivo*. Bibliogràficament però, es troben diversos grups que han utilitzat matrius de PLGA per a la regeneració de cartílag en ratolins (Kang *i col.*·2005) i conills (Kang *i col.*·2006; Lee *i col.*·2004; Uematsu *i col.*·2005), indicant que aquest tipus de polímer és apte per a la regeneració condrocitària.

6.2.3.1 MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR I ESTUDI METABÒLIC

Així doncs, per tal d'estudiar l'efecte que provoca l'ús d'estructures tridimensionals de PLGA com a agent de diferenciació condrocitària complementari al tractament de diferenciació química mitjançant Dexametasona i TGF- β , és realitzarà el seguiment en línia de l'estimador de concentració cel·lular basat en la mesura de l'evolució del pH del medi de cultiu en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella colonitzades en un polímer de PLGA. Per a la mesura de la concentració cel·lular present en els polímers de PLGA s'han mantingut les unitats que en els experiments anteriors, és a dir, es mesurarà en cèl·lules/cm² equivalents per a cultius en monocapa (mesurat a partir de cèl·lules totals entre l'àrea del minibioreactor).

El primer pas a efectuar, és la tria de la de la matriu a utilitzar. Estudis previs efectuats en el grup de recerca (Caminal·2006), indiquen que les matrius de PLGA òptimes per a la colonització d'oMSC, són les de composició 50:50 amb un diàmetre de porus de 300 a 600 μ m i la forma serà cilíndrica amb mides de 4 mm de diàmetre i 8 mm d'alçada (protocol de fabricació a l'apartat 8.7.7 de Materials i Mètodes). Un cop ja es disposa del polímer de PLGA, es procedeix a la seva colonització. Aquesta colonització es basa en situar el polímer en un minibioreactor amb 9-10 ml de medi de cultiu on s'hi troben en suspensió (tripsinitzades) una quantitat elevada de les cèl·lules a colonitzar, i aplicar una agitació lleu (120-200 rpm) per fer col·lidir les cèl·lules en suspensió amb el polímer (figura 6.24). D'aquesta manera, les cèl·lules poden entrar pels porus i adherir-se a la matriu a mesura que passa el temps.

Per tal de poder controlar aquest procés de colonització i, d'aquesta manera poder obtenir polímers de PLGA colonitzats amb la quantitat de cèl·lules desitjada, s'efectuarà el seguiment en línia de l'absorbància del medi de cultiu a partir de la sonda òptica de l'Hexascreen (Hexascreen C.T., apartat 8.4.3 de Materials i Mètodes), obtenint informació de la quantitat de cèl·lules restants en el medi de cultiu al llarg del procés. D'aquesta manera, a partir d'una senzilla sostracció respecte la quantitat inicial de cèl·lules inicial, es podrà saber la quantitat de cèl·lules que han colonitzat la matriu en cada moment.



Figura 6.24 Fotografies del sistema de colonització d'un polímer de PLGA a l'interior d'un minibioreactor.

La quantitat de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella a colonitzar a les matrius de PLGA és la mateixa que en els experiments de diferenciació química efectuats durant l'apartat anterior, és a dir, a una concentració equivalent de $7,5 \cdot 10^4$ cèl·lules equivalents/cm². Per tal d'aconseguir la colonització d'aquesta quantitat de cèl·lules en els polímers de PLGA, es proven dues concentracions equivalents més elevades que permetin l'entrada a la matriu de suficients cèl·lules per arribar a la concentració desitjada. Aquestes concentracions equivalents inicials són de 20 i $40 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm².

Per tal de poder comparar els resultats obtinguts, s'efectua el seguiment en paral·lel de la colonització de les matrius a les dues concentracions equivalents inicials a partir de mesures fora de línia de la concentració cel·lular present en el medi de colonització. Els resultats obtinguts es poden observar a la figura 6.25, on s'han representat els perfils resultants per a les dues concentracions cel·lulars a partir de les mesures realitzades en línia i fora de línia.

Tal i com es pot observar, els perfils de la concentració cel·lular al medi de cultiu obtinguts amb el seguiment en línia de l'absorbància del medi de colonització concorda perfectament amb els perfils de la

concentració cel·lular obtinguts a partir de recomptes efectuats fora de línia, indicant-ne la idoneïtat d'aquest sistema de mesura pel monitoratge de processos de colonització cel·lular en matrius de PLGA.

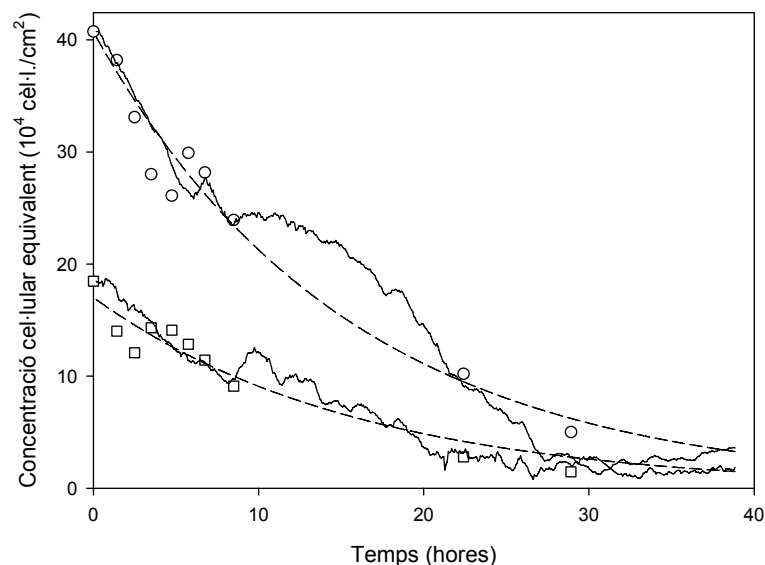


Figura 6.25 Seguiment en línia del procés de colonització de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella en polímers de PLGA 50:50 per a dues concentracions inicials diferents (20 i $40 \cdot 10^4$ cèl·lules equivalents/cm²) a partir de la mesura d'absorbància del medi de cultiu (línees —). Per a cada concentració s'han representat els punts de concentració cel·lular mesurats a partir de recomptes efectuats fora de línia (símbols $\square$ i $\circ$ pels cultius amb inòculs de 20 i de $40 \cdot 10^4$ cèl·lules equivalents/cm² respectivament), així com el resultant perfil teòric (línees - -) calculat a partir dels recomptes de concentració cel·lular efectuats fora de línia.

Analitzant els resultats obtinguts al final de les 40 hores de procés, les matrius de PLGA s'han colonitzat amb 17 i $37 \cdot 10^4$ cèl·lules equivalents/cm² respectivament per a les concentracions inicials de 20 i $40 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² i, per tant, ambdues concentracions equivalents inicials permeten la colonització de la matriu de PLGA amb la quantitat de cèl·lules desitjada. Així doncs, per tal d'aconseguir-la, només cal iniciar una colonització de la matriu a la vegada que es monitora la concentració cel·lular equivalent del medi de cultiu i treure la matriu d'aquest medi amb cèl·lules un cop aquesta es trobi colonitzada amb la quantitat de cèl·lules desitjada, aturant-ne la seva colonització. Per aquest estudi, tal i com ja s'ha comentat, s'han colonitzat les matrius de PLGA amb $7,5 \cdot 10^4$ cèl·lules equivalents/cm², el mateix inòcul que en el cultiu anterior en monocapa i medi de diferenciació.

Un cop ja es disposa de les matrius de PLGA colonitzades amb $7,5 \cdot 10^4$ cèl·lules equivalents/cm², ja es pot procedir al monitoratge de la concentració cel·lular equivalent dels cultius tridimensionals efectuats en minibioreactors situats a l'interior d'un Hexascreen amb el que s'han mantingut unes condicions estàndards de cultiu (apartat 8.4.3.1 de Materials i Mètodes).

Cal comentar, que una possible degradació del PLGA equival a un augment en la concentració de làctic en el medi de cultiu i, per tant, una acidificació del mateix. El fet que la mesura de la concentració cel·lular s'efectuï a partir de la mesura del pH, porta a que una degradació del polímer de PLGA emascararia els valors de concentració cel·lular recreant un falç creixement. Tot i això, en estudis prèvies en el grup de treball (Caminal·2006) s'ha determinat que la degradació del polímer és insignificant en cultius de només 14 dies de durada, tot i que per a cultius més llargs és un fet que s'hauria de tenir en compte. Aquest fet es troba en concordança amb els perfils obtinguts de consum de glucosa i producció de làctic (exposats a continuació a la figura 6.10), en els que s'ha mantingut una proporció glucosa-làctic similar amb el cultiu efectuat anteriorment en monocapa.

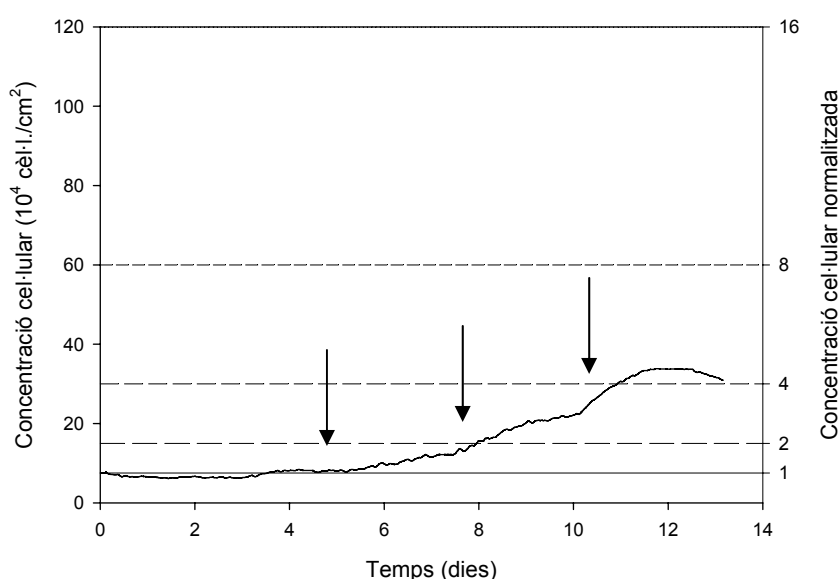


Figura 6.26 Seguiment de la concentració cel·lular (en valors equivalents a un cultiu en monocapa) a partir del monitoratge en línia del pH (línia —) en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella efectuat amb medi de diferenciació condrogènic i en un entorn tridimensional de PLGA. Les fletxes indiquen la realització d'un recanvi de medi. Per a poder comparar millor els creixements, s'ha mantingut la mateixa escala de l'eix normalitzat que en la figura 6.4, corresponent al creixement en monocapa amb medi normal i que en la figura 6.8, corresponent al creixement en monocapa amb medi de diferenciació.

El perfil de concentració cel·lular equivalent resultant s'ha representat a la figura 6.26. Igual que en l'experiment anterior, després del primer recanvi de medi als quatre dies de cultiu, s'ha passat a fer recanvis de medi cada tres dies per tal d'evitar un estancament del creixement degut a la falta de nutrients. Es pot observar que, tal i com passava en el cultiu en monocapa i amb medi de diferenciació, tot i haver inoculat al valor de concentració cel·lular de confluència obtingut en sistemes de cultiu estàndards i haver utilitzat un medi de diferenciació, aquest es capaç de créixer. Aquest cop però, es pot observar una clara fase de latència que dura fins al 5è dia de cultiu, essent un comportament diferent que el cultiu en

monocapa de oMSC amb medi de diferenciació condrogènica (figura 6.8) en el que el creixement cel·lular era significatiu des de pràcticament l'inici del cultiu.

A partir del 5è dia de cultiu, tot i trobar-se en un entorn tridimensional, aquest entra en un lleuger creixement que dura fins al 11-12è dia de cultiu, moment en el que arriba a una concentració cel·lular equivalent màxima de $34 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², indicant que aquesta fase de latència obtinguda pot venir donada pel canvi en el sistema de cultiu i la necessitat d'adaptació de les cèl·lules al nou entorn tridimensional. Seguidament, el concentració cel·lular equivalent es manté constant durant un dia més, moment en el que s'atura el creixement i comença la fase de mort cel·lular.

Si comparem les velocitats de creixement pels cultius de diferenciació condrogènica en monocapa (figura 6.9) i en un entorn tridimensional de PLGA (figura 6.27), es poden observar diferències clares ja que mentre el cultiu en monocapa arriba a la màxima velocitat puntual pràcticament al principi del cultiu (concretament al segon dia), en el cultiu efectuat en el polímer de PLGA aquesta velocitat va augmentant lentament i no és fins al 8è dia de cultiu en que arriba al valor màxim, moment en el que la velocitat ja va decreixent fins a aturar-se el cultiu. Aquest fet pot ser degut a l'avituallament que sofreixen les cèl·lules al canvi de sistema de cultiu des del creixement en monocapa durant l'expansió cel·lular, al cultiu en un entorn tridimensional de PLGA.

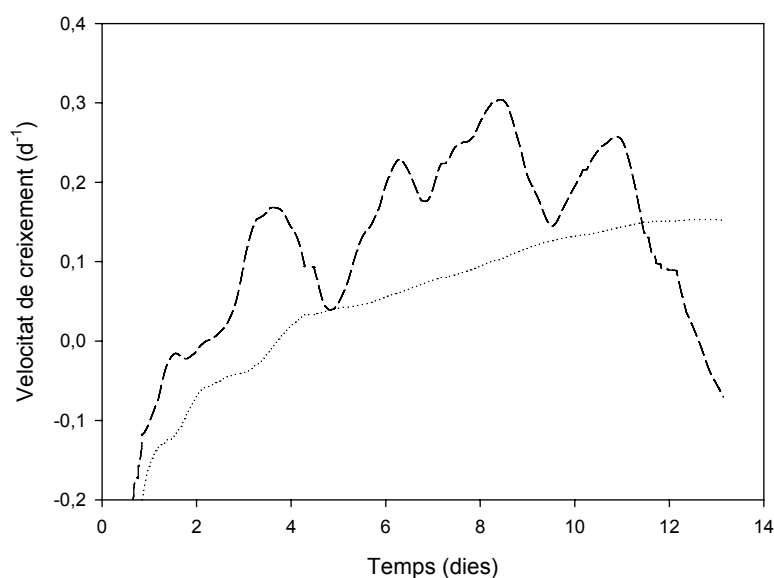


Figura 6.27 Perfils de les velocitats de creixement puntual (línia – –) i acumulada (línia ···) obtinguts a partir de la mesura en línia del pH, mesurades al llarg del cultiu de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella efectuat amb medi de diferenciació i en un entorn tridimensional de PLGA.

Tot i aquesta diferència, es pot observar que la màxima velocitat de creixement obtinguda, corresponent a la velocitat puntual obtinguda des del 6è dia de cultiu fins passats els 11 dies de cultiu, varia entre 0,2 i 0,3

d^{-1} (equivalent a uns temps de duplicació de 2,3 i 3,5 dies), molt similar a la màxima velocitat de creixement obtinguda anteriorment pel cultiu efectuat amb medi de diferenciació en monocapa (de $0,28d^{-1}$, equivalent a un temps de duplicació de 2,5 dies)

Per a realitzar una comparació més extensa, tal i com s'ha dut a terme anteriorment en el cultiu en medi de diferenciació en monocapa, s'ha efectuat el seguiment del consum acumulat de glucosa i la producció acumulada de làctic en duplicats de creixements de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cultivades en un cultiu tridimensional de PLGA i amb el medi de diferenciació condrogènica.

Aquestes mesures, que s'han realitzat a partir de mesures fora de línia de la concentració de glucosa i làctic durant el recanvi de medi dels minibioreactors, s'han comparat a les obtingudes anteriorment amb les cèl·lules cultivades en monocapa i amb el mateix medi de diferenciació. Els resultats es poden observar a la figura 6.28.

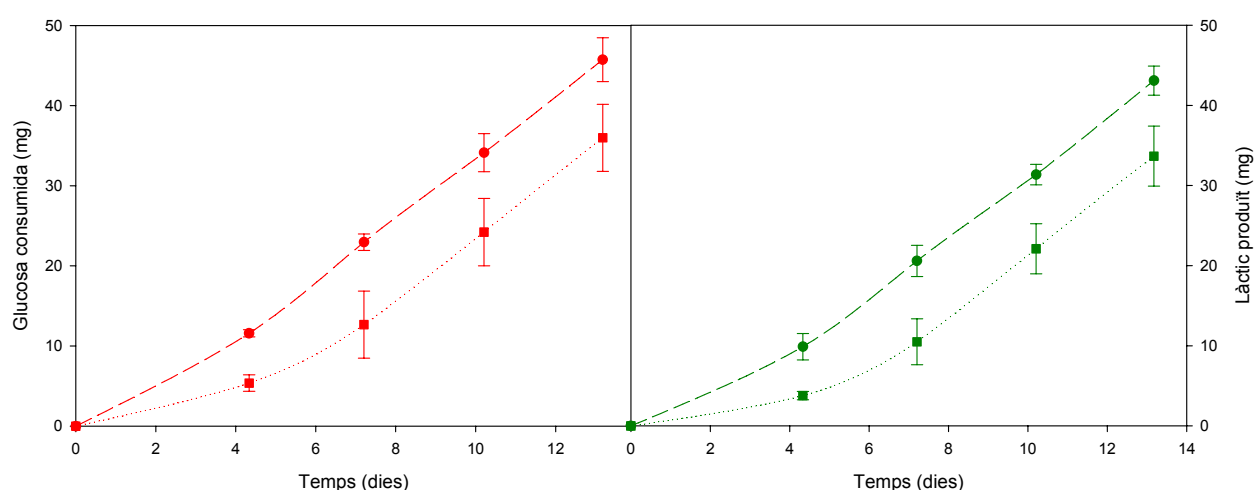


Figura 6.28 Seguiments de la variació de la glucosa consumida (esquerra, línies en vermell) i de la producció d'àcid làctic (dreta, línies en verd) al llarg dels diferents cultius, a partir de mesures fora de línia efectuades durant els recanvis de medi efectuats. Els cultius analitzats són de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cultivades amb medi de diferenciació efectuats en monocapa (línies -- i símbols ●) i en el polímer de PLGA (línies ... i símbols ■).

Tal i com es pot observar amb els perfils obtinguts, tant el seguiment de la glucosa consumida com el del làctic produït, mostren un comportament similar a les corresponents mesures en línia. Així doncs, en els primers estadis del cultiu es pot observar un consum (i producció) clarament més elevat en el cultiu en monocapa, fins aproximadament al 6è dia de cultiu, en el que es pot observar com el consum augmenta significativament en el cultiu tridimensional. Aquest fet es troba en concordança amb la fase inicial de latència observada anteriorment durant els primers 5 dies de cultiu.

A partir d'aquest moment, els consums dels cultius en monocapa i tridimensionals es tornen pràcticament iguals, obtenint uns perfils de consum i producció paral·lels. Aquest fet coincideix també amb els creixements obtinguts en els monitoratges en línia, en els que s'obtenen uns creixements amb uns temps de duplicació molt similars, tal i com ja s'ha comentat anteriorment.

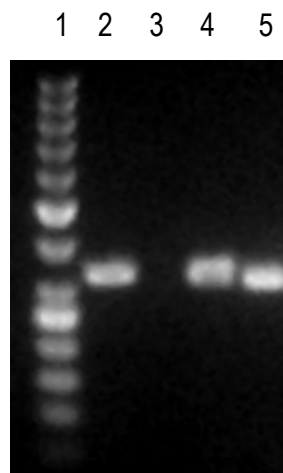
Cal remarcar que les velocitats de creixement tant baixes, juntament amb la poca quantitat de punts disponibles (i l'error corresponent) i la disminució del metabolisme al cultivar-se les cèl·lules amb medi de diferenciació (comentat a partir de la figura 6.10), fan que no es pugui observar un creixement en el perfil resultant de glucosa consumida i làctic produït (essent pràcticament una recta un cop ha passat la fase de latència).

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, el fet que no hi hagi un desajust entre les mesures de consum de glucosa i les de producció de làctic, indiquen que no hi ha una degradació significativa del polímer de PLGA, ja que en cas contrari es podria observar un augment més elevat en el perfil de làctic produït pel cultiu en polímer respecte al cultiu en monocapa, augment que no es veuria correspost en les mesures de consum de glucosa. En canvi, es pot observar com la relació entre la glucosa consumida i el làctic produït és molt similar en el cultiu amb PLGA i en monocapa.

6.2.3.2 ESTUDI GENÈTIC I MORFOLÒGIC

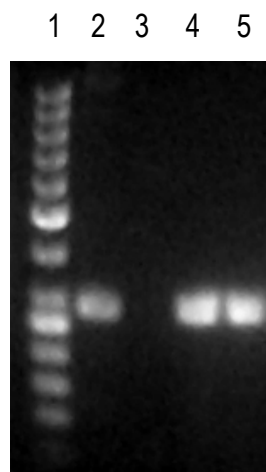
Tot i que es realitzarà com a comprovació, l'estudi genètic de l'efecte d'un entorn tridimensional de PLGA, com a complement al medi de diferenciació condrogènia utilitzat en l'apartat anterior (apartat 6.2.2), en la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cap a condrocit no aportarà cap informació rellevant, ja que amb la sola utilització del medi de diferenciació ja s'ha aconseguit l'expressió de la totalitat dels marcadors genètics utilitzats. Per tant, l'anàlisi genètic que es realitzarà a continuació només servirà per a la comprovació que amb la utilització d'un entorn tridimensional de PLGA es continuen expressant els diferents marcadors genètics escollits.

Un cop comprovat que no hi ha hagut degradació de l'RNA de les mostres, s'han realitzat les RT-PCRs amb els corresponents gels d'agarosa, organitzant els gels per cada un dels marcadors. Els resultats s'han representat a continuació a la figura 6.29 pel GAPDH, a la figura 6.30 pel TGF- β , a la figura 6.31 pel Col·lagen I, a la figura 6.32 pel Col·lagen II, a la figura 6.33 per l'Aggrecan i finalment a la figura 6.34 pel Biglycan.



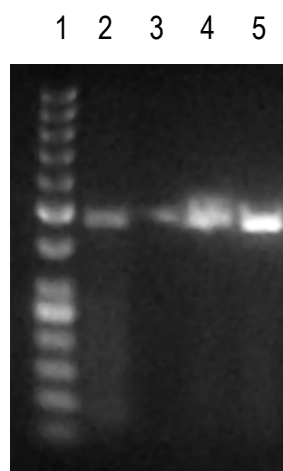
Carril 1: Marcador de pes molecular
Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
Carril 4: Cultiu en monocapa
Carril 5: Cultiu en matriu de PLGA

Figura 6.29 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres de GAPDH per a les oMSC cultivades amb medi de diferenciació, tant en monocapa com en una matriu de PLGA.



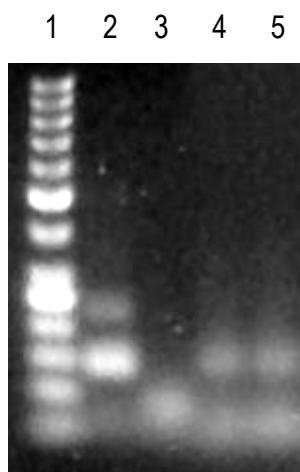
Carril 1: Marcador de pes molecular
Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
Carril 4: Cultiu en monocapa
Carril 5: Cultiu en matriu de PLGA

Figura 6.30 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres de TGF- β per a les oMSC cultivades amb medi de diferenciació, tant en monocapa com en una matriu de PLGA.



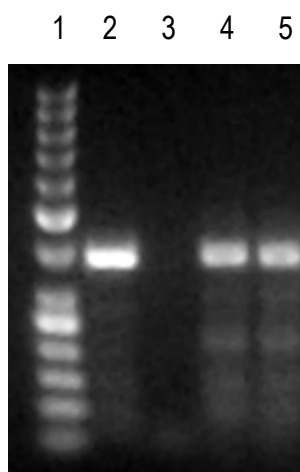
Carril 1: Marcador de pes molecular
Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
Carril 4: Cultiu en monocapa
Carril 5: Cultiu en matriu de PLGA

Figura 6.31 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres de Col·lagen I per a les oMSC cultivades amb medi de diferenciació, tant en monocapa com en una matriu de PLGA.



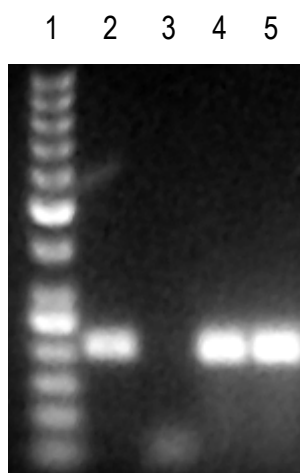
Carril 1: Marcador de pes molecular
Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
Carril 4: Cultiu en monocapa
Carril 5: Cultiu en matriu de PLGA

Figura 6.32 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres de Col·lagen II per a les oMSC cultivades amb medi de diferenciació, tant en monocapa com en una matriu de PLGA.



Carril 1: Marcador de pes molecular
Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
Carril 4: Cultiu en monocapa
Carril 5: Cultiu en matriu de PLGA

Figura 6.33 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres d'Aggrekan per a les oMSC cultivades amb medi de diferenciació, tant en monocapa com en una matriu de PLGA.



Carril 1: Marcador de pes molecular
Carril 2: Control positiu amb condrocits d'ovella
Carril 3: Control negatiu (amb aigua)
Carril 4: Cultiu en monocapa
Carril 5: Cultiu en matriu de PLGA

Figura 6.34 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres de Biglycan per a les oMSC cultivades amb medi de diferenciació, tant en monocapa com en una matriu de PLGA.

El primer que es pot observar és que l'expressió del GAPDH és positiva per a ambdues mostres, mentre que els controls negatius efectuats per a cada gel surten, com és d'esperar, negatius. Aquests fets indiquen que les RT-PCR han estat realitzades correctament. Si s'analitzen els resultats obtinguts en les expressions genètiques dels diferents marcadors condrogènics, es pot observar que altre cop, tal i com ha passat anteriorment a l'afegir medi de diferenciació condrogènica (apartat 6.2.2.2), la majoria de marcadors genètics (el TGF- β i el Col·lagen I, que s'expressen en etapes més inicials de la diferenciació, i l'Aggrecan i el Biglycan, que s'expressen en les etapes finals) donen un clar positiu per ambdós cultius, en monocapa i tridimensional. Per altra banda, pel marcador de Col·lagen II (marcador indicatiu de la presència de cartílag hialí), es continua obtenint una banda molt fluixa i difusa sobretot si es compara amb el control positiu efectuat amb una mostra de condrocits d'ovella.

Per tant, aquests fets indiquen que la incorporació d'un sistema de cultiu tridimensional adequat per a aquesta diferenciació condrogènica, no ha suposat l'obtenció de millores en els resultats gènics anteriorment obtinguts en els cultius en monocapa, tant els cultius cultivats amb medi de diferenciació com els cultius cultivats en medi normal de creixement.

Tal i com ja s'ha comentat, la utilització d'un entorn tridimensional en la diferenciació condrogènica, és idònia per a la obtenció, no només d'un perfil genètic de condrocit, sinó que també per a induir a les oMSC a adquirir la morfologia que presenten els condrocits en el seu entorn natural en el cartílag hialí, és a dir, una morfologia esfèrica, així com per estimular a les cèl·lules a la formació d'una pròpia matriu extracel·lular. Així doncs, per tal d'observar l'efecte de l'entorn de PLGA utilitzat juntament amb el medi de diferenciació condrogènica en la morfologia de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella, s'ha efectuat un anàlisi histològic dels polímers resultants al final del cultiu.

La primera de les tincions realitzades és la histologia de Safranina O (protocol a l'apartat 8.6.3.3 de Materials i Mètodes), que és un colorant biològic usat en histologia en seccions fixades d'un teixit o d'una matriu per a la detecció de cartílag hialí (L. Rosenberg·1971).

Aquesta tècnica, tenyeix el nucli de les cèl·lules de color negre, el seu citoplasma de color gris-verd i, el més important, tenyeix els glucosaminoglicans característics del cartílag hialí (GAGs) d'un color taronja-vermell (figura 6.35, foto superior). Les tincions dels polímers d'oMSC al final dels 12 dies de cultiu es poden observar a la figura 6.35 (fotos inferiors).

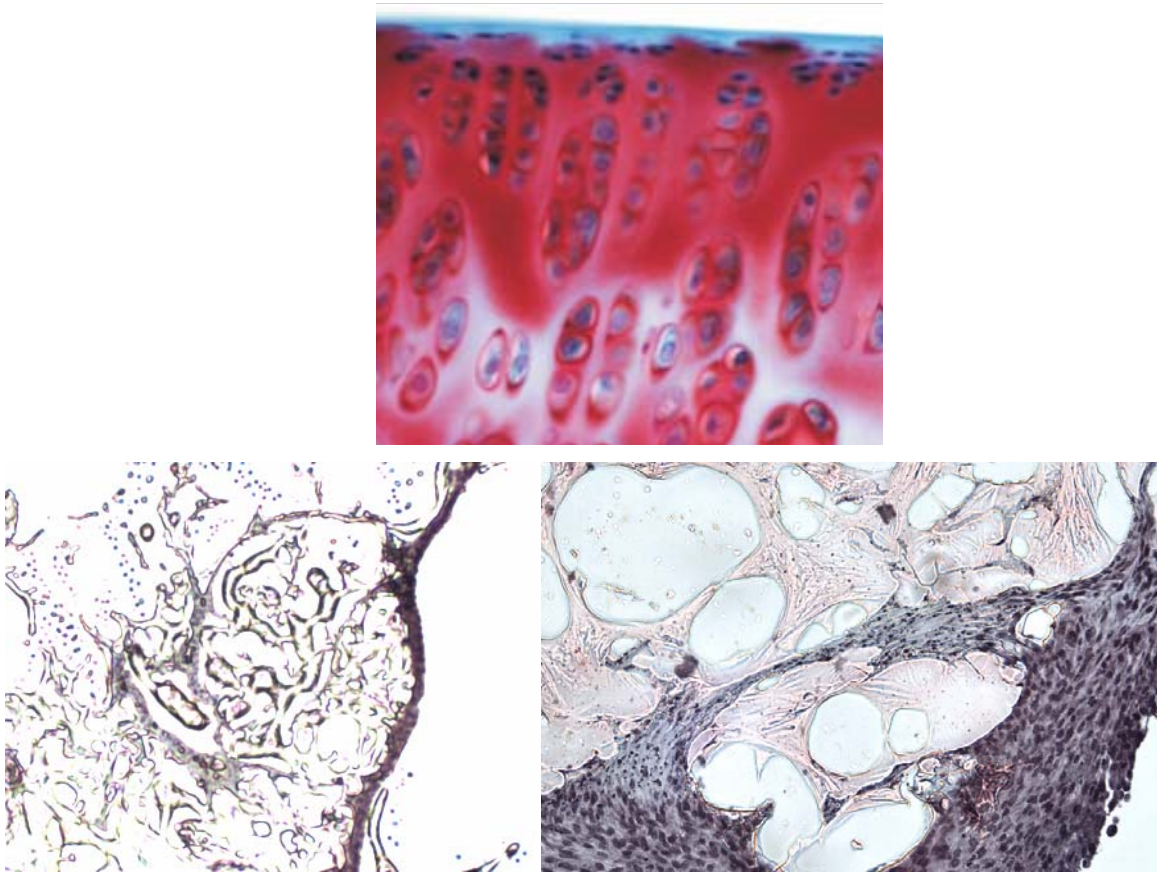


Figura 6.35 Fotos de la histologia de Safranina O. A la part superior es mostren fotos corresponents a mostres de cartílag hialí oví (control positiu) i a la part inferior es mostren les fotos corresponents a les oMSC dins el polímer de PLGA.

Tal i com es pot observar, les seccions del polímer analitzades donen un resultat negatiu per Safranina O, indicant que no hi ha presència de GAGs en la matriu extracel·lular generada. Per tal d'analitzar el negatiu per Safranina O obtingut, s'ha de tenir en compte que l'acumulació de GAGs es dona en la fase final de la diferenciació cap a condrocit. A més, la sensibilitat de la histoquímica per Safranina O no és gaire elevada, de manera que l'acumulació inicial de GAGs en la matriu extracel·lular no és suficientment elevada per entrar dins els límits de detecció d'aquest protocol (Camplejohn i Allard·1988). Per tant, aquests resultats juntament amb d'altres resultats bibliogràfics (Eyrich *i col.*·2007), indiquen la necessitat de majors temps de cultiu per a l'obtenció d'una matriu extracel·lular amb presència de glicosaminoglicans.

La segona de les tincions realitzades és la immuno-histoquímica per Col·lagen tipus II (protocol a l'apartat 8.6.3.4 de Materials i Mètodes), que és una tècnica que s'utilitza per detectar el Col·lagen II present en la matriu extracel·lular (IHC world·) que, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, és la proteïna estructural més comuna (un 90% del total de la matriu) en el cartílag hialí. Aquesta tècnica que, a diferència que la histoquímica per Safranina O, ofereix una precisió molt elevada al basar-se en la utilització d'anticossos

específics prèviament marcats amb una molècula fluorescent per a la detecció d'antígens, tenyeix d'un color marró clar la matriu formada per fibres de Col·lagen II (figura 6.36, fotos superiors), mentre que el nucli cel·lular queda tenyit d'un color blavós. Els resultats obtinguts pels polímers de PLGA amb les oMSC al final del cultiu es poden observar a continuació a la figura 6.36 (fotos inferiors).

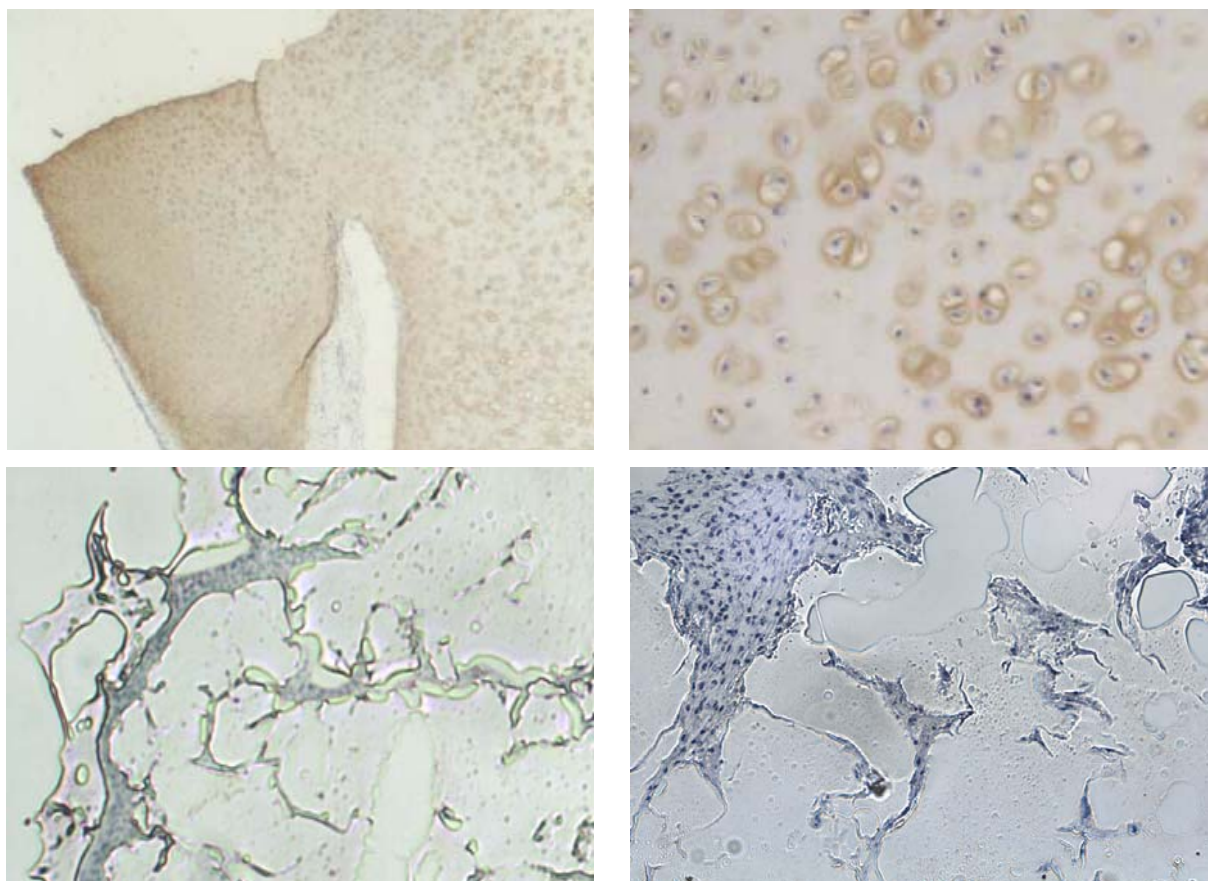


Figura 6.36 Fotos de la immunohistoquímica per Col·lagen II. A la part superior es mostren fotos corresponents a mostres de cartílag hialí oví (control positiu) i a la part inferior es mostren les fotos corresponents a les oMSC dins el polímer de PLGA.

Es pot observar amb els resultats de la immunohistoquímica per Col·lagen II que, tal i com passava en la tinció per Safranina O, no hi ha presència de fibres de Col·lagen II en els talls fixats del polímer de PLGA. Aquest fet realça la necessitat d'augmentar el temps de cultiu de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella, o la incorporació *in vivo* del polímer colonitzat (Guo *i col.* 2004) per tal d'obtenir una matriu extracel·lular amb unes característiques referents al cartílag hialí.

Tot i aquests resultats negatius, si s'observa la morfologia de les cèl·lules que es troben situades a l'interior dels porus del polímer de PLGA, aquestes ja presenten una morfologia més similar als cilindres ovalats que es troben en el cartílag hialí que no podien presentar les oMSC quan es cultiven en monocapa

(figura 6.37). A més, la distància entre algunes de les cèl·lules permet estimar la presència de matriu extracel·lular, de manera que, al no donar positiva per Col·lagen II, es podria tractar d'una matriu de fibrocartílag. Aquesta possibilitat concorda amb el fet, anteriorment observat durant la realització de l'anàlisi genètic, que l'expressió genètica obtinguda pel Col·lagen II fos tant fluixa i difusa, a diferència de l'expressió obtinguda pels altres marcadors genètics, per els que l'expressió era molt clara i marcada.

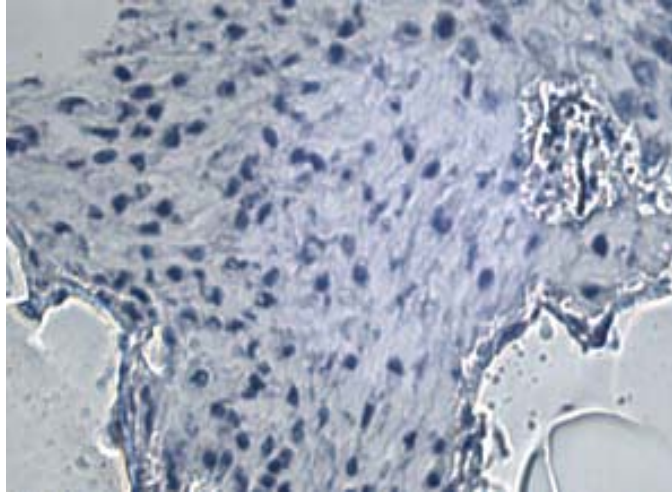


Figura 6.37 Ampliació de la foto de la immuno-histoquímica per Col·lagen II en el polímer de PLGA.

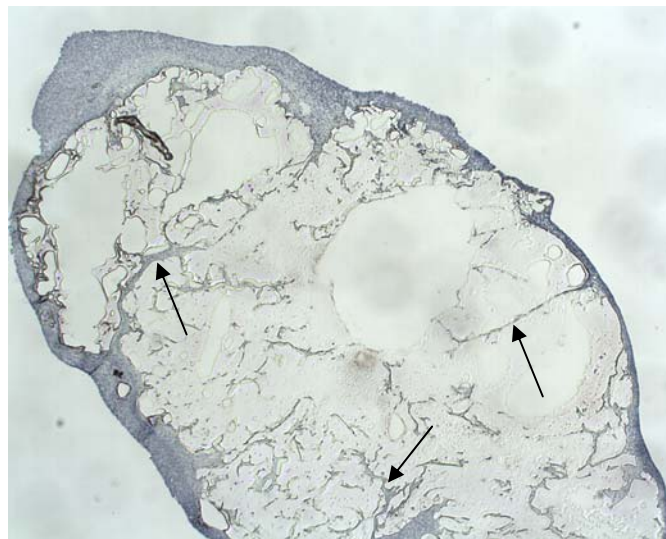


Figura 6.38 Foto d'un tall transversal d'un polímer colonitzat. S'observa que la vasta majoria de les cèl·lules es troben en la superfície de la matriu, tot i que els porus també es poden veure colonitzats (alguns exemples marcats amb fletxes).

Tot aquests resultats, indiquen que cal una millor optimització de l'entorn de les oMSC per tal d'obtenir una matriu amb característiques similars al cartílag hialí i, per tant, s'han de millorar varis aspectes. El primer que es pot observar és que una gran majoria de les cèl·lules que han colonitzat la matriu de PLGA es troben a la seva superfície (figura 6.38), de manera que no es troben influenciades per un entorn

tridimensional de PLGA sinó que emulen el creixement en monocapa, però canviant la superfície de cultiu de plàstic per una superfície de PLGA o, bé amb multicapa, de manera que les cèl·lules tampoc es troben influenciades per la matriu de PLGA.

Un altre paràmetre que es podria variar per a obtenir millores en la diferenciació condrogènica i, per tant, obtenir una matriu amb unes característiques pròpies del cartílag hialí, és el temps de cultiu. Si s'augmentés el temps de cultiu, permetria que les cèl·lules que han entrat dins el polímer i es troben en contacte amb un entorn tridimensional de PLGA tinguessin més temps per tal de transformar la matriu de PLGA amb la seva pròpia matriu extracel·lular formada per GAGs i fibres de Col·lagen II. Finalment, un última millora en la regeneració condrocitària recau en l'ús del polímer *in vivo* en models animals per tal d'aportar totes les necessitats que no es poden aportar en un sistema de cultiu *in vitro*. Aquestes alternatives ja s'estan duent a terme en altres treballs del grup de recerca.

Amb aquest últim estudi de les necessitats precisades es dona per conclòs l'apartat d'estudi per a la regeneració condrocitària a partir de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella a les que se'ls ha anat afegint els diferents pilars d'enginyeria tissular.

6.3 ENGINYERIA TISSULAR PER A LA REGENERACIÓ CARDÍACA

Les malalties cardíques són la primera causa de mort en els països industrialitzats i generen uns costos socioeconòmics substancials. Les dades més actuals indiquen que les malalties cardiovasculars causen el 49% de les morts totals a Europa, essent l'infart de miocardi i la insuficiència cardíaca les patologies més prevalents, amb el 50% i el 33% respectivament del total de les morts per problemàtiques cardiovasculars (British Heart Foundation Statistics Website·2008), mentre que en l'estat espanyol les malalties cardiovasculars provoquen el 32,5% de les morts totals, essent un 30% d'aquestes relacionades amb l'infart de miocardi i un 16% amb la insuficiència cardíaca (Instituto Nacional de Estadística·2008).

Tot i la millora en els tractaments farmacològics i invasius, el nombre de pacients amb insuficiència cardíaca creix any darrera any. La disminució en la qualitat de vida i la alta mortalitat dels pacients amb insuficiència cardíaca incrementa la necessitat de noves estratègies de tractament. Les teràpies clíniques utilitzades actualment en el cas de les malalties cardíques greus són l'al·lotransplantament i la implantació de materials biomimètics, tot i que les limitacions d'aquestes dues teràpies, tal i com ja s'ha esmentat prèviament, posen de manifest la necessitat de la posar a punt una teràpia basada en l'enginyeria tissular.

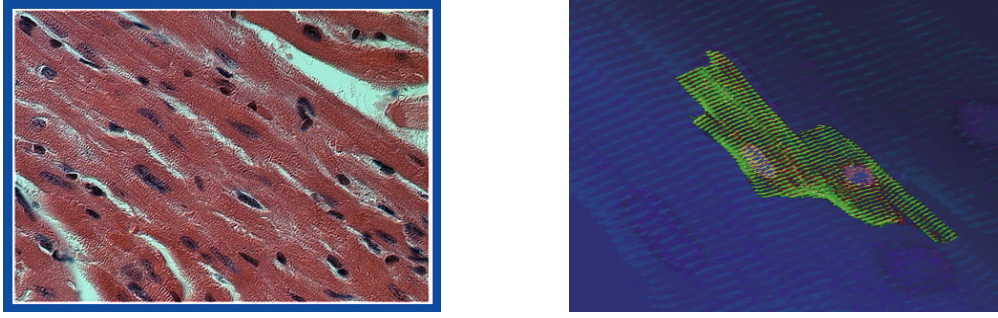


Figura 6.39 Imatges de la histologia del teixit cardíac sa (esquerra) i d'un cardiomiòcit humà amb una tinció que permet observar la α -actina en color verd i el nucli en color blau (dreta).

Donada la incapacitat regeneradora que presenta el teixit cardíac en mamífers, tal i com ja s'ha comentat anteriorment a la taula 1.6 en l'apartat 1.3.1.1 de la introducció (el teixit cardíac només disposa de capacitat reparadora), es fa necessària la creació d'un nou teixit funcionalment equivalent al teixit sa, és a dir, el múscul cardíac. Aquest teixit (figura 6.39) està format per cèl·lules musculars ramificades, que posseeixen 1 o 2 nuclis i que s'uneixen entre si a través d'un tipus d'unió pròpia del múscul cardíac, anomenada disc intercalari. Les fibres musculars cardíques corresponen a un conjunt de cèl·lules cardíques unides entre si en disposició lineal. Les cèl·lules musculars cardíques, d'uns 15 μm de diàmetre i uns 100 μm de llarg, tenen el nucli unit al centre del citoplasma i presenten estriacions transversals.

Per tal d'aconseguir la creació d'aquest teixit funcional serà necessària la utilització dels quatre pilars bàsics de l'enginyeria tissular (figura 1.14 de la introducció), és a dir, d'una font cel·lular, de senyals quimicofísics i de polímers, tots a l'interior d'un entorn controlat que permeti l'estimulació física, així com poder obtenir la correcta combinació d'ells per a generar el teixit desitjat. Així doncs, per tal de comprovar que el sistema de monitoratge cel·lular desenvolupat al llarg dels anteriors capítols permet realitzar el seguiment d'aquest procés de generació dels candidats terapèutics, s'anirà observant i evolucionant el seu funcionament a mesura que es van incorporant en el sistema la resta dels pilars o eines de l'enginyeria tissular.

6.3.1 EXPANSIÓ DE LA FONT CEL·LULAR

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment per a la regeneració condrocitària, el primer pas a realitzar serà el monitoratge d'un cultiu per a la expansió de les cèl·lules mare mesenquimals humanes. Per a poder comparar els resultats obtinguts amb el sistema de mesura en línia desenvolupat, inicialment es procedirà al seguiment d'un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes mitjançant recomptes de concentració cel·lular mesurats fora de línia.

De la mateixa manera que pel cas de la regeneració condrocitària, només es realitzarà el seguiment per duplicat d'una concentració cel·lular inicial. Aquesta concentració cel·lular inicial escollida és de 2500 cèl·lules/cm², per a que permeti partir d'una quantitat de cèl·lules significativa (menys error d'inoculació i major repetibilitat en els cultius paral·lels) però que a la vegada disposi d'un recorregut de concentració cel·lular llarg fins a la confluència del cultiu (Farré·2005).

De la resta de condicions, els cultius es realitzaran en plaques de 6 pous a condicions estàndards de cultiu i s'efectuaran recomptes de concentració cel·lular per duplicat (destrucció de 2 pous de cultiu per mesura) cada 48 hores aproximadament. Pel que fa als recanvis de medi de cultiu, aquests es duran a terme aproximadament cada 72 hores per tal de que les citoquines i factors de creixement presents en el medi de cultiu no tinguin temps a esgotar-se o a degradar-se i, d'aquesta manera, evitar que el cultiu es trobi limitat.

Els resultats obtinguts es troben representats a la figura 6.40, on es pot observar que el cultiu comença a créixer de seguida sense pràcticament haver-hi fase de latència fins aproximadament l'11è dia de cultiu, moment en el que s'assoleix la màxima concentració cel·lular. Aquesta màxima concentració, és a dir la concentració de confluència, és de $3 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm². A partir d'aquest moment, el cultiu comença una fase de mort fins al final del cultiu cel·lular, tot i el recanvi de medi realitzat al 12è dia.

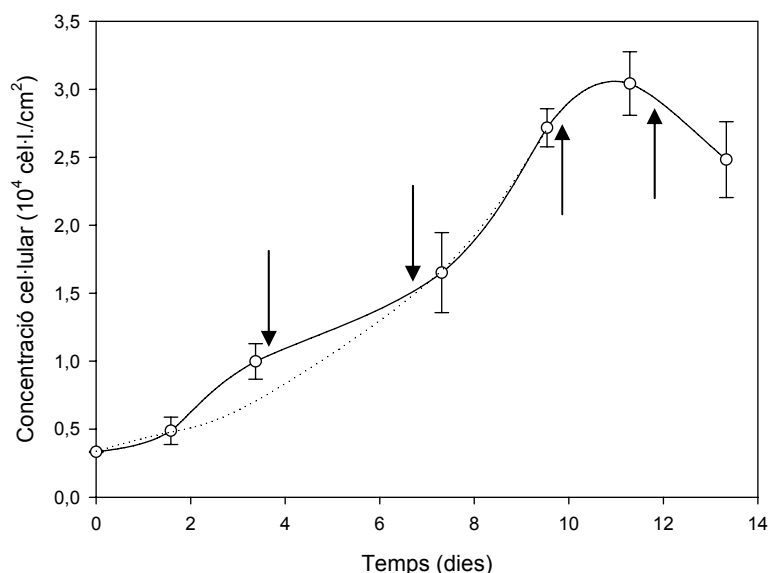


Figura 6.40 Perfil de concentració cel·lular al llarg del cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes obtingut a partir de recomptes cel·lulars efectuats fora de línia (línia —), amb el corresponent ajust exponencial (línia ···). Les fletxes indiquen la realització d'un recanvi de medi.

Per tal de mesurar la velocitat de creixement en cultius de cèl·lules mare mesenquimals, s'ha realitzat un ajust exponencial, obtenint que la velocitat de creixement en aquest cultiu és de $0,218 \text{ d}^{-1}$, que equival a un

temps de duplicació d'uns 3,18 dies. Tal i com ja s'ha explicat anteriorment, aquesta mesura de la velocitat de creixement a partir de recomptes realitzats fora de línia, es troba influenciada per la poca quantitat de punts disponibles pel seu càlcul, així com de la pròpia incertesa de la fase en que es troben aquests punts de concentració cel·lular.

Per tant, un cop ja s'han caracteritzat els creixements cel·lulars de les cèl·lules mare mesenquimals humanes a partir de recomptes fora de línia, ja es pot procedir al monitoratge d'aquests a partir del sistema de seguiment en línia desenvolupat. Per a fer-ho s'ha realitzat el seguiment de dos cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes amb la mateixa concentració cel·lular inicial que en el cultiu anterior (2500 cèl·lules/cm²), però a partir del sistema de mesura del pH en comptes de les mesures de concentració cel·lular realitzades fora de línia. Aquests cultius monitorats s'han dut a terme en minibioreactors situats a l'interior d'un Hexascreen amb el que s'han mantingut unes condicions de cultiu estàndards.

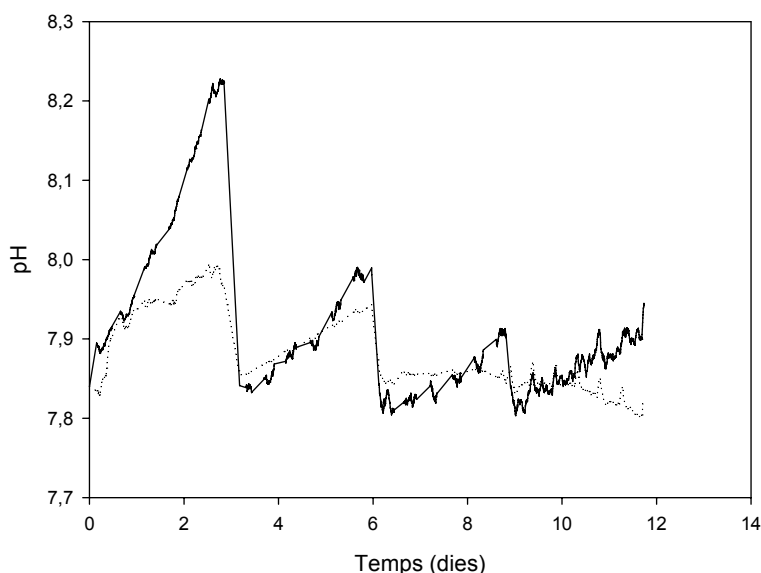


Figura 6.41 Seguiment del pH al llarg de dos cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes realitzats en idèntiques condicions (línia — i línia ···). Els salts de pH indiquen un recanvi de medi, retornant per tant, el pH al seu valor inicial del cultiu.

Els perfils de pH obtinguts per ambdós cultius monitorats es troben representats a la figura 6.41, on es pot observar que, a diferència dels cultius de cèl·lules *vero* realitzats en el capítol anterior, no s'observa una davallada en el pH del medi de cultiu, sinó que aquest va augmentant al llarg del creixement fins als recanvis de medi realitzats, moments en els que el pH retorna aproximadament al valor de pH obtingut a l'inici del cultiu. A més, també es pot observar que, tot i partir de dos cultius amb les mateixes condicions, s'obtenen uns perfils de pH al llarg del cultiu totalment diferents per a cada un dels cultius monitorats. Així, en un dels cultius monitorats s'obté una basificació del medi forta fins al final del cultiu, tot i anar disminuint el grau després de cada recanvi de medi, mentre que l'altre cultiu monitorat la basificació del medi de cultiu

no és tant forta i, a més, després del segon recanvi de medi, cap al 8è dia de cultiu, ja es canvia aquesta tendència de basificar el pH i comença a acidificar-se.

Tot i aquest efecte de basificació del medi, a la figura 6.42, on s'ha representat la glucosa consumida i el làctic produït pels cultius monitorats (al tenir recanvis de medi durant el creixement, no es pot representar directament les concentracions dels diferents metabòlits al medi de cultiu), es pot observar com el consum de glucosa i la producció de làctic segueixen perfils típics de cultius de cèl·lules animals, amb una producció de làctic lleugerament inferior al consum de glucosa i, per tant, el medi es va acidificant a mesura que el cultiu avança.

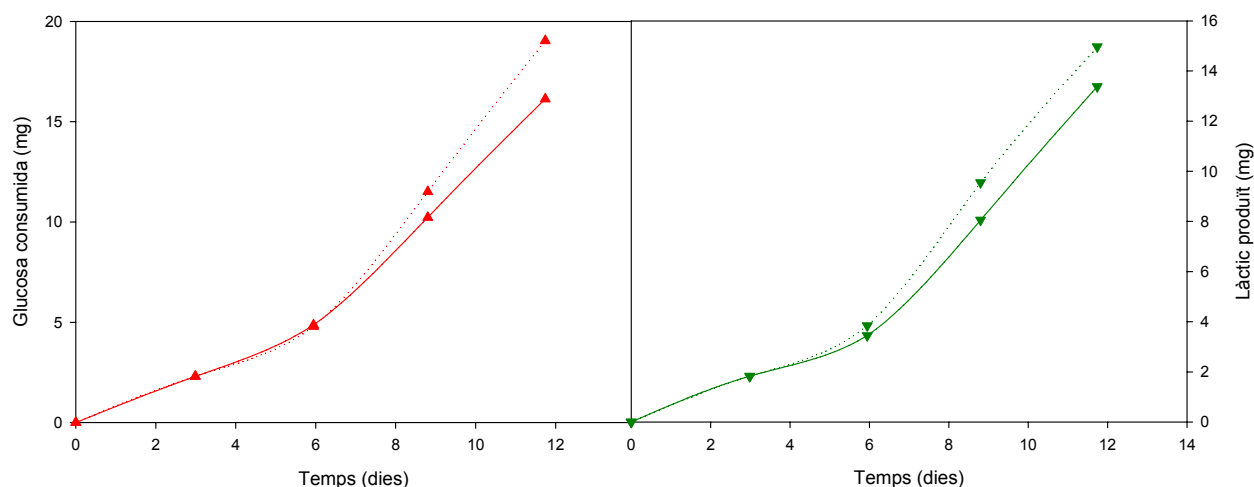


Figura 6.42 Seguiment de la variació de la glucosa consumida (esquerra, línia en vermell) i de la producció d'àcid làctic (dreta, línia en verd) al llarg dels dos cultius anteriors de cèl·lules mare mesenquimals humanes (figura 6.41), mesurats a partir de mesures fora de línia durant els recanvis de medi dels cultius amb monitoratge de pH.

Per tant, existeix un altre efecte que emmascara el pH real del medi de cultiu en els creixements de cèl·lules mare mesenquimals humanes, suficientment important com per contrarestar l'efecte de l'acidificació produïda per l'acumulació de làctic. Aquest efecte ha de venir donat per l'evaporació present en el sistema de cultiu, ja que al disminuir el volum de medi total en el minibioreactor, també es concentra el roig de fenol dissolt, fent que l'absorbància augmenti encara que el pH real no variï. Aquest augment de l'absorbància del medi degut a l'evaporació, tenint en compte la figura 5.8 del capítol anterior on es representa la relació entre l'absorbància mesurada per la sonda i el seu pH equivalent, fa que la mesura del pH augmenti encara que el pH real no ho faci.

Tot i que aquest l'evaporació no sigui molt elevada, l'efecte que produeix en la mesura del pH es veu accentuat per la poca producció de làctic de les cèl·lules mare mesenquimals humanes. Tot i que les velocitats de consum de glucosa i de producció de làctic són similars a les que s'obtenen en els altres

cultius de cèl·lules animals adherents realitzats (cèl·lules *vero*), tal i com es pot observar a la taula 6.3, la concentració de cèl·lules en cultius de cèl·lules *vero* és aproximadament 33 vegades superior que en els cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes (concentracions de confluència de fins a $100 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² pels cultius de cèl·lules *vero* respecte les $3 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² pel cultiu de hMSC a confluència) fent que la producció total de làctic i, per tant, l'acidificació total del medi sigui molt inferior pels cultius d'hMSC fins al punt de veure's emmascarat per aquest efecte d'evaporació del medi.

Taula 6.3 Valors de les velocitats de consum de glucosa i de producció de làctic, la velocitat de creixement i la concentració de confluència per a les cèl·lules mare mesenquimals humanes (hMSC) i les cèl·lules *vero*. Càlculs efectuats a l'apartat 8.8.2 de Materials i Mètodes.

línia cel·lular	q_s (μ mol glucosa/(10^6 cèl·l·dia))	q_p (μ mol làctic/(10^6 cèl·l·dia))	μ (d ⁻¹)	$[X]_f$ (10^4 cèl·l./cm ²)
hMSC	17,49	32,51	0,22	3
<i>vero</i>	17,39	29,66	0,89	100

Mentre aquesta problemàtica de l'evaporació es pot resoldre per a les mesures realitzades fora de línia de la glucosa consumida i del làctic produït, tal i com s'ha efectuat per a la representació de la figura 6.42, tenint en compte el volum de medi final recollit en els recanvis de medi a les equacions pel càlcul de la glucosa consumida i el làctic produït (equacions 6.1 i 6.2 mostrades a l'apartat 6.2.2.1), en el cas de les mesures en línia no es pot fer aquesta correcció al no disposar d'una mesura en línia del volum de medi total. A més, la variabilitat d'aquest efecte, observable amb els dos perfils de pH representats a la figura 6.41 en el que en un dels dos cultius s'arriba a canviar la tendència provocada per l'evaporament cap al final del cultiu quan la concentració cel·lular ja és més elevada, fa que no es pugui suposar una evaporació constant, impossibilitant una estimació del pH real present en el medi. En resum, l'escassa producció de metabòlits en els cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes deguda a la poca concentració cel·lular a la que arriben els cultius, fan que l'estimació de la concentració cel·lular a partir de la mesura de la variació de pH sigui inviable degut a la poca repetibilitat, ja que la petita variació, entre dos cultius efectuats a les mateixes condicions, en la concentració cel·lular inicial deguda a la no homogeneïtat total de l'inòcul causa una variació relativa en el pH molt elevada.

Per tant, per a poder monitorar en línia aquests cultius cel·lulars es necessita un sistema de mesura que sigui suficientment sensible a les concentracions cel·lulars a les que es treballa en cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes. La poca activitat cel·lular present en aquest tipus de cultius, on les velocitats de creixement són tant lentes i les concentracions cel·lulars a les que s'arriben són tant petites, desestima la utilització de metodologies que es basen en la mesura de l'activitat cel·lular per a l'estimació de la

concentració cel·lular. Cal doncs tornar a la mesura directa de la concentració cel·lular i, per tant, a la mesura de l'estimador de concentració E_2 .

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment en el capítol 4, el fet de no poder reaprofitar els microelèctrodes per a successius cultius cel·lulars implica que el preu del muntatge augmenti considerablement. Tenint en compte però, que es tracta de productes d'alt valor afegit (teràpies regeneratives), on els costos d'altres fungibles són molt elevats (suplements del medi de cultiu com factors de creixement o sèrum AB humà entre d'altres), es pot permetre aquesta despesa. A més, en cas d'implementació del sistema a la indústria, es podria efectuar la pròpia fabricació de pous de cultiu amb els microelèctrodes implantats durant el procés de producció, abaratint-ne els costos.

S'ha de comprovar, doncs, que el sistema de mesura de l'estimador de concentració cel·lular és capaç de mesurar a baixes concentracions cel·lulars. Per a fer-ho, s'ha efectuat el monitoratge de la impedància a 4 fils al llarg de 12 dies, d'un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes inoculat a una concentració cel·lular de 2500 cèl·lules/cm². El cultiu s'ha dut a terme a l'interior d'un minibioreactor modificat amb la incorporació del sistema de mesura d'impedància a unes condicions estàndards de cultiu, però amb només 3 ml de medi de cultiu i sense agitació, per a poder obtenir un creixement equivalent a les mesures realitzades fora de línia en plaques de 6 pous. La relació obtinguda, que s'ha representat directament en forma de calibrat, es pot observar a la figura 6.43, on es veu la molt bona correlació entre les dues mesures.

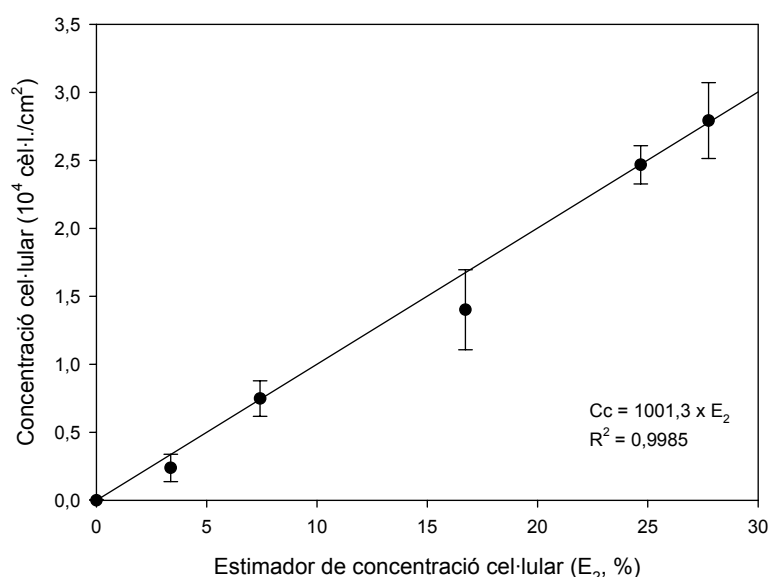


Figura 6.43 Calibratge de la variació de l'estimador de concentració cel·lular E_2 mesurat a 4 fils, respecte la variació de concentració cel·lular en cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes.

Amb la realització d'aquest calibrat, ja es pot obtenir un perfil de concentració cel·lular al llarg del cultiu de les cèl·lules mare mesenquimals humanes, tal i com es pot observar a la figura 6.44, on se'l compara amb el perfil de concentració cel·lular obtingut anteriorment durant les mesures de concentració cel·lular realitzades fora de línia.

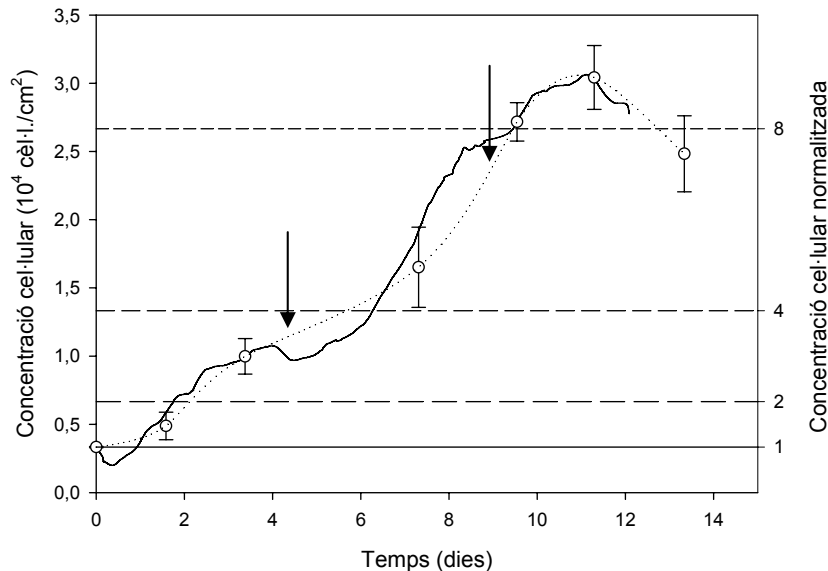


Figura 6.44 Seguiment de la concentració cel·lular en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes a partir del monitoratge de l'estimador de concentració cel·lular E₂ (línia —). Les fletxes indiquen la realització d'un recanvi de medi. S'ha representat també a la figura el perfil de concentració cel·lular obtingut anteriorment (figura 6.40) a partir de recomptes cel·lulars efectuats fora de línia (línia ··· i símbol ○) i un eix secundari amb la concentració cel·lular normalitzada (on cada línia representa una duplicació).

Es pot observar doncs, la bona correlació entre els dos perfils, tot i l'error intrínsec de les mesures realitzades fora de línia que, a aquestes concentracions cel·lular, necessiten d'un pas previ de concentració de la mostra per a poder ésser mesurades mitjançant un recompte cel·lular estàndard.

Amb el perfils en línia de la concentració cel·lular, ja es pot determinar la velocitat màxima de creixement per a les cèl·lules mare mesenquimals humanes amb bastant bona precisió. A continuació, a la figura 6.45 s'han representat els perfils de les velocitats de creixement puntual i acumulada obtingudes mitjançant les mesures de la impedància al llarg del cultiu (esquerra).

Les mesures de les velocitats puntual i acumulades s'han efectuat de la mateixa manera que en el cultius de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella (últim ½ dia i tot el temps respectivament). Finalment per a poder comparar els resultats, també s'han representat els perfils de les velocitats de creixement puntual i acumulada per a les mesures realitzades fora de línia (dreta), tenint en compte tots els punts pel càlcul de la velocitat acumulada i només dos punts per a cada mesura de la velocitat puntual.

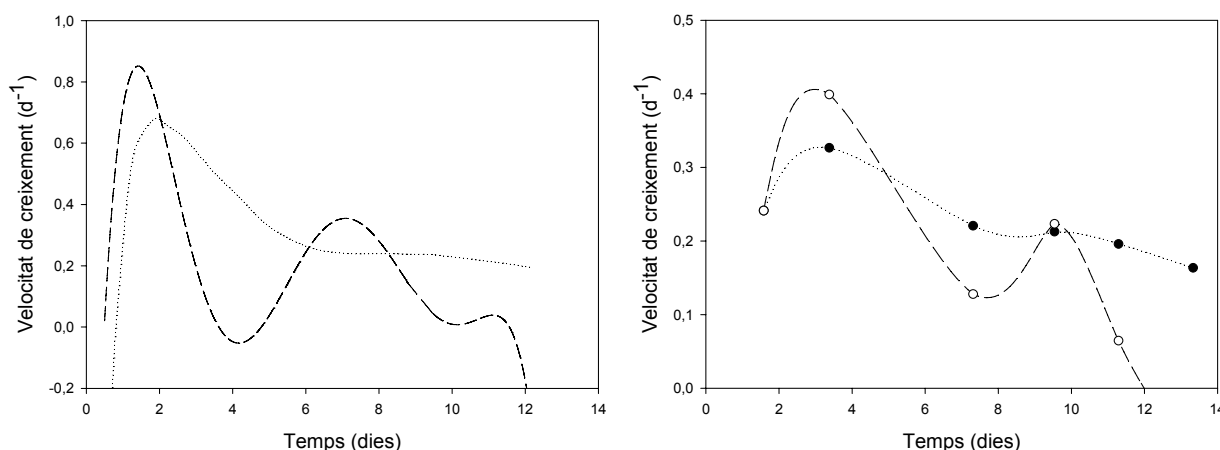


Figura 6.45 Perfils de les velocitats de creixement puntual (línies – –) i acumulada (línies ···) al llarg dels dos cultius d'hMSC, el cultiu monitorat a partir de la mesura en línia de l'estimador de concentració cel·lular E_2 (esquerra) i el cultiu monitorat a partir de mesures fora de línia de la concentració cel·lular (dreta).

Observant els perfils obtinguts per a les mesures d'impedància, es pot observar que la velocitat de creixement acumulada va augmentant a l'inici del cultiu fins a arribar a un valor màxim als 2 dies de cultiu, moment en que comença a disminuir fins a estabilitzar-se a partir del 6è dia de cultiu. Pel que fa a la velocitat de creixement puntual, es pot observar com també va augmentant ràpidament al principi del cultiu fins a arribar al seu màxim cap als 1,5 dies de cultiu i, a partir d'aquest moment, la velocitat va disminuint fins el quart dia de cultiu.

Al realitzar el recanvi de medi al final del 3er dia de cultiu, la nova aportació de factors de creixement (possiblement esgotats) fa que la velocitat puntual torni a augmentar fins al 7è dia de cultiu, en el que arriba a una velocitat màxima un 50% inferior a la obtinguda a l'inici del cultiu. Finalment, torna a disminuir i, tot i que es realitza un nou recanvi del medi de cultiu al 8è dia de cultiu, no es pot observar un nou augment en la velocitat. Aquesta variabilitat de la mesura de la velocitat acumulada, fa que sigui més adequat agafar el valor màxim de la velocitat acumulada com a valor de velocitat màxima de creixement obtinguda en el cultiu, tal i com es pot observar a la taula 6.4.

Taula 6.4 Valors de les màximes velocitats de creixement puntual obtingudes per a ambdós sistemes de mesura de la concentració cel·lular, el sistema de mesura de la impedància en línia i el sistema de recomptes de concentració cel·lular efectuats fora de línia.

Sistema de mesura	μ màxima (d^{-1})	t_{dup} (hores)	Variació (%)
En línia	0,68	24,5	100
Fora de línia	0,40	41,6	59

En les mesures de les dues velocitats a partir de les mesures efectuades fora de línia, es pot observar que, tot i tenir un perfil de creixement cel·lular pràcticament idèntic per a les dues mesures i, obtenint un perfil semblant per a les velocitats de creixement puntual i acumulada, el fet de no disposar de més punts de concentració cel·lular en les mesures realitzades fora de línia fa que els corresponents valors de les velocitats màximes de creixement mesurades obtingudes pels dos sistemes de seguiment del cultiu cel·lular difereixin molt. Per altra banda, a mesura que avança el cultiu, el valors de la velocitats de creixement acumulada ja es van apropant cap al mateix valor pels dos sistemes (al disposar de més punts de concentració cel·lular pel seguiment fora de línia del cultiu), un valor aproximat de $0,22 \text{ d}^{-1}$ (temps de duplicació de 75,6 h).

Així doncs, amb el seguiment del pH del medi de cultiu no s'ha pogut efectuar un monitoratge de la concentració cel·lular al llarg d'un cultiu d'expansió de cèl·lules mare mesenquimals humanes, fent necessària la recuperació de la mesura de la bioimpedància desenvolupada anteriorment. Amb aquest monitoratge de la concentració cel·lular a partir de la mesura de la impedància del cultiu, ja s'ha pogut realitzar un seguiment de la concentració cel·lular al llarg del cultiu d'expansió de les hMSC, obtenint una bona sensibilitat que ha permès la determinació dels corresponents paràmetres cel·lulars. Amb aquests paràmetres doncs, ja es disposa de prou dades per a poder analitzar els efectes provocats a la font cel·lular i en el funcionament del sistema de mesura, un cop es van incorporant en el sistema la resta dels pilars o eines de l'enginyeria tissular.

6.3.2 ESTÍMULS QUÍMICS: MEDI DE DIFERENCIACIÓ

Dins de l'enginyeria tissular per a la regeneració cardíaca, varis grups de recerca han mostrat que la 5-azacitidina (figura 6.46), indueix les cèl·lules mare mesenquimals de ratolí o de porc (Fukuda·2001; Makino *i col.*·1999; Shim *i col.*·2004; Xu *i col.*·2004), i humanes més recentment (Antonitsis *i col.*·2008), a la seva diferenciació cap a cardiomiòcits *in vitro*, essent aquest el principal regulador bioquímic per a la diferenciació cardíaca a partir de cèl·lules mare adultes (Heng *i col.*·2004).

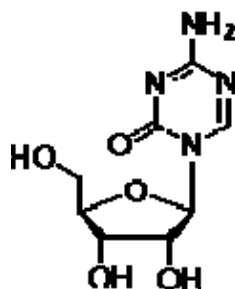


Figura 6.46 Estructura molecular de la 5-azacitidina.

La 5-azacitidina causa la desmetilació de l'ADN creant-li obertures que permeten la unió de factors de transcripció amb la conseqüent reactivació dels gens de supressió tumoral. Actua doncs com a un potent inhibidor del creixement i del mecanisme de regulació de l'expressió i l'activació genètica, a més de ser un agent citotòxic (Broday *i col.* 1999).

Respecte als estímuls físics i químics que s'utilitzaran en aquest apartat del treball d'enginyeria tissular per a la diferenciació cardíaca, ens centrarem en l'efecte d'inducció de la 5-azacitidina a la diferenciació cap a cardiomiòcit en els cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes.

6.3.2.1 MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR I ESTUDI METABÒLIC

Així doncs, per tal d'estudiar l'efecte que provoca l'ús de la 5-azacitidina com agent de diferenciació cardíaca, es realitza el seguiment en línia de l'estimador de concentració cel·lular E_2 en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes als que se li ha aplicat un tractament de diferenciació amb presència de la 5-azacitidina (protocol a l'apartat 8.3.4 de Materials i Mètodes).

La concentració cel·lular inicial pel cultiu monitorat és de $3 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², és a dir, a la concentració de confluència obtinguda en els experiments anteriors. D'aquesta manera, al trobar-se limitades per espai, no poden créixer amb normalitat, induint el cultiu cap a la diferenciació cel·lular. El cultiu monitorat s'ha dut a terme en un minibioreactor amb el que s'han mantingut unes condicions de cultiu estàndards (descrites a l'apartat 8.4.3.1 de Materials i Mètodes). El perfil resultant s'ha representat a la figura 6.47.

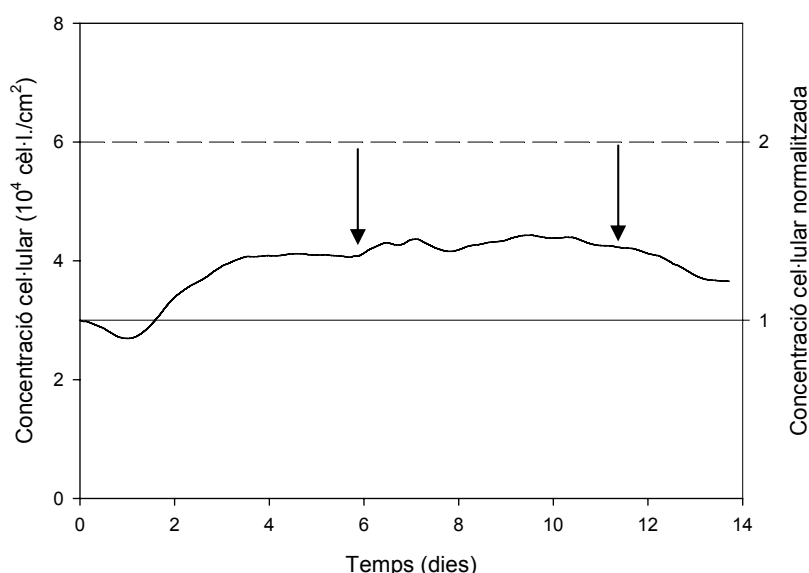


Figura 6.47 Seguiment de la concentració cel·lular a partir del monitoratge de l'estimador de concentració cel·lular E_2 (línia —) en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes efectuat amb medi de diferenciació cardíaca. Les fletxes indiquen la realització d'un recanvi de medi. Tal i com s'ha fet anteriorment, s'ha afegit un eix secundari amb la concentració cel·lular normalitzada per tal de comparar els diferents creixements efectuats.

Amb els resultats obtinguts, es pot observar que, tot i que la concentració cel·lular augmenta lleugerament a l'inici, les cèl·lules no arriben a doblar-se cap vegada. Així doncs, només es pot observar un creixement fins al tercer dia de cultiu, quan aquest creixement ja s'estanca i, a diferència dels cultius realitzats anteriorment sense diferenciació, on s'inicia ràpidament la fase de mort, el cultiu tractat per a la diferenciació cardíaca s'estabilitza a una concentració entre 4 i $4,5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm². Aquesta estabilitat dura fins aproximadament l'11è dia de cultiu, moment en el que el cultiu entra en una fase de mort, tot i el recanvi de medi efectuat.

Per tal de realitzar un anàlisi més complet, s'han representat a la figura 6.48 les velocitats de creixement puntual i acumulades obtingudes pel creixement del cultiu amb el tractament de diferenciació. Tal i com es pot observar, els perfils obtinguts són similars als obtinguts fins a aquest moment pels creixements de les cèl·lules mare mesenquimals humanes sense cap tractament de diferenciació.

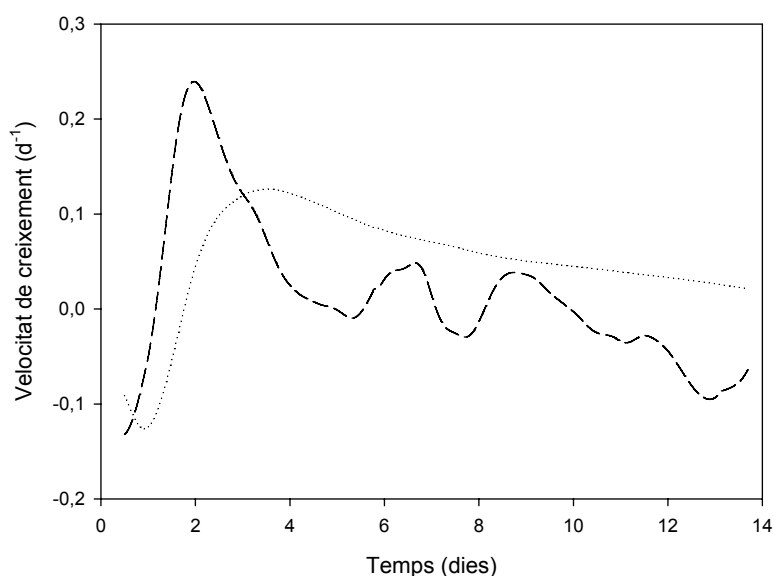


Figura 6.48 Perfils de les velocitats de creixement puntual (línia - -) i acumulada (línia ···) obtinguts a partir de la mesura en línia de l'estimador de concentració cel·lular E_2 , al llarg del cultiu d'hMSC efectuat amb medi de diferenciació cardíaca.

En aquest cas però, la màxima velocitat puntual a la que arriba en les primeres fases del cultiu és clarament inferior al la màxima velocitat puntual a la que arriba el cultiu sense cap tractament de diferenciació, amb uns valors de 0,13 i 0,68 d⁻¹ respectivament (uns temps de duplicació d'aproximadament 130 i 25 hores respectivament), que correspon a una disminució del 81%. Tal i com s'ha realitzat pels altres creixements, s'ha agafat com a velocitat màxima la obtinguda a partir del perfil de la velocitat acumulada, amb una millor fiabilitat que el perfil de la velocitat de creixement puntual, en la que es poden observar grans fluctuacions en la mesura.

Aquesta variació però, tal i com passava anteriorment amb els cultius de diferenciació condrogènica (apartat 6.2.2.1), és més atribuïble al fet que la concentració inicial d'aquest cultiu és pràcticament la de confluència i, per tant, el cultiu es troba influenciat per una inhibició per contacte cel·lular, més que al fet de diferenciar-se, ja que aquesta velocitat es dona en la primera fase del cultiu, mentre que la diferenciació cel·lular és un procés lent que es dona al llarg d'un temps elevat.

Després del màxim en la velocitat de creixement obtingut en els primers dies de cultiu, la velocitat puntual baixa fins a ser aproximadament nul·la i, a diferència del cultiu monitorat sense tractament per a la diferenciació, aquesta no torna a augmentar un cop es realitza el recanvi de medi i es manté sense variar significativament entre el 4rt i 12è dia de cultiu. Aquest efecte sí que pot ser atribuïble a un inici en la diferenciació cel·lular, ja que les cèl·lules diferenciades perden l'habilitat de dividir-se. Al final del cultiu, a partir del 12è dia de cultiu la velocitat de creixement comença a disminuir a valors negatius, indicant que el cultiu entra en fase de mort cel·lular.

Per poder comparar els resultats obtinguts amb mesures efectuades fora de línia, s'ha efectuat el seguiment del consum de glucosa acumulat i de la producció de làctic, a partir de duplicats de cultius realitzats fora de línia en experiments paral·lels, tant de cultius amb medi de cultiu normal com de duplicats de cultius als que se'ls ha realitzat el tractament de diferenciació. Els resultats obtinguts es poden observar a la figura 6.49.

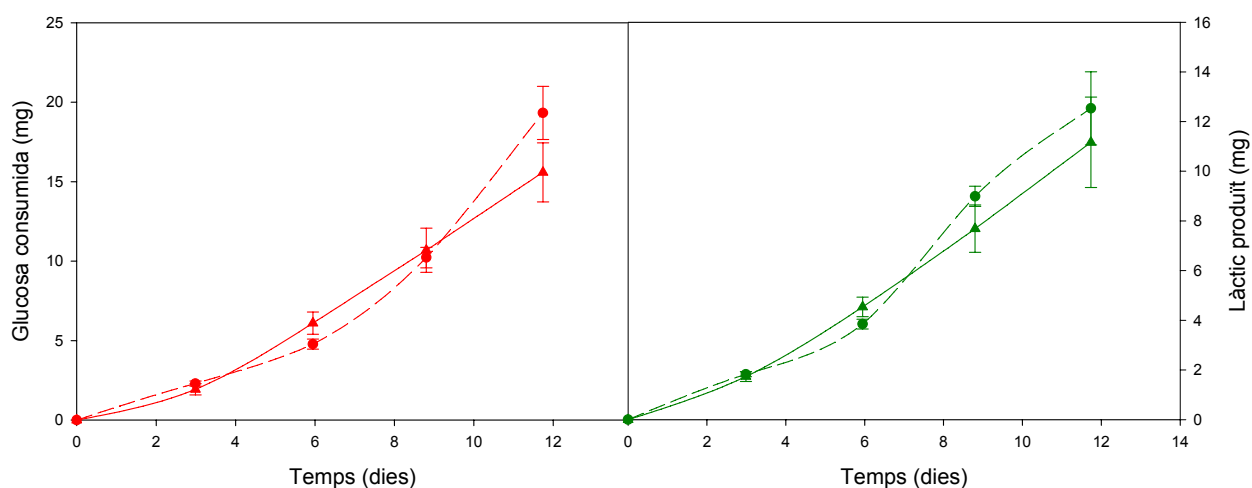


Figura 6.49 Seguiments de la variació de la glucosa consumida (esquerra, línies en vermell) i de la producció d'àcid làctic (dreta, línies en verd) al llarg dels cultius, a partir de mesures fora de línia efectuades durant els recanvis de medi dels cultius. Els cultius analitzats són d'hMSC cultivades amb medi de creixement normal (línies — i símbols ▲) i d'hMSC cultivades amb medi de diferenciació cardíaca (línies -- i símbols ●).

Així doncs, amb els perfils obtinguts es pot observar que ambdós cultius, el cultiu amb i sense tractament de diferenciació, tenen uns consums i produccions molt similars al llarg de tot el creixement, lleugerament superiors pel cultiu amb el tractament de diferenciació, tot i que s'ha de tenir en compte que aquest arriba a una concentració final superior (concentració cel·lular final de 4,4 i $3 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² respectivament). Per tant, si es comparen el que realment s'obté és un consum de glucosa de 5,2 mg/(10⁴ cèl·lules finals) pel cultiu sense medi de diferenciació i 4,3 mg/(10⁴ cèl·lules finals) pel cultiu amb medi de diferenciació MCIC i unes produccions de làctic de 3,7 i 2,8 mg/(10⁴ cèl·lules finals) respectivament, essent en ambdós casos, unes disminucions no significatives.

Així doncs, amb el monitoratge de la concentració cel·lular a partir de la mesura de la bioimpedància en el cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes amb presència de medi de diferenciació cardíac, s'ha pogut observar una disminució casi total de la màxima velocitat de creixement respecte el cultiu anterior de les mateixes cèl·lules, però cultivades sense presència del medi de diferenciació. A més, s'ha pogut observar que un cop obtinguda aquesta màxima velocitat de creixement, el cultiu efectuat amb medi de diferenciació estableix a una concentració cel·lular determinada fins al final del cultiu (amb una velocitat puntual pràcticament nul·la). Tot i aquesta clara diferència amb els perfils de concentració cel·lular i de la velocitat de creixement, no s'observen canvis significatius en l'activitat cel·lular amb les mesures fora de línia de del consum de glucosa i de la producció de làctic.

6.3.2.2 ESTUDI GENÈTIC I MORFOLÒGIC

Així doncs, per tal de determinar si aquests canvis en la velocitat de creixement dels cultius efectuats en presència de medi de diferenciació es troben relacionats amb una diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals humanes, cal efectuar una comprovació, que es realitzarà mitjançant un estudi genètic i morfològic, tant dels cultius als que s'ha realitzat el tractament com als que no se'ls ha realitzat.

Tal i com s'ha efectuat en els apartats d'estudi genètic en la diferenciació cap a condrocit, per a la caracterització genètica de les cèl·lules mare mesenquimals humanes, per a veure si han començat a diferenciar-se cap a cardiomiòcits humans, s'analitzarà mitjançant la tècnica de la *RT-PCR*, l'expressió de determinats gens que ens permeten determinar aquest estat de diferenciació en que es troben les cèl·lules. Els marcadors genètics escollits per a l'anàlisi són el GAPDH, la Desmina, l' α -actina, la β -MHC i la Troponina T (Xu *i col.* 2004).

El primer de tots els marcadors genètics, tal i com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat de diferenciació condrogènica, el gen del GAPDH (Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa) és un gen que

expressa de forma constitutiva un dels enzims involucrats en la glicòlisis i de donar positiu en totes les cèl·lules. Per tant, s'utilitza com a control positiu de l'estat de l'RNA extret de la població cel·lular a analitzar.

La Desmina és una proteïna que actua de subunitat dels filaments intermediaris en el teixit muscular, tant el teixit muscular llis com el cardíac, que a través de la seva unió amb els sarcòmers (unitat estructural de les microfibrilles del teixit muscular), connecta l'aparell contràctil cel·lular al nucli i a les mitocòndries (Traub·1985). A través d'aquestes connexions, es manté la integritat mecànica i estructural de la cèl·lula durant la contracció, ajudant en la transmissió de la força així com en la regulació longitudinal de la càrrega suportada (Wang *i col.*·1993). La Desmina, al jugar un paper important en diferents passos inicials de la diferenciació miogènica (Weitzer *i col.*·1995) i la formació de miotubs (H. Li *i col.*·1994), fa que aquest gen actuï com un dels marcadors genètics més primerencs de la diferenciació cap a teixit muscular cardíac.

La família de les actines és una família de proteïnes que tenen com a funcions principals el manteniment del citoesquelet, la mobilitat cel·lular i la contracció muscular. Dins aquesta família hi ha 6 formes primàries (Vandekerckhove i Weber·1978), entre les quals es troba l' α -actina cardíaca. L' α -actina cardíaca és la forma de les actines majoritària tant en els cors adults i en el desenvolupament inicial del múscul (Bains *i col.*·1984; Hayward i Schwartz·1986; Sassoon *i col.*·1988), com en les últimes etapes de desenvolupament del fetus (Bertola *i col.*·2008).

La Troponina T és una proteïna que forma part del complex de les Troponines. El complex de les Troponines té com a funció el control de la interacció entre els filaments primis i gruixuts dels músculs de l'aparell contràctil com a resposta als canvis del calci intracel·lular (Ausoni *i col.*·1991). Aquest complex es troba compost per tres subunitats entre les quals es troba la Troponina T cardíaca (Ebashi i Endo·1968), on l'expressió de la qual es dona bàsicament durant les primeres etapes del desenvolupament del múscul cardíac (Cooper i Ordahl·1984).

Finalment, la β -MHC és un gen que forma part de la família de les MHC (Myosin Heavy Chain) d'uns 8-10 membres (Mahdavi *i col.*·1984), dels quals dos gens designats α i β són expressats en el múscle cardíac (Mahdavi *i col.*·1982) i la relació dels quals es troba correlacionada amb la velocitat de contracció del múscul cardíac (Schwartz *i col.*·1981). Els dos gens s'expressen predominantment en el ventricle humà normal, però mentre que l'expressió de la β -MHC és dominant durant el desenvolupament del cor al final en les últimes etapes de desenvolupament del fetus, l'expressió de la α -MHC és dominant en els cors

adults (Mahdavi *i col.*1984). Aquest fet fa que l'expressió de la β -MHC sigui el més adequat com a marcador pel seguiment de diferenciació cardíaca, sobretot en les etapes més avançades de diferenciació al ser un dels gens amb expressió més posterior (Oh *i col.*2003).

Per tant, durant el procés de diferenciació cardíaca mitjançant estímuls químics s'ha efectuat el seguiment de 4 marcadors genètics diferents, marcadors que corresponen a unes proteïnes amb diferents funcions dins l'estructura del sarcòmer (figura 6.50) i, dels quals, tres s'expressen en etapes inicials de la diferenciació del múscul cardíac (Desmina, α -actina i Troponina T), mentre que l'altre (β -MHC) s'expressa en etapes més posteriors de diferenciació.

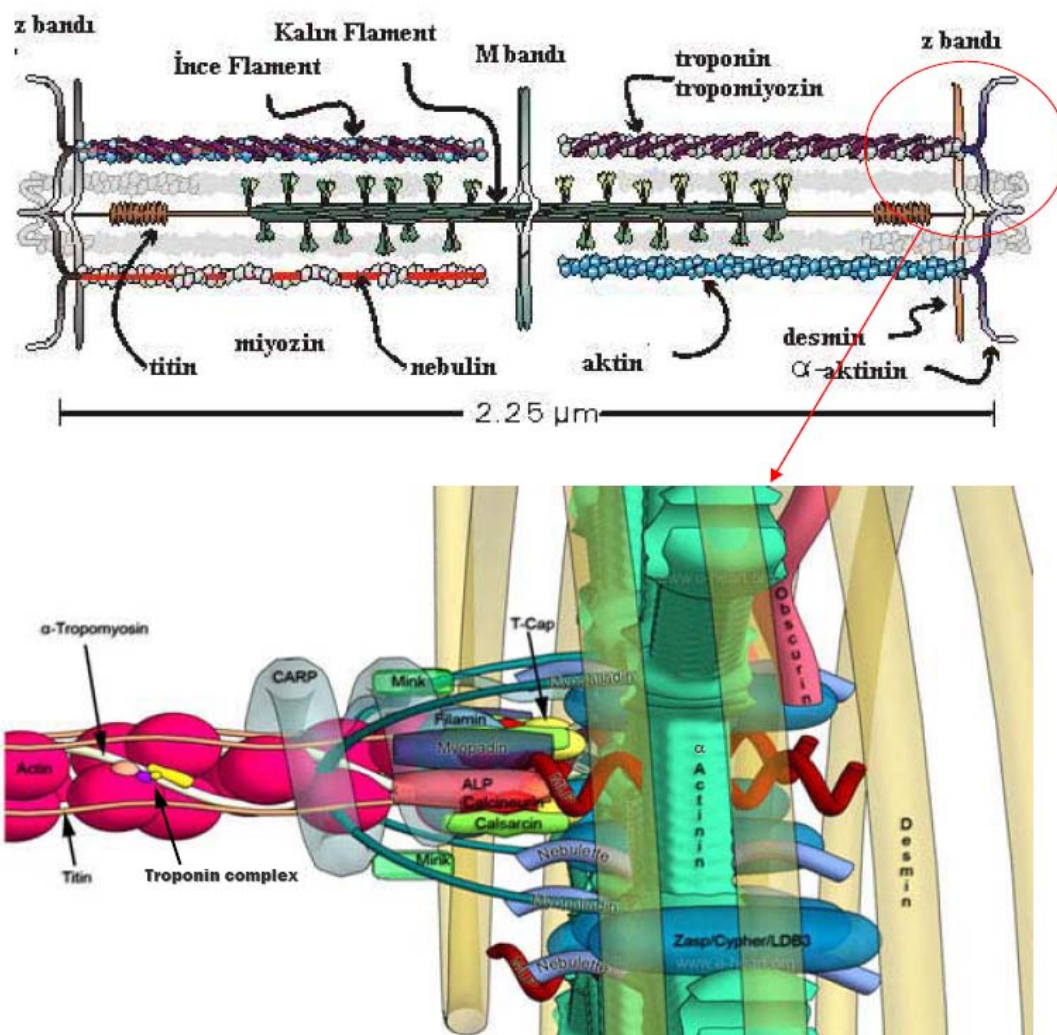


Figura 6.50 Estructura del sarcòmer (unitat estructural de les microfibrilles del teixit muscular) i la seva interacció amb les proteïnes corresponents als marcadors genètics analitzats: la desmina, l' α actina, la troponina (dins el complex de les troponines) i la β -MHC (myosin heavy chain).

Tal i com s'ha procedit anteriorment en l'estudi de diferenciació condrogènica, un cop comprovat que no hi ha hagut degradació de l'RNA de les mostres, s'han realitzat les RT-PCRs amb els corresponents gels

d'agarosa. Els resultats dels gels es mostren a continuació a la figura 6.51 pel cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes sense el tractament de diferenciació cardíaca i a la figura 6.52 pel cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes al que s'ha aplicat el tractament de diferenciació cardíaca.

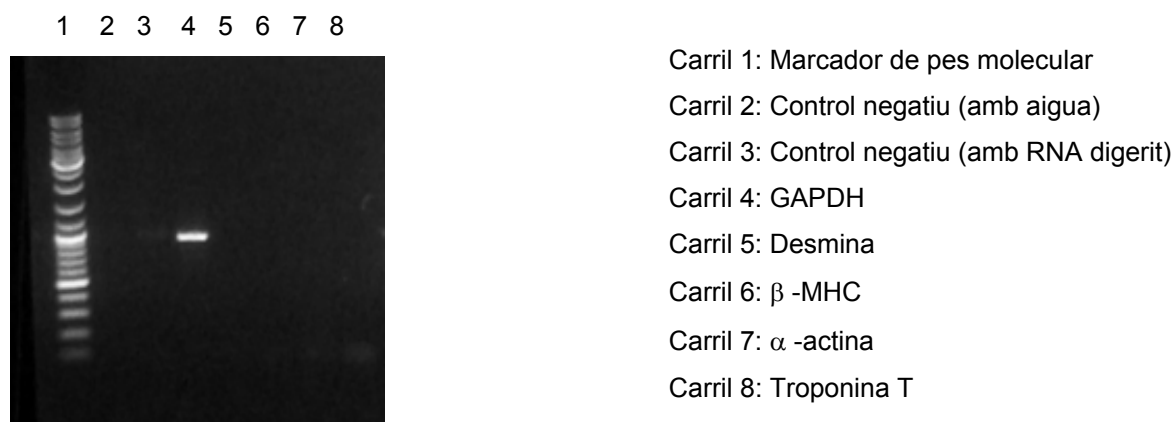


Figura 6.51 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les hMSC sense el tractament de diferenciació cardíaca.



Figura 6.52 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca.

Els carrils del control positiu (GAPDH, carril nº4) dels dos gels, juntament amb els controls negatius (amb aigua, carril nº2 i amb RNA digerit, carril nº3) indiquen que la tècnica de la RT-PCR s'ha aplicat correctament. Pel que fa als marcadors de diferenciació cardíaca, es pot veure que no s'ha obtingut cap expressió en el cas de les cèl·lules sense tractament mentre que, per altra banda, en el cas de les cèl·lules a les que se'ls ha aplicat el tractament de diferenciació cardíaca, s'obtenen resultats diversos.

Si mirem el 5è carril, el d'expressió de la Desmina, es pot observar una banda situada cap als 400 parells de base (teòricament a 408 parells de bases) indicant que realment hi ha una expressió del marcador (marcador positiu). Al 6è carril, el d'expressió de la cadena β -MHC, no s'observa cap mena de banda, de manera que no s'expressa i per tant el marcador és negatiu.

Al 7è carril, el d'expressió de l' α -actina, es poden veure dues bandes, tot i que cap de les dues es troba a l'alçada teòrica dels 418 parells de bases, de manera que es procedeix a analitzar-ho més detalladament. Finalment al 8è carril, d'expressió de la Troponina T, es pot observar una banda molt feble, però com que a més es troba situada a una alçada de molt pocs parells de base (cap banda als 416 parells de bases teòrics) no es considera positiva l'expressió del gen i per tant el marcador és negatiu.

Per tal d'assegurar si els marcadors per a la Desmina i de la l' α -actina són positius o no, s'ha realitzat una amplificació de la senyal mitjançant una PCR de les mostres resultants de les RT-PCR dels marcadors. Els resultats es poden observar a la figura 6.53.

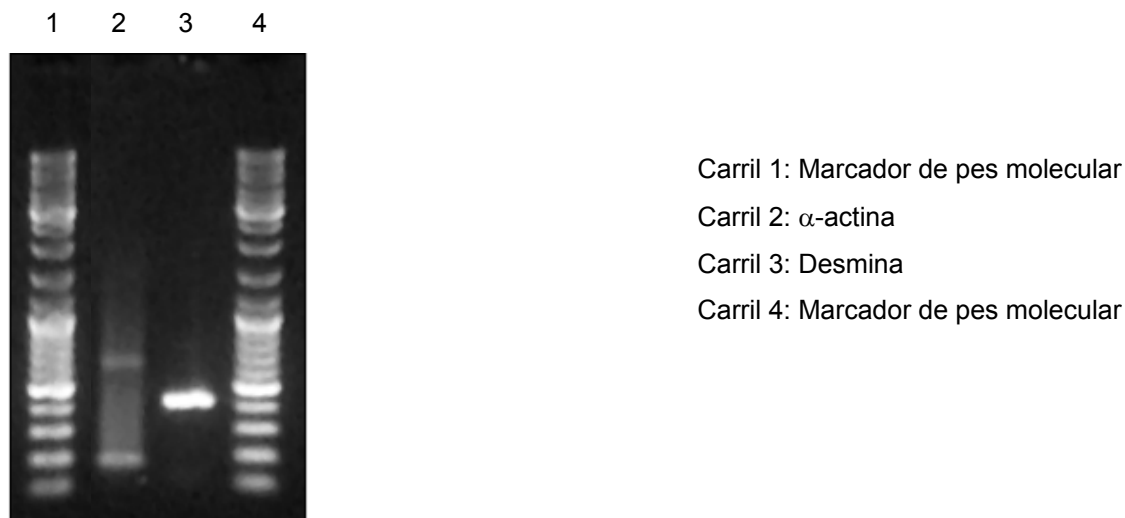


Figura 6.53 Foto del gel de l'electroforesi realitzat de la RT-PCR de les mostres del GAPDH, la Desmina i la α -actina de les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca.

Amb la ampliació de la senyal realitzada, es pot observar en el 4rt carril, el d'expressió de l' α -actina, encara es troben només les dues bandes situades a una alçada no esperada (situada als 418 parells de bases) significant que hi ha unions inespecífiques dels oligonucleòtids i, per tant, el marcador per α -actina es pot considerar negatiu. En el carril n°5, el d'expressió de la Desmina, es pot observar una banda molt clara situada en l'alçada teòrica de 408 parells de bases, de manera que es pot corroborar que el marcador per Desmina és positiu.

Tot i que només ha resultat positiu un dels marcadors analitzats, el marcador genètic que ha resultat positiu (la Desmina) és un dels marcadors genètics més primerencs de la diferenciació cap a teixit muscular cardíac, essent un fet bastant lògic, si es té en compte que les cèl·lules s'han analitzat 12 dies després del tractament de diferenciació i que, per tant, la diferenciació que s'hauria aconseguit encara es

troba en un estadi molt inicial. Així doncs, es pot concloure que amb el tractament de diferenciació cardíaca s'ha induït a les cèl·lules mare mesenquimals humanes a que iniciïn una diferenciació cap a cardiomiòcits.

Per a acompanyar a l'estudi genètic, s'ha realitzat un estudi morfològic de les cèl·lules al llarg del cultiu. Per a realitzar aquest estudi morfològic, s'han fet observacions al microscopi de contrast de fases en tres moments del cultiu diferents i s'ha comparat la morfologia de les cèl·lules que s'han cultivat sense tractament de diferenciació amb les que s'han cultivat en medi de diferenciació. Els resultats es poden observar a la figura 6.54.

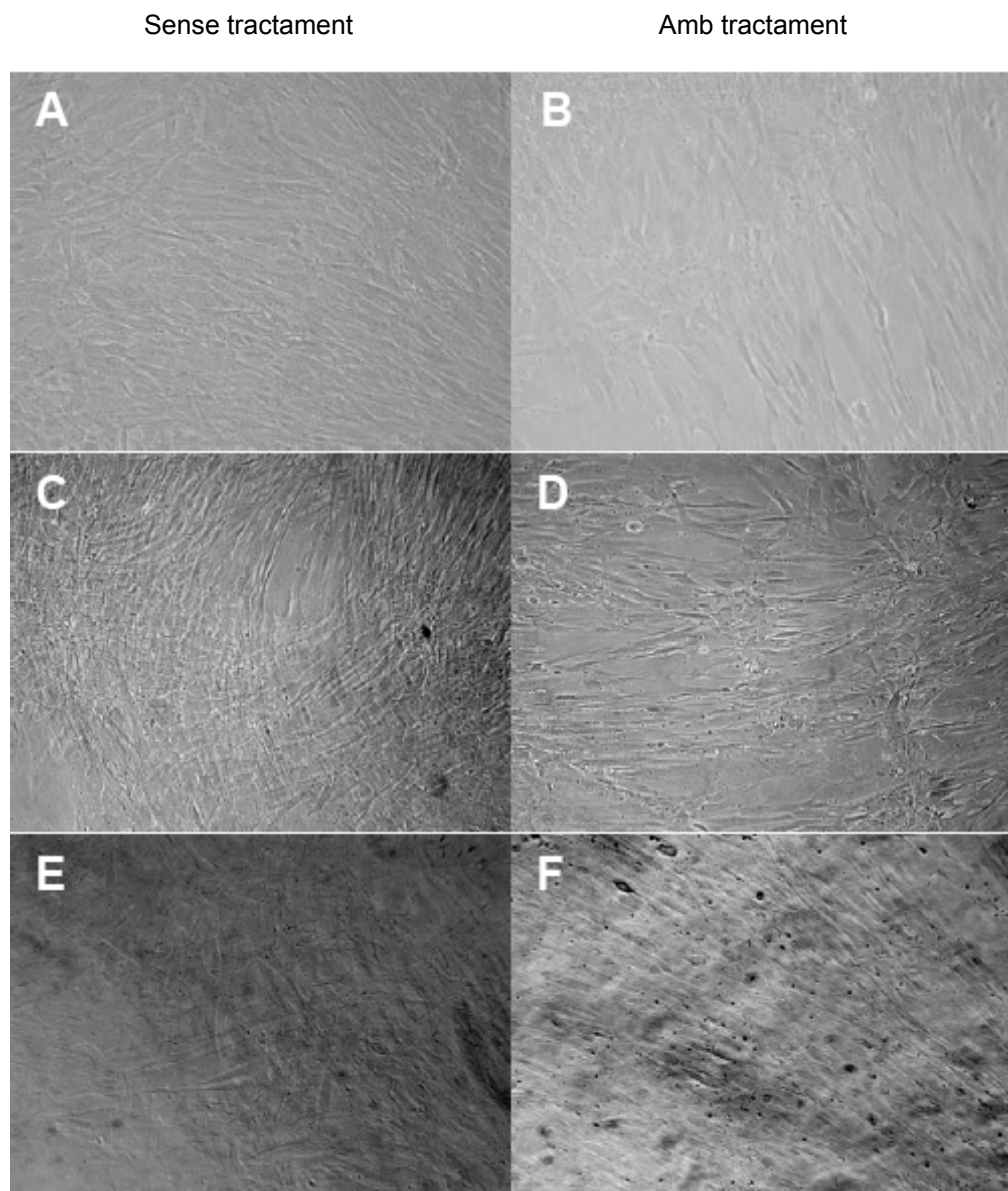


Figura 6.54 Fotos dels cultius en monocapa d'hMSC sense tractament de diferenciació (columna de l'esquerra) i amb tractament de diferenciació cardíaca (columna de la dreta). Les fotos s'han realitzat al 4rt dia de cultiu (fotos A i B), al 7è dia de cultiu (fotos C i D) i finalment al final del cultiu (12è dia, fotos E i F).

En el primer grup de fotos, corresponents als 4 dies de cultiu (fotos A i B), no es veuen diferències morfològiques entre les cèl·lules cultivades en els dos medis de cultiu diferents, tot i que les hMSC cultivades amb medi de diferenciació (foto B) es troben lleugerament més alineades que les cèl·lules cultivades amb medi normal (foto A), tal com estan col·locades en el teixit muscular cardíac. En el segon grup de fotos, corresponents als 7 dies de cultiu (fotos C i D), les cèl·lules cultivades en medi de diferenciació (foto D) també es veuen més alineades i més definides que les cultivades en medi normal (foto C), que es veuen com una capa uniforme a tota la superfície del pou de cultiu. Finalment amb el grup de fotos corresponents al final del cultiu al 12è dia (fotos E i F), les cèl·lules cultivades amb medi normal (foto E) segueixen amb la mateixa morfologia que els primers dies de cultiu, en canvi les cèl·lules cultivades en medi de diferenciació (foto F) formen una capa uniforme en tota la superfície del pou de cultiu però totes les cèl·lules estan alineades tal i com succeeix al teixit cardíac.

D'aquesta manera, morfològicament també es pot considerar que les cèl·lules mare mesenquimals a les que se'ls ha realitzat un tractament de diferenciació cardíaca han començat a patir modificacions, fent que les cèl·lules es comencin a alinear entre elles tal i com es troba en el teixit cardíac normal i, per tant, que s'ha induït a les cèl·lules mare mesenquimals humanes a que iniciïn una diferenciació cap a cardiomiòcits.

6.3.3 ENTORN TRIDIMENSIONAL: POLÍMERS

En el cas dels polímers necessaris per a teràpies d'enginyeria tissular per a la regeneració cardíaca, les propietats mecàniques imprescindibles, tenint en compte que ha d'aguantar les repetides contraccions del cor sense trencar-se, són la resistència a la fatiga i la elasticitat. Tenint en compte els mòduls elàstics dels diferents polímers analitzats (gels d'agarosa i d'alginat, fibrina i PLGA; apartat 6.2.3, taula 6.2), tal i com ja s'ha comentat anteriorment, els únics que presenten un comportament elàstic són la fibrina i PLGA, mentre que els gels en queden descartats.

Si es comparen els dos polímers restants entre ells, es pot observar que la fibrina ($6,65 \cdot 10^{-1} \text{ N/mm}^2$) té un mòdul elàstic unes 10 vegades superior al mòdul elàstic del polímer de PLGA ($6,54 \cdot 10^{-2} \text{ N/mm}^2$), indicant-ne una millor resistència significativa pel polímer de fibrina. S'ha de tenir en compte que en la regeneració cardíaca es necessita que el polímer sigui el més elàstic possible i modelable (sense una estructura robusta), ja que al contrari que en la regeneració condrocitària, el teixit cardíac es troba en un moviment constant de contracció i expansió en el que una estructura més robusta provocaria un augment d'esforços que podrien ésser perjudicials. Això fa que els polímers de fibrina, que són més elàstics i modelables que els polímers de PLGA, siguin més adients per a ésser utilitzats en la enginyeria tissular per a la regeneració cardíaca.

A més, mentre que la fibrina és un enzim del propi cos humà i, per tant, no presenta cap mena de toxicitat ni de reacció immune (utilitzada ja en nombroses operacions mèdiques sense obtenir cap tipus de reaccions), el polímer de PLGA és un polímer sintètic que podria presentar algunes reaccions adverses a l'utilitzar-se *in vivo* en el cor. Per tal de comprovar si la seva utilització en el sistema cardíac provoca reaccions adverses, s'ha colonitzat un polímer de PLGA d'1cm² (figura 6.55, esquerra) amb cèl·lules mare mesenquimals i s'ha suturat el polímer colonitzat al cor d'un porc neonatal en una zona prèviament infartada (Farré·2008). Aquest experiment s'ha realitzat a l'Hospital de Sant Pau i la Santa Creu en col·laboració amb l'Institut Català de Ciències Cardiovasculars

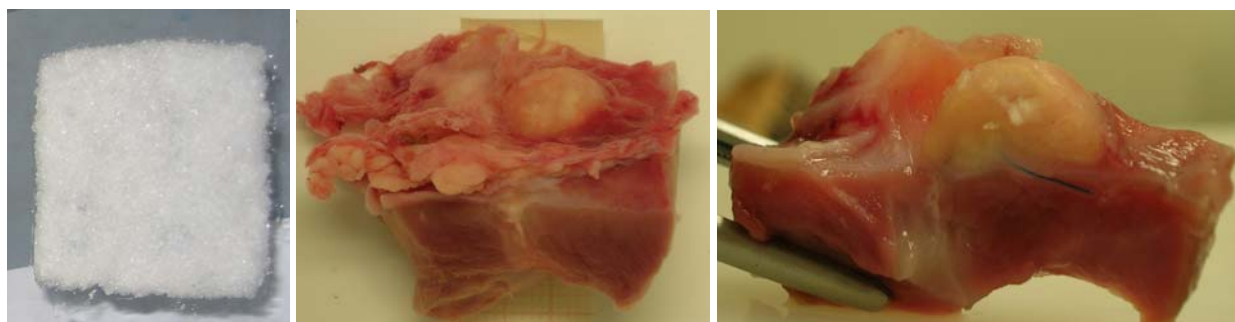


Figura 6.55 Fotografia del polímer de PLGA utilitzat per a la prova de toxicitat *in vivo* (esquerra), junt amb dues fotografies (central i dreta) de les reaccions obtingudes a la zona infartada amb el polímer suturat.

Tal i com es pot observar en les fotografies realitzades (figura 6.55, fotos central i dreta), han aparegut unes inflamacions evidents a la zona infartada on s'havia suturat el polímer de PLGA. Tot i que la utilització de polímers de PLGA ha resultat adequada per a l'enginyeria tissular per a la regeneració condrocitària (apartat 6.2.3), s'ha de tenir en compte que les característiques dels sistemes on han anat a parar són totalment diferents, de manera que mentre el polímer de PLGA que s'han col·locat als còndils ovins es troben en un entorn amb molt poca irrigació sanguínia i amb poques necessitats fisiològiques, el polímer de PLGA que s'ha utilitzat pel sistema cardíac es troba en un entorn on la irrigació és màxima, amb unes altes necessitats fisiològiques i amb la influència d'un moviment continuat amb les corresponents forces rebudes a la interfase polímer-sutura-cor. Aquestes diferències en l'entorn poden ser suficients per a passar d'un sistema on no s'observen reaccions adverses significatives a aquest entorn on les reaccions adverses obtingudes són molt evidents.

Així, la utilització de polímers de PLGA per a la regeneració cardíaca queda descartada i, per tant, s'utilitzaran polímers de fibrina, que a l'estar formats per una proteïna que es troba en el propi cos, no han donat cap tipus de problemes de rebuig en les operacions mèdiques en que s'ha utilitzat. Per altra banda, per poder comprovar la idoneïtat dels polímers de fibrina per a la seva utilització en la regeneració

cardíaca, s'ha preparat un polímer de fibrina (protocol de preparació a l'apartat 8.7.8 de Materials i Mètodes) amb cardiomiòcits aïllats de rata neonatal seguint el protocol d'aïllament de cardiomiòcits utilitzat en el grup (Farré·2005), i s'ha observat la seva funcionalitat a partir de l'enregistrament de vídeos.

La comprovació de la funcionalitat dels cardiomiòcits un cop aquests es troben a l'interior del polímer de fibrina s'ha basat en la observació positiva o no de batecs. Els resultats obtinguts han esdevingut positius, amb l'obtenció de batecs durant els quatre dies posteriors a l'aïllament dels cardiomiòcits i formació del polímer de fibrina. A la figura 6.56 s'han representat dos conjunts de fotogrames dels vídeos enregistrats on es poden observar els estats de relaxació i de contracció de dos cardiomiòcits durant els diferents batecs realitzats.

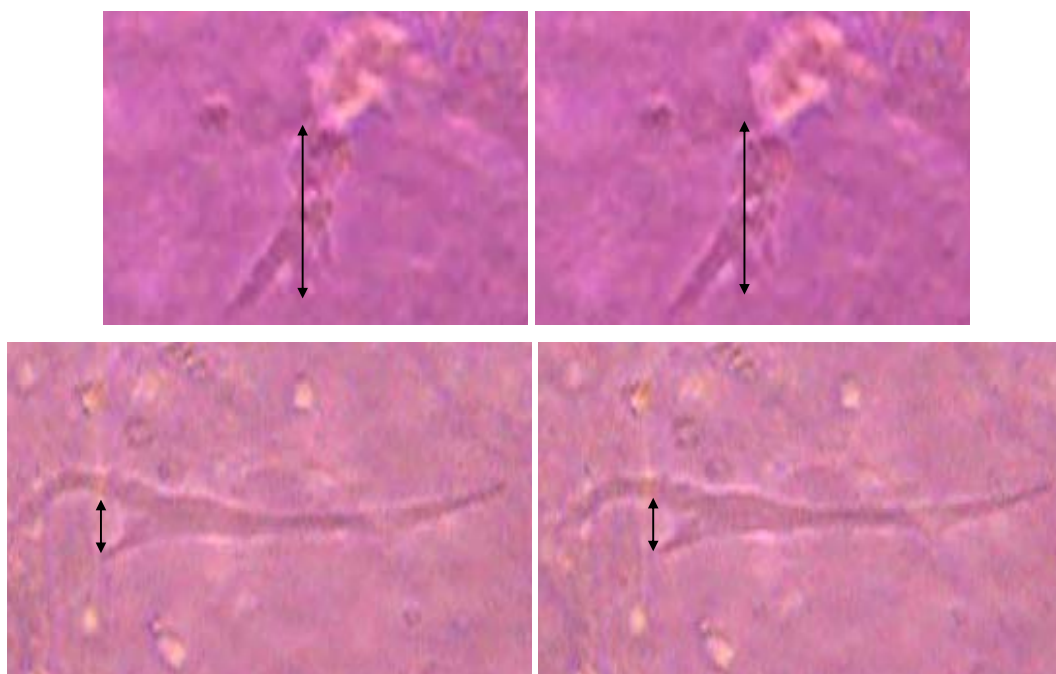


Figura 6.56 Conjunts de fotogrames de cardiomiòcits de rata neonatal a l'interior del polímer de fibrina en els estats de relaxació (fotografies de l'esquerra) i de contracció (fotografies de la dreta). Les fletxes representades s'han utilitzat com a element de comparació per a una millor observació dels estats de relaxació i contracció.

Per tant, s'utilitzaran polímers de fibrina per tal d'estudiar la millora que es produeix en la diferenciació cel·lular cap a cardiomiòcits al situar les cèl·lules mare mesenquimals humanes tractades per a la diferenciació cardíaca en un entorn tridimensional, respecte el tractament químic amb 5-azacitidina realitzat anteriorment en monocapa, on els resultats de diferenciació obtinguts han esdevingut positius (apartat 6.3.2).

6.3.3.1 MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR I ESTUDI METABÒLIC

Així doncs, per tal d'estudiar l'efecte que provoca l'ús d'estructures tridimensionals de fibrina com a agent de diferenciació cardíaca complementari al tractament de diferenciació química amb 5-azacitidina, es realitzarà el seguiment en línia de l'estimador de concentració cel·lular E_2 en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes als que se li ha aplicat un tractament de diferenciació amb presència de la 5-azacitidina, però encapsulades en una matriu de fibrina. Per a obtenir els polímers s'ha conservat el mateix protocol del tractament de diferenciació química (protocol a l'apartat 8.3.5 de Materials i Mètodes), que es realitza en monocapa i, al cap de les 24 hores que dura el tractament, s'ha procedit a la polimerització de la fibrina amb les cèl·lules tal i com es descriu a l'apartat 8.7.8 de Materials i Mètodes. En aquest cas, a l'igual com pels experiments de diferenciació anteriors, s'ha mantingut constant la quantitat total de cèl·lules per a cada un dels cultius (equivalent a una concentració de $3 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² en cultius de monocapes, és a dir, a la concentració de confluència). Finalment, el cultiu monitorat s'ha dut a terme en un minibioreactor situat a l'interior d'un Hexascreen amb el que s'han mantingut unes condicions de cultiu estàndards. Per a la mesura de la concentració cel·lular present en els polímers de fibrina s'han mantingut les unitats que en els experiments anteriors, és a dir, es mesurarà en cèl·lules/cm² equivalents per a cultius en monocapa.

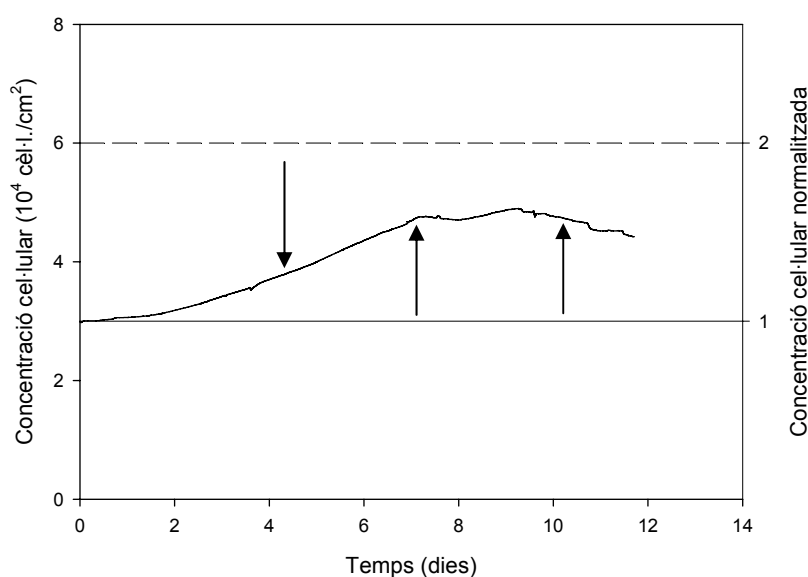


Figura 6.57 Seguiment de la concentració cel·lular (en valors equivalents a un cultiu en monocapa) a partir del monitoratge de l'estimador de concentració cel·lular E_2 (línia —) en un cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes efectuat amb medi de diferenciació cardíaca i en un entorn tridimensional de fibrina. Les fletxes indiquen la realització d'un recanvi de medi.

El perfil resultant s'ha representat a la figura 6.57, on es pot observar que les cèl·lules tenen un comportament bastant similar a l'obtingut amb les cèl·lules cultivades en monocapa i amb el mateix medi

de diferenciació, obtenint un creixement pràcticament nul, sense que la concentració s'arribi a duplicar. A diferència del cultiu efectuat en monocapa però, en el que el lleu creixement que hi havia inicialment s'estancava al tercer dia de cultiu, en aquest es manté aquest petit creixement durant els primers 7 dies, fins a arribar a una concentració final de $4,75 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm², lleugerament superior a la concentració final obtinguda amb el cultiu en monocapa. Un cop el creixement ja s'estanca al 7è dia de cultiu, aquest s'estabilitza entre $4,5$ i $5 \cdot 10^4$ cèl·lules/cm² durant aproximadament tres dies, moment en el que entra en una fase de mort cel·lular tot i haver realitzat un recanvi de medi. Si es compara amb el cultiu de diferenciació en monocapa, es pot observar que tot i que aquesta fase d'estabilitat en polímer és més curta, la fase de mort cel·lular del cultiu comença pràcticament al mateix moment.

Per tal de realitzar un anàlisi més complert, s'han representat a continuació a la figura 6.58 les velocitats de creixement puntual i acumulades obtingudes pel creixement del cultiu amb el tractament de diferenciació, en els que es poden observar diferències significatives amb els cultius en monocapa (amb i sense tractament de diferenciació, figura 6.48 i figura 6.45 respectivament).

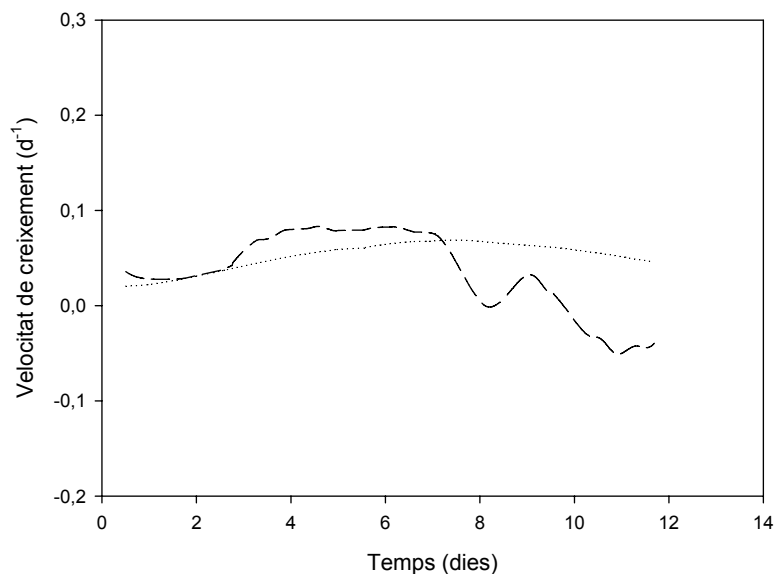


Figura 6.58 Perfils de les velocitats de creixement puntual (línia —) i acumulada (línia ···) obtinguts a partir de la mesura en línia de l'estimador de concentració cel·lular E_2 , al llarg del cultiu d'hMSC efectuat amb medi de diferenciació cardíaca i en un entorn tridimensional de fibrina.

Així, mentre que en els cultius en monocapa es pot observar un perfil en forma de pic format per una fase de latència inicial, amb un augment elevat de la velocitat puntual de creixement fins a la meitat de la fase de creixement i finalment seguit per una disminució ràpida de la velocitat fins al final de la fase de creixement, per altra banda, per a aquest cultiu en polímer de fibrina (figura 6.58), la velocitat puntual de creixement s'estabilitza directament sense realitzar cap tipus de pic inicial.

Si es comparen les velocitats màximes de creixement obtingudes entre els cultius als que se'ls ha cultivat amb medi de diferenciació, aquesta ha disminuït significativament al cultivar les hMSC en un entorn tridimensional, passant d'un valor de 0,13 d⁻¹ obtinguda pel cultiu de diferenciació en monocapa, a una màxima velocitat de creixement de 0,07 d⁻¹ pel cultiu en fibrina (temps de duplicació aproximat de 130 i 240 dies respectivament), essent les dues unes velocitats de creixement molt petites (pràcticament nul·les). Tot i ser una velocitat més lenta, el fet de que es mantingui durant més dies permet que la concentració final a la que arriben els cultius sigui la mateixa.

Aquest fet és lògic si es té en compte, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, que les cèl·lules tendeixen a aturar el seu creixement quan es troben en un entorn tridimensional, ja que aquest entorn tridimensional es rebut per les cèl·lules com a un estímul per iniciar la diferenciació cap a diferents tipus cel·lulars dependentment de les característiques del polímer. Tot i això, el fet de trobar-se en un entorn tridimensional pot significar la presència de problemes difusionals que no permetin una difusió de nutrients adequada per a les cèl·lules cultivades. Bibliogràficament es troba que els polímers de fibrina tendeixen a tenir la menor difusivitat (Leddy *i col.* 2004) entre els polímers més comunament utilitzats en la enginyeria tissular (inferior per exemple a la difusivitat obtinguda pels polímers d'alginat i d'agarosa), fent que sigui necessària la prevascularització dels polímers (Linnes *i col.* 2007) per a obtenir una millor funcionalitat dels constructes de fibrina per a ésser utilitzats en l'enginyeria tissular (Chen *i col.* 2008; Kannan *i col.* 2005). Així doncs, tot i l'aturada del creixement deguda a l'entorn tridimensional, el cultiu segurament també es troba influenciat per la poca difusivitat que presenten els polímers de fibrina

Finalment, després d'aquesta fase de creixement, la velocitat baixa fins a aproximadament ser nul·la (dies 7-8 a 10), però tal i com ja s'ha comentat anteriorment amb el perfil de concentració cel·lular, aquesta fase dura molt poc deixant pas a una fase de mort, on la velocitat de creixement es col·loca en valors clarament negatius.

Tal i com ja s'ha efectuat amb les mesures dels cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes amb diferenciació química, es compararan els resultats obtinguts amb mesures fora de línia de l'activitat cel·lular present en aquests cultius (mesures de consum de glucosa i producció de làctic), per tal de poder realitzar una millor comparació entre els cultius en monocapa i en polímer de fibrina. A més, per tal de comprovar si existeixen problemes difusionals deguts als polímers de fibrina que afectin significativament al creixement dels cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes tractades per a la diferenciació cardíaca, es compararan els resultats fora de línia obtinguts amb cultius de la fibrina utilitzada per a les

mesures en línia (fibrina A) amb els resultats obtinguts per a una altra fibrina significativament més densa (fibrina B).

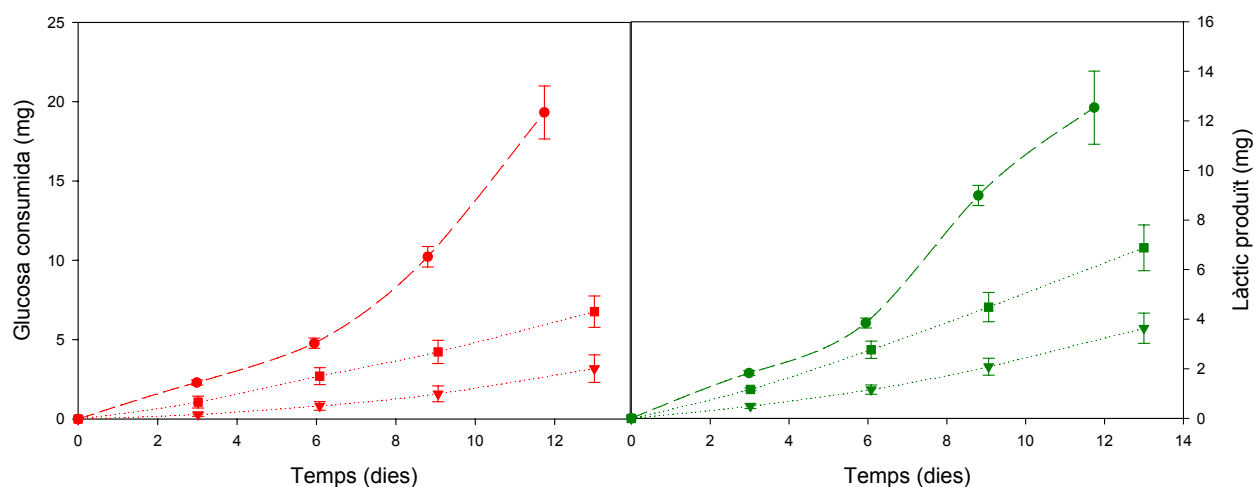


Figura 6.59 Seguiments de la variació de la glucosa consumida (esquerra, línies en vermell) i de la producció d'àcid làctic (dreta, línies en verd) al llarg dels cultius d'hMSC, a partir de mesures fora de línia efectuades durant els recanvis de medi dels cultius. Els cultius d'hMSC cultivades amb medi de diferenciació analitzats són els efectuats en monocapa (línies — i símbols ●), en fibrina A (línies ... i símbols ■) i en fibrina B (línies ... i símbols ▼).

A la figura 6.59 s'han representat els perfils de la glucosa consumida i del làctic produït a partir de cultius realitzats fora de línia en experiments paral·lels ($n=5$), en cultius d'hMSC als que se'ls ha realitzat el tractament de diferenciació i que s'han inclòs en un entorn tridimensional, utilitzant tant la mateixa fibrina utilitzada anteriorment (fibrina A) com una de més densa (fibrina B). A més, s'han representat també els perfils obtinguts anteriorment pels cultius en monocapa per a una millor comparació.

Primerament, si comparem els resultats obtinguts pels cultius en un entorn tridimensional respecte els resultats obtinguts per a les monocapes amb tractament de diferenciació, es pot observar com hi ha hagut un descens del consum evident pels cultius en entorns tridimensionals de fibrina, descens una mica més evident si es té en compte que la concentració a la que s'arriba amb els cultius polimèrics és lleugerament superior que en els cultius en monocapa. A més, tot i que el cultiu es troba en fase de creixement durant els primers 7 dies de cultiu, tal i com s'ha pogut observar anteriorment, tant el consum de glucosa com la producció de làctic es manté pràcticament constant al llarg de tot el cultiu, donant una evidència clara de la petita que és la velocitat de creixement del cultiu de les hMSC en fibrina (de $0,07\text{ d}^{-1}$ respecte els $0,68\text{ d}^{-1}$ del cultiu en monocapa i sense medi de diferenciació).

Si es comparen les dues fibrines entre elles, es pot observar que amb els cultius de cèl·lules incloses en polímers de la fibrina més densa (fibrina B) s'obtenen unes velocitats de consum de glucosa i producció de

làctic significativament inferiors a les obtingudes amb cultius de cèl·lules incloses en polímers de la fibrina menys densa (fibrina A), tot i partir de la mateixa concentració cel·lular inicial (concentració que no varia gaire al llarg del cultiu tal i com es pot observar amb les velocitats de creixement amb les que s'està tractant) i utilitzant el mateix medi, així com les demés condicions de cultiu, fent pensar que els consums haurien de ser similars en ambdós casos. Aquests fets, doncs, indiquen que els polímers de fibrina sí limiten la difusió dels nutrients ajudant, juntament amb l'efecte de diferenciació causat per la presència d'un entorn tridimensional, a un estancament del cultiu cel·lular.

Així doncs, amb la mesura de la bioimpedància s'ha pogut monitorar la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes incloses dins de polímers de fibrina, polímers que mimetitzen un entorn tridimensional òptim per a la diferenciació cap a cardiomiòcits. A partir d'aquest seguiment, s'ha pogut observar com la velocitat de creixement a disminuït fins a valors pràcticament nuls, indicant un estancament del creixement cel·lular, estancament que cal analitzar genètica i morfològicament per tal de comprovar si es tradueix en una diferenciació més completa de les cèl·lules cap a cardiomiòcits que el cultiu efectuat anteriorment en monocapa.

6.3.3.2 ESTUDI GENÈTIC I MORFOLÒGIC

Per tal de comprovar si la utilització, com a complement pel tractament químic de diferenciació, d'un entorn tridimensional adequat per a la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals cap a cardiomiòcits ha millorat la diferenciació aconseguida pel tractament químic de diferenciació en monocapa, s'ha repetit l'anàlisi genètic a partir de la tècnica de la RT-PCR i morfològic que s'ha realitzat anteriorment amb els nous cultius polimèrics, als que es compararan amb els cultius anteriors realitzats en monocapa.

Els marcadors genètics utilitzats per a aquest anàlisi genètic són els mateixos que anteriorment en els cultius en monocapa, és a dir, el GAPDH, la Desmina, l' α -actina, la Troponina T cardíaca i la β -MHC.

Un cop comprovat que no hi ha hagut degradació de l'RNA de les mostres, s'han realitzat les RT-PCRs amb els corresponents gels d'agarosa. En aquest cas però, per a poder realitzar una millor comparació entre els diferents cultius realitzats, s'han organitzat els gels per cada un dels marcadors. Els resultats s'han representat a continuació a la figura 6.60 pel GAPDH, a la figura 6.61 per a la Desmina, a la figura 6.62 per a la α -actina, a la figura 6.63 per a la Troponina T i finalment a la figura 6.64 per a la β -MHC.



Figura 6.60 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR del GAPDH per a les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca, tant en monocapa com en les dues fibrines usades.



Figura 6.61 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR de la Desmina per a les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca, tant en monocapa com en les dues fibrines usades.

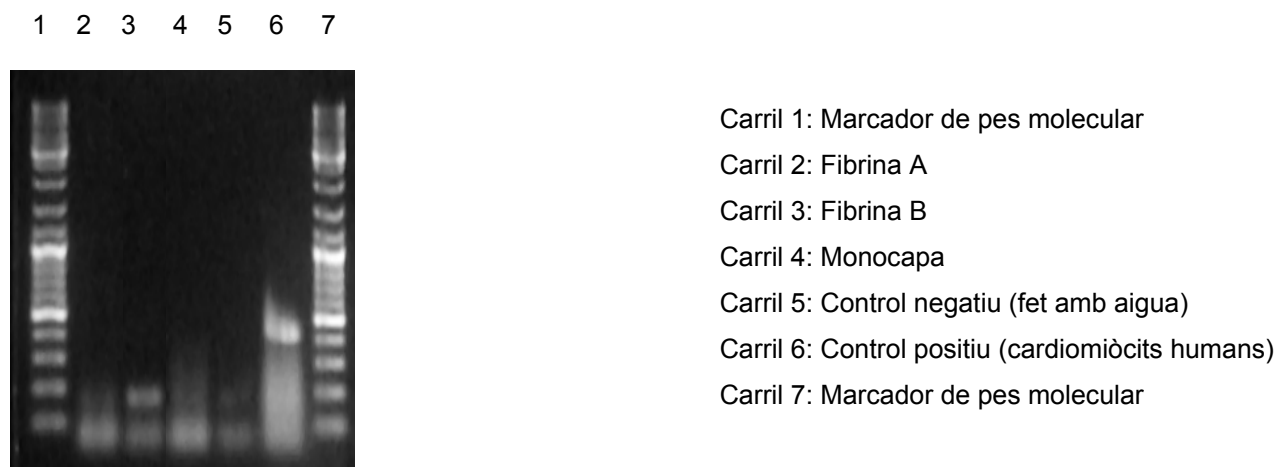


Figura 6.62 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR de la α -actina per a les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca, tant en monocapa com en les dues fibrines usades.



Figura 6.63 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR de la Troponina T cardíaca per a les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca, tant en monocapa com en les dues fibrines usades.



Figura 6.64 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR de la β -MHC per a les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca, tant en monocapa com en les dues fibrines usades.

Tal i com s'esperava al ser un control positiu, amb el gel de la RT-PCR del GAPDH (figura 6.60) s'ha obtingut positiu per a tots els cultius (ambdues fibrines i monocapa) i negatiu pel control negatiu realitzat amb aigua, indicant que les RT-PCR són vàlides. Pel que fa al gel de la RT-PCR de la Desmina (figura 6.64), es pot observar que també han donat positiu tots els cultius realitzats, tant la monocapa (cultiu equivalent a l'apartat anterior) com per a les fibrines, tot i que en el cas de la fibrina A la banda obtinguda és més difusa que per l'altre fibrina i que la monocapa. A més, es pot observar que les bandes coincideixen en alçada a la banda del control positiu realitzat mitjançant RNA de cardiomiòcits humans.

Pel que fa als altres marcadors genètics, la β -MHC (figura 6.64), la Troponina T (figura 6.63) i la α -actina (figura 6.62), es poden observar els mateixos resultats. Aquests, mostren que els marcadors només són positius pel control positiu efectuat amb RNA de cardiomiòcits humans amb la banda corresponent a

l'alçada teòrica, mentre que pels cultius en monocapa i en les fibrines no es pot observar cap banda equivalent a la del control positiu, només es poden observar unions inespecífiques dels oligonucleòtids pel gel de la β -MHC i de la α -actina. En total doncs, tal i com ja passava pel cultiu en monocapa, només el marcador de la Desmina dona positiu en aquests cultius, indicant al ser aquest un dels marcadors més primerencs en la diferenciació cap a cardiomiòcits, que la diferenciació obtinguda al final dels 12 dies de cultiu encara es troba a una fase molt inicial.

Per tant, aquests resultats signifiquen que la utilització, durant aproximadament 12 dies de cultiu, d'un entorn tridimensional adequat pel cultiu de cèl·lules mare mesenquimals humanes tractades químicament per a la diferenciació cardíaca no té una repercussió significativa en la diferenciació cel·lular d'aquestes cèl·lules, ja que s'obté el mateix grau de diferenciació (respecte els 4 gens analitzats) que pel cultiu de les mateixes cèl·lules amb el tractament químic de diferenciació, però dut a terme en monocapa (apartat 6.3.2)

El fet que no s'hagi aconseguit cap millora en el grau de diferenciació cardíaca amb la introducció al sistema de cultiu d'un entorn tridimensional adequat com a complement del medi de diferenciació, fa plantejar la incorporació d'un nou factor de diferenciació al sistema. Aquest nou factor escollit és un tipus d'estimulació física, l'estimulació elèctrica, que s'unirà a la estimulació química i a la matriu com a agents diferenciadors. L'aplicació d'estímuls elèctrics té com a funció simular els mateixos senyals elèctrics que les cèl·lules rebrien si es trobessin situades en el seu entorn natural, el cor. Bibliogràficament s'ha demostrat que aquests estímuls ajuden a preservar les funcions contràctils de miòcits en cultiu de diferents orígens, entre els que es troben els humans (Janssen *i col.*·1999), felins (Kato *i col.*·1995) o murins (Berger *i col.*·1994), o bé que indueixen a la activació de gens del procés de diferenciació cardíaca (Genovese *i col.*·2007; Xia *i col.*·1997). Molts grups utilitzen la estimulació elèctrica com a complement de les matrius tridimensionals per aconseguir millores com l'alineació dels cardiomiòcits o el seu sincronisme entre altres aspectes (Cannizzaro *i col.*·2007; Radisic *i col.*·2004; Zimmermann *i col.*·2002).

L'estimulació elèctrica es duu a terme amb un estimulador elèctric bifàsic programable desenvolupat pel grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC. Aquest estimulador, crea una ona bifàsica (voltatge o intensitat) amb uns determinats paràmetres (figura 6.65, dreta) que es dirigeix cap a una placa d'estimulació que permet la estimulació elèctrica simultània de sis cultius cel·lulars diferents (figura 6.65, esquerra). Cal tenir en compte que l'aplicació d'ones elèctriques en el cultiu cel·lular impossibilita la utilització de sistemes de mesura de la impedància elèctrica pel seguiment de la concentració cel·lular present en el cultiu, degut a les interferències que la estimulació produeix al sistema de mesura.

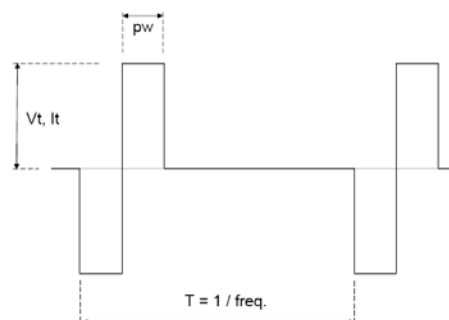
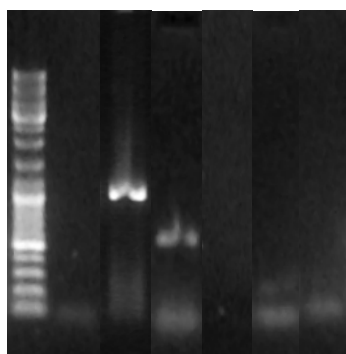


Figura 6.65 Foto (esquerra) de la placa d'estimulació simultània per a 6 cultius cel·lulars en sèrie. Esquema (dreta) de les ones d'estimulació bifàsiques creades per l'estimulador elèctric amb els corresponents paràmetres programables: l'amplada de l'ona (V_t o I_t , segons si la ona creada és de voltatge o intensitat), la durada (pw) i període (T).

Per a la estimulació de les cèl·lules mare mesenquimals humanes, s'utilitza la fibrina B, mentre que els paràmetres escollits de la ona d'estimulació són una amplada de l'ona de 95 mA/cm^2 (cm^2 referits a l'àrea de pas de la intensitat), amb una durada de 5 mil·lisegons i una freqüència d' 1 Hz. Aquests paràmetres han estat escollits a partir de probes amb diferents valors i amb el seguiment del batec de cardiomiòcits adults de rata neonatal inclosos en una matriu de fibrina B com a control de funcionalitat (probes àmpliament desenvolupades a l'apartat 8.5.3.2 de Materials i Mètodes). A causa d'efectes d'acidificació del medi de cultiu deguts a la estimulació elèctrica dels cultius, només s'ha pogut estimular els cultius cel·lulars amb una relació de 6 hores cada dia durant els 12 dies de cultiu.

Per tal de comprovar si s'ha millorat la diferenciació aconseguida fins ara, s'ha repetit l'anàlisi genètic a partir de la tècnica de la RT-PCR dels cultius estimulats un cop s'ha acabat el cultiu, amb el seguiment dels mateixos marcadors que s'han utilitzat fins ara. Els resultats obtinguts es poden observar a la figura 6.66.

1 2 3 4 5 6 7



Carril 1: Marcador
Carril 2: Control negatiu (amb aigua)
Carril 3: GAPDH
Carril 4: Desmina
Carril 5: Troponina T
Carril 6: α -actina
Carril 7: β -MHC

Figura 6.66 Foto del gel d'electroforesi realitzat de la RT-PCR dels diferents gens analitzats, per a les hMSC a les que s'ha efectuat el tractament de diferenciació cardíaca, s'han inclòs en un entorn tridimensional de fibrina (fibrina B) i se'ls ha aplicat un estimul elèctric.

Tal i com es pot veure, altre cop només ha donat positiu el marcador genètic per desmina i, per tant, tampoc s'ha aconseguit un millor grau de diferenciació amb la incorporació de l'estimulació elèctrica com a agent diferenciador als ja utilitzats fins a aquest moment.

Tal i com s'ha realitzat anteriorment amb l'anàlisi de la diferenciació química en monocapa, per acompanyar l'estudi genètic s'ha efectuat un seguiment morfològic dels cultius en fibrina al llarg dels 12 dies de cultiu, mitjançant observacions en el microscopi de contrast de fase en tres moments diferents al llarg del cultiu, seguint que s'ha comparat a l'obtingut pel cultiu de les cèl·lules en monocapa. Al no existir diferències morfològiques entre els cultius estimulats i els no estimulats, només s'han representat les fotos corresponents als cultius estimulats en els diferents moments del cultiu. Els resultats es poden observar a la figura 6.67.

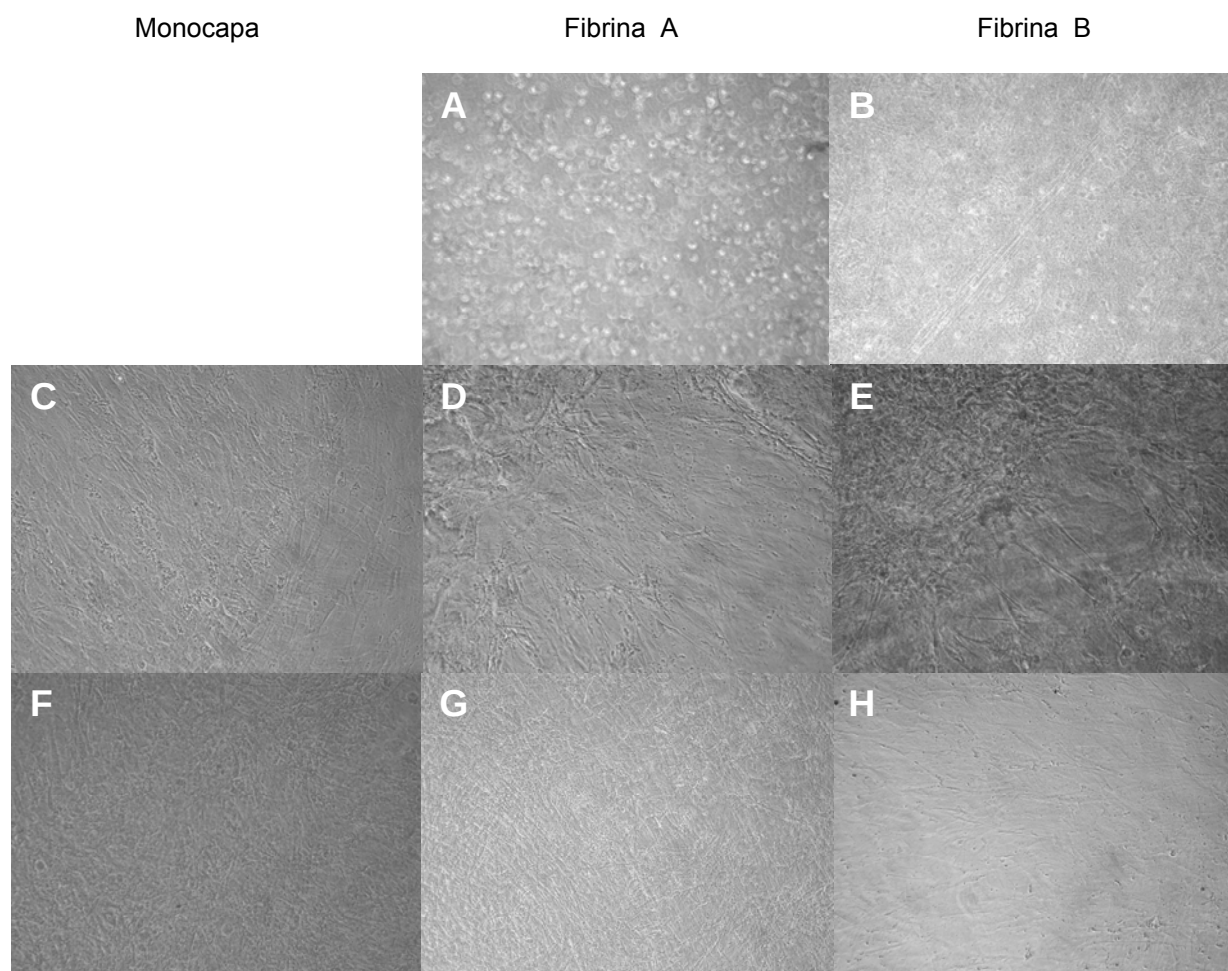


Figura 6.67 Fotos dels cultius d'hMSC tractades per a la diferenciació a cardiomiòcits efectuats en monocapa (fotos C i F), efectuats en fibrina A (fotos A, D i G) i efectuats en fibrina B (fotos B, E i H). Les fotos s'han realitzat al 1er dia de cultiu (fotos A i B), al 9è dia de cultiu (fotos C, D i E) i finalment al final del cultiu (12è dia, fotos F, G i H).

El primer conjunt de fotos (A i B) correspon al primer dia de cultiu on les cèl·lules que estan dins de la fibrina encara no han tingut temps d'adherir-se correctament i agafar la morfologia allargada que tenen les

cèl·lules quan es troben correctament adherides a una superfície, de manera que encara es troben amb una morfologia esfèrica. Amb aquest conjunt de fotos, es pot observar que la fibrina A (foto A) és pràcticament transparent, de manera que es poden veure perfectament les cèl·lules arrodonides del seu interior, mentre que la fibrina B (foto B) és més translúcida, de manera que les cèl·lules no es poden veure tant clarament. Aquesta diferència es dona per la diferència de les densitats de les dues fibrines, densitat significativament superior per a la fibrina B i, per tant, menys transparent que la fibrina A. Com que encara no es troben amb una morfologia natural segons l'entorn en el que es troben no es fa necessària la comparació amb el cultiu en monocapa.

El segon conjunt de fotos (C, D i E) corresponen als cultius al novè dia de cultiu, en el que es pot observar en els cultius efectuats amb les fibrines (fotos D i E pels cultius de fibrina A i B respectivament), que les cèl·lules ja tenen una morfologia allargada i que a part de mantenir l'estructura tridimensional, comencen a alinear-se les cèl·lules entre elles. Per altra banda, si s'observen els cultius de les cèl·lules en monocapa (foto C), es pot veure que ja es troben formant una capa uniforme de cèl·lules allargades al llarg de tota la superfície de cultiu en la que les cèl·lules es troben bastant alineades entre si.

Finalment, al 12è i últim dia de cultiu (conjunt de fotos F, G i H) es pot observar com el cultiu en monocapa (foto F) continua formant una capa uniforme en tota la superfície del cultiu i amb les cèl·lules alineades entre elles, mentre que en el cas dels cultius de fibrina A (foto G) i fibrina B (foto H), les cèl·lules han començat a migrar dels polímers de manera que també es troben formant una capa uniforme de cèl·lules alineades a la resta de superfície de cultiu. A més, gairebé no es pot observar on acaba el polímer de fibrina, amb la corresponent estructura tridimensional, ja que aquest ha estat degradat significativament per les cèl·lules (utilitzant-lo de substrat) disminuint el volum de l'estructura i, on abans hi havia els extrems del polímer, ara hi ha l'esmentada continuació de cèl·lules en monocapa.

Així doncs, amb l'estudi morfològic, s'ha pogut observar que les cèl·lules han tardat més temps que en monocapa a adherir-se correctament al polímer, tot i que al 9è dia de cultiu les cèl·lules es trobaven amb una morfologia similar on les cèl·lules es troben allargades i alineades entre elles, tant pel cultiu en monocapa com pel cultiu en fibrina. Finalment al 12è dia de cultiu, no es poden observar diferències clares entre els cultius en monocapa i en fibrina, ja que ambdós tipus de cultius han acabat formant una capa uniforme de cèl·lules alineades al llarg de la superfície de creixement.

Per tant, amb l'estudi morfològic tampoc s'han observat diferències clares, al final dels 12 dies de cultiu, entre els cultius de cèl·lules mare mesenquimals humanes amb tractament químic de diferenciació

cardíaca efectuats en monocapa dels efectuats en polímers de fibrina. Així doncs, per tal de poder seguir amb l'estudi de diferenciació cardíaca i, abans de passar a la introducció del polímer amb les hMSC en un model animal, és necessària més recerca bàsica pel que fa a la diferenciació cap a cardiomiòcits. Tot i no haver obtingut un grau de diferenciació cardíaca en les cèl·lules mare mesenquimals humanes, i degut a la complexitat del procés escollit pel monitoratge de la concentració cel·lular, es dona per conclòs el seguiment d'aquest procés de diferenciació cardíaca de les cèl·lules mare mesenquimals humanes.

6.4 ANÀLISI DEL SISTEMA DE MONITORATGE EN LÍNIA EN CULTIUS TISSULARS

Els resultats obtinguts pel monitoratge en línia de la concentració cel·lular en aplicacions de cultius tissulars es poden separar en dues parts. Per una banda, en aplicacions de teràpies tissulars per a la regeneració condrocitària, el monitoratge del pH del medi de cultiu ha resultat una eina molt adequada per a l'estimació de la concentració cel·lular, que ha permès aportar una informació útil pels cultius cel·lulars realitzats. D'aquesta manera, s'ha pogut efectuar el seguiment de la concentració cel·lular en línia durant un procés d'expansió de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella, així com els diferents processos en els que s'ha anat introduint cada un dels diferents pilars bàsics de l'enginyeria tissular, primerament amb un agent de diferenciació cel·lular químic i, finalment, de l'aportació al sistema de cultiu d'un entorn tridimensional òptim per a la diferenciació condrocitària.

A més, a través d'un estimulador mecànic per a la mesura d'esforços respecte la compressió s'ha pogut realitzar la tria del polímer amb les característiques idònies per a la diferenciació condrocitària (polímer de PLGA) i, amb el seguiment de la densitat òptica del medi de cultiu, s'ha pogut seguir i controlar el procés de colonització de les cèl·lules al polímer escollit.

Per altra banda, en aplicacions de teràpies tissulars per a la regeneració cardíaca, el monitoratge del pH del medi de cultiu ha resultat massa poc sensible per a l'estimació de la concentració cel·lular, degut a la menor activitat cel·lular obtinguda amb les cèl·lules mare mesenquimals humanes. Per tant, per poder obtenir una mesura de la concentració cel·lular en línia, s'ha retornat a l'ús de sistemes de mesura directa de la concentració cel·lular, concretament al sistema desenvolupat anteriorment basat en la bioimpedància. Amb aquest sistema de monitoratge en línia, s'ha pogut efectuar el seguiment de la concentració cel·lular durant un procés d'expansió de les cèl·lules mare mesenquimals humanes, així com els diferents processos en els que s'ha anat introduint cada un dels diferents pilars bàsics de l'enginyeria

tissular, primerament amb un agent de diferenciació cel·lular químic i, finalment, de l'aportació al sistema de cultiu d'un entorn tridimensional òptim per a la diferenciació cardíaca.

A més, amb la utilització d'un estimulador elèctric per a l'aplicació d'ones elèctriques bifàsiques s'han pogut determinar les propietats dels estímuls elèctrics necessaris per a promoure la diferenciació cardíaca, així com la funcionalitat del polímer de fibrina per a la regeneració cardíaca.

Pel que fa al grau de diferenciació obtingut al llarg d'aquest capítol, tant per a la regeneració condrocitària com cardíaca, no s'ha pogut obtenir una línia cel·lular amb el patró genètic desitjat, ni amb la introducció d'un agent químic diferenciador, com d'un entorn tridimensional adequat, tot i els resultats bibliogràfics positius del que es partia (segurament causat per falta de temps de cultiu). Tot i això, s'ha aconseguit el principal objectiu que es perseguia en aquest capítol, de desenvolupar un sistema de monitoratge, en línia, sensible i fiable, de la concentració cel·lular en aplicacions de cultius tissulars, que permeti efectuar el seguiment dels principals processos, així com l'obtenció de paràmetres cel·lulars importants.

CAPÍTOL 7

CONCLUSIONS

De manera global, en aquest treball s'ha efectuat el desenvolupament d'una mesura sensible i robusta de la concentració cel·lular pel seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents. Per dotar la mesura de versatilitat, aquest desenvolupament ha estat enfocat, tant a partir de mesures directes de la concentració cel·lular com a partir de mesures indirectes, dutes a terme mitjançant mesures d'activitat cel·lular. D'aquesta manera, s'ha pogut comprovar el funcionament de la mesura desenvolupada i s'ha pogut efectuar exitosament el seguiment de la concentració cel·lular al llarg de diferents processos pel cultiu de cèl·lules animals adherents, així com en varis models cel·lulars amb necessitats de cultiu diferents.

Les diferents aportacions que s'han obtingut i les conclusions parcials que se n'han extret al llarg d'aquest treball es llisten a continuació.

Pel que fa a la part de desenvolupament i implementació de les mesures en línia de l'activitat i la concentració cel·lular s'han extret les conclusions següents:

- S'ha aconseguit adaptar el sistema de cultiu cel·lular i de monitoratge en minibioreactors pel cultiu de cèl·lules animals adherents, a partir del tractament per plasma de la superfície de creixement dels minibioreactors, que ha permès l'obtenció de creixements cel·lulars suficientment representatius dels creixements obtinguts en sistemes de cultiu cel·lular estàndards per a cèl·lules adherents.
- S'ha aconseguit efectuar seguiments de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals (tant adherents com en suspensió), a partir de mesures de la concentració d'oxigen dissolt en el medi de cultiu mitjançant

sondes polarogràfiques miniaturitzades per a la seva implementació en el sistema de cultiu per minibioreactors. S'han observat problemes de sensibilitat i robustesa de la mesura i, per tant, s'ha decidit evolucionar el sistema de mesura polarogràfic de l'oxigen dissolt cap a un sistema de mesura òptic.

- S'ha desenvolupat una membrana d'etil cel·lulosa i fibra de vidre, que porta inclòs en el seu interior un fluoròfor de ruteni (el Ru(dpp)3(ClO4)2) i que s'adhereix al port òptic dels minibioreactors, que ha permès efectuar mesures òptiques de la concentració d'oxigen amb una bona sensibilitat, robustesa i fiabilitat. Aquesta millora en la mesura de la concentració d'oxigen dissolt ha millorat la fiabilitat de les mesures de les OURs, tot i que continuen essent mesures massa qualitatives. S'ha decidit doncs, passar cap a una mesura directa de la concentració cel·lular per a la obtenció de resultats quantitatius.

- S'ha desenvolupat un sistema de mesura directa de la concentració cel·lular a partir de mesures de bioimpedància (espectroscòpia d'impedàncies) que ha permès el seguiment de la concentració cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents d'una manera fiable i robusta. Amb el sistema de mesures escollit (mesures a 4 fils o l'estimador de concentració cel·lular E2 entre d'altres) s'han minimitzat les interferències externes, permetent el seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents (cèl·lules vero) amb una sensibilitat molt bona i en un rang molt ampli de concentració cel·lular. Tot i això, degut al preu dels muntatges necessaris i la impossibilitat de reutilització dels mateixos, només s'utilitzarà aquest sistema de monitoratge quan no es puguin realitzar seguiments cel·lulars a partir d'altres sistemes més simples.

- Amb la modelització i parametrització de les mesures d'impedància obtingudes en el model de Cole-Cole, s'ha pogut efectuar un seguiment inicial de la morfologia cel·lular d'un cultiu confluent durant un procés de desadheriment cel·lular. Queda palesa la funcionalitat i la sensibilitat d'aquesta mesura. Així doncs, caldrà seguir aprofundint en aquest apartat per tal d'obtenir una mesura robusta de la morfologia cel·lular.

Pel que fa a la utilització dels sistemes de mesura desenvolupats pel seguiment en els processos d'obtenció de cèl·lules de les principals aplicacions dels cultius de cèl·lules animals adherents, s'han extret les fites i conclusions següents:

- Amb el seguiment de l'OUR en cultius de cèl·lules vero, s'ha determinat que aquest tipus de mesura no és suficientment quantitativa pel seguiment de l'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents (falta de sensibilitat), degut a les baixes concentracions de treball d'aquests cultius. Per tant, s'ha decidit

efectuar el desenvolupament d'un sistema alternatiu per a la mesura de l'activitat cel·lular amb suficient sensibilitat pel seguiment de cultius de cèl·lules animals adherents.

- S'ha desenvolupat un sistema de mesura de l'activitat cel·lular basat en el seguiment dels principals substrats i subproductes del metabolisme cel·lular, la glucosa i el làctic. Per qüestions de simplicitat, s'ha optat per a realitzar un seguiment indirecte de les concentracions d'aquests metabòlits a partir del monitoratge en línia de la variació del pH al llarg dels cultius cel·lulars. Per tant, s'ha adaptat un sistema de seguiment del pH desenvolupat en el propi grup d'investigació pel seguiment del pH en cultius de cèl·lules animals en suspensió (Soley·2010).

- Amb el seguiment de l'activitat cel·lular a partir de mesures del pH del medi de cultiu, s'ha pogut realitzar, exitosament i d'una manera quantitativa, el monitoratge de la concentració cel·lular al llarg de diferents processos utilitzat per aplicacions en teràpies cel·lulars com la caracterització del creixement cel·lular en monocapa, la determinació de la toxicitat d'una molècula en cultius cel·lulars i la caracterització del creixement cel·lular quan s'utilitzen suports com a superfície de cultiu. Així doncs, es dona el tema de desenvolupament de mesures en línia de l'activitat i la concentració cel·lular per tancat i es procedeix a provar aquests sistemes en seguiments de cultius efectuats amb diferents línies cel·lulars.

- Per una banda, s'ha comprovat que el monitoratge del pH del medi de cultiu és un sistema adequat per a la mesura de l'activitat (i d'estimació de la concentració cel·lular) en aplicacions de teràpies tissulars per a la regeneració condrocitària. Així, s'ha pogut efectuar exitosament el monitoratge en línia de la concentració cel·lular durant un procés d'expansió de cèl·lules mare mesenquimals d'ovella, així com en els diferents processos en els que s'ha anat introduint cada un dels diferents pilars bàsics de l'enginyeria tissular, primerament amb un agent de diferenciació cel·lular químic i, finalment, amb un entorn tridimensional òptim per a la diferenciació condrocitària. Tot i això, el petit grau de diferenciació obtingut en els cultius tractats per a la diferenciació cel·lular, indica que cal efectuar un estudi complet per a la optimització de la diferenciació cel·lular de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cap a condrocits per tal de poder analitzar el funcionament del sistema de mesura en línia desenvolupats al llarg de tot el procés de diferenciació cel·lular.

- Per altra banda, el monitoratge del pH del medi de cultiu no disposa de suficient sensibilitat per a l'estimació de la concentració cel·lular en aplicacions de teràpies tissulars per a la regeneració cardíaca. Per tant, s'ha retornat a la utilització del sistema de mesura directa de la concentració cel·lular a partir de mesures de bioimpedància desenvolupat anteriorment.

- Amb aquest canvi, s'ha pogut comprovar que el monitoratge de la concentració cel·lular a partir de mesures de bioimpedància és adequat pel seguiment en línia de la concentració cel·lular en les aplicacions de teràpies tissulars. Així, s'ha pogut efectuar exitosament el monitoratge en línia de la concentració cel·lular durant un procés d'expansió de cèl·lules mare mesenquimals humanes, així com en els diferents processos en els que s'ha anat introduint cada un dels diferents pilars bàsics de l'enginyeria tissular, primerament amb un agent de diferenciació cel·lular químic i, finalment, amb un entorn tridimensional òptim per a la diferenciació cardíaca. Altre cop, el petit grau de diferenciació cel·lular obtingut en els cultius tractats per a la diferenciació cel·lular, indica que cal efectuar un estudi complet per a la optimització de la diferenciació cel·lular de les cèl·lules mare mesenquimals humanes cap a cardiomiòcits per tal de poder analitzar el funcionament del sistema de mesura en línia desenvolupats al llarg de tot el procés de diferenciació cel·lular.

En resum, es pot concloure que el sistema de mesura (i estimació) en línia de la concentració cel·lular desenvolupat al llarg d'aquest treball és un sistema idoni pel monitoratge de les principals aplicacions terapèutiques (cel·lulars i tissulars) de cultius de cèl·lules animals adherents. De totes maneres, s'ha observat la necessitat de complementar aquest treball amb un estudi més complet, tant de diferenciació cel·lular per a l'ús del sistema de monitoratge desenvolupat en aplicacions de teràpies tissulars, com en l'altra via de desenvolupament oberta, per a la obtenció d'un sistema de monitoratge en línia de la morfologia cel·lular.

CAPÍTOL 8

MATERIALS I MÈTODES

8.1 LÍNIES CEL·LULARS

En aquest treball, que ha estat enfocat al desenvolupament de tecnologies pel seguiment de la concentració i activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents, s'han utilitzat diverses línies cel·lulars adherents de característiques diferents dependentment del propòsit perseguit. A més, també s'han tingut en compte alguns experiments realitzats amb una línia cel·lular no adherent dut a terme en el propi grup de treball. Aquesta altra línia cel·lular és un híbridoma. A continuació es presenten les característiques de les diverses línies cel·lulars utilitzades.

8.1.1 CÈL·LULES VERO

La línia cel·lular *vero* es va derivar del fetge del mono verd Africà (*Cercopithecus*) per primer cop al 1962 (Yasumura i Kawakita-1963) i és una línia cel·lular adherent establerta (creix indefinidament en cultiu), lliure d'agents adversos i que no forma tumors al nivell de passes utilitzat per a la producció de vacunes. La seva facilitat d'adaptació al creixement en bioreactors sobre microsuports, la concentració cel·lular a la que arriba en cultiu i la sensibilitat demostrada en un ampli espectre de virus diferents, fa que sigui un bon candidat per a la producció de vacunes.

En aquest treball, les cèl·lules *vero* han estat utilitzades com a cas d'estudi per les varies aplicacions industrials en les que s'utilitzen (capítol 5), tant per a teràpies cel·lulars per a l'obtenció de les pròpies cèl·lules, com aplicacions per a teràpies gèniques actuant com a cèl·lules hoste per a infeccions víriques. A part d'utilitzar-la com a cas d'estudi, les característiques de creixement *in vitro* de les cèl·lules *vero*, que

disposa d'una major robustesa i d'una velocitat de creixement de les més ràpides entre les cèl·lules animals adherents, fan que sigui la línia cel·lular òptima per a la realització dels desenvolupaments duts a terme en aquest treball (capítols 3 i 4).

8.1.2 CÈL·LULES MARE MESENQUIMALS D'OVELLA

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment a l'apartat 1.3.1.1, les cèl·lules mare mesenquimals són cèl·lules adultes no diferenciades que resideixen a l'estroma del moll de l'os, que es poden expandir *in vitro* amb certa facilitat, no formen teratomes i presenten una multipotencialitat que permet la seva diferenciació cap a condrocits, osteoblasts, adipòcits, i en tots aquells tipus cel·lulars d'origen mesenquimal. Les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella s'han extret i aïllat (Peris·2007) a partir del moll d'os d'ovelles al departament de cirurgia animal de la facultat de veterinària de la UAB, amb el corresponent permís de la comissió d'experimentació animal de la UAB.

En aquest treball, les cèl·lules mare mesenquimals s'han utilitzat com a cas d'estudi per a aplicacions en l'enginyeria de teixits (capítol 6) i, concretament, les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella en l'apartat d'aplicacions per a la regeneració condrogènica *in-vitro*.

8.1.3 CÈL·LULES MARE MESENQUIMALS HUMANES

En el cas de les cèl·lules mare mesenquimals humanes, les cèl·lules han estat aïllades (Peris·2007) de moll d'os humà proporcionat pel Banc de Sang i Teixits de la Vall d'Hebrón de Barcelona i, en aquest treball, han estat utilitzades en l'apartat d'aplicacions per a la regeneració cardíaca (capítol 6).

8.1.4 HIBRIDOMA

Els tipus d'hibridoma utilitzat és el KB-26.5, que prové de la fusió de cèl·lules de mieloma murines NS1 i limfòcits B murins Balb C. L'hibridoma KB-26.5 produeix una immunoglobulina del tipus IgG₃ contra l'antigen A₁ d'eritròcits. Aquest anticòs monoclonal s'utilitza en la determinació del grup sanguini del sistema AÇBO humà. Aquesta línia cel·lular va ser gentilmente cedida pels laboratoris Knickerbocker SAE (Barcelona).

8.2 MANTENIMENT DE LES LÍNIES CEL·LULARS

Al treballar només amb línies cel·lulars animals adherents, els protocols de manteniment seran els mateixos per a les diferents línies cel·lulars emprades al llarg d'aquest treball. Aquestes línies cel·lulars es

conserven en criotubs congelats en nitrogen líquid a una temperatura de -196°C . En el moment en que s'ha d'iniciar un experiment es descongela un dels criotubs i s'inicia un cultiu en suspensió de les cèl·lules. Cada cultiu pot ésser resseminat consecutivament durant un període no superior a tres mesos.

Si es desitja preservar alguna de les sublínies obtingudes durant el treball es procedeix a la seva congelació i conservació en nitrogen líquid. El manteniment de l'esterilitat en tots aquests processos és d'extrema importància, per aquest motiu cal comprovar regularment l'absència de contaminacions.

8.2.1 CONGELACIÓ

En el procediment per a congelar les línies cel·lulars s'utilitzen els mateixos medis i sèrums que s'utilitzen per als subcultius de les cèl·lules corresponents. Aquests medis base s'anomenen com a "Medi 0" i "sèrum 0" de forma genèrica (medis base i sèrums base segons línia cel·lular a l'apartat 8.3). Per la preparació de cada criotub de cèl·lules congelades els passos a seguir són els que es mostren a continuació. Cal tenir en compte però, que abans de procedir a la congelació de la línia cel·lular és important que les cèl·lules estiguin dins la fase exponencial de creixement i que la viabilitat del cultiu sigui alta ($>90\%$). El procés de congelació consta dels següents passos:

- Es fan créixer les cèl·lules a l'interior d'un flascó de cultiu de 75 o 150 cm^2 segons la línia cel·lular a congelar, fins que la densitat cel·lular aconseguida sigui suficientment elevada, però sense arribar a la confluència del cultiu.
- Es preparen els medis de congelació:
 - MEDI I: Medi 0 amb 10% (v/v) de sèrum 0 (5 ml de sèrum 0 + 45 ml de Medi 0). Es manté a temperatura ambient.
 - MEDI II: Medi 0 amb 10% de sèrum 0 (v/v) i 20% (v/v) de dimetilsulfòxid (DMSO) (1 ml de sèrum 0 + 2 ml de DMSO + 7 ml de Medi 0). Es manté a 4°C .
- Es transfereixen els cultius a congelar (cèl·lules prèviament desenganxades) a tubs de centrifuga de 50 ml estèrils i es centrifuguen a 500 g durant 5 minuts.
- Es descarta el sobrenedant de cada tub, es resuspenen els sediments (pèl·lets) amb un total de 40 ml de medi A i es determinen la concentració i la viabilitat cel·lulars. A partir de la concentració de cèl·lules vives, es calcula el volum amb què caldria resuspendre les cèl·lules després de centrifugar-les per tal de tenir una concentració final de $8 \cdot 10^6$ cèl·lules vives/ml.
- Es centrifuguen els 40 ml a 500 g durant 5 minuts.
- Es llença el sobrenedant i es resuspèn el pèl·let amb la meitat del volum calculat anteriorment de medi A. Es manté 10 minuts a $0-4^{\circ}\text{C}$.

- S'afegeix l'altre meitat del volum, de medi B (que conté DMSO). El DMSO és un crioprotector que travessa la membrana cel·lular, però és altament tòxic per la cèl·lula. Per això és important que quan s'afegeixi el medi B les cèl·lules es trobin a 0-4°C i que es faci lentament per tal d'evitar l'estrès osmòtic.
- Es transfereix la suspensió de cèl·lules als criotubs, prèviament preparats en una gradeta sobre gel (1 ml de la suspensió per criotub), i es posen ràpidament a -80°C.
- A les 24 hores es transfereixen els criotubs al contenidor de N₂ líquid.

8.2.2 DESCONGELACIÓ

La descongelació ha de ser un procés ràpid per tal d'assegurar una recuperació òptima de la cèl·lula. El procés de descongelació consta dels següents passos:

- Es preparen els medis de descongelació:

MEDI III: Medi 0 amb 20% (v/v) de sèrum 0 (4 ml de sèrum 0 + 16 ml de Medi 0). Es reparteixen 10 ml d'aquest medi en 2 tubs de centrífuga estèrils i es posen a 37°C.

MEDI IV: Medi 0 al 10% (v/v) de sèrum 0 i es manté a 37°C.

- S'agafa un criotub del congelador de nitrogen líquid i es posa a l'incubador a 37°C. És important que la suspensió cel·lular no es deixi més temps del necessari per a descongelar-se ja que el medi de congelació porta DMSO, que és tòxic per a les cèl·lules.
- Quan el contingut del criotub s'ha descongelat s'afegeixen unes gotes dels 10 ml de medi III preescalfat a 37°C, s'homogeneïtza la suspensió cel·lular amb una pipeta estèril i es transvasa tot el contingut al tub de centrífuga que conté la resta dels 10 ml de medi III.
- Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts i s'elimina el sobrenedant per tal d'eliminar el DMSO que porta el medi de congelació. Es realitza un segon rentat resuspenent les cèl·lules amb els 10 ml de medi III restants.
- Es treu una mostra i es fa un recompte de les cèl·lules vives per tal de comprovar-ne l'estat. Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts.
- S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb el volum de medi IV adequat pel flascó de cultiu de 75 o 150 cm² segons la línia cel·lular a congelada. Es transfereix aquesta suspensió cel·lular a un flascó de cultiu i es manté a 37°C dins l'incubador.

Normalment, els dos primers dies s'observa una davallada de la viabilitat, aquest fet fa necessari canviar diàriament el medi de cultiu durant aquests dos primers dies, per a eliminar les restes de DMSO.

8.2.3 MANTENIMENT DE LES LÍNIES CEL·LULARS EN CULTIU

Una vegada es disposa de la línia cel·lular descongelada, les cèl·lules es cultiven en flascons de 25 a 150 cm² durant un període màxim de tres mesos. En el cas de cultiu de cèl·lules mesenquimals de moll d'os no s'aconsella la utilització de flascons de 25 cm², ja que la superfície d'adhesió és massa petita. L'inòcul utilitzat és de 1-2·10⁴ cèl·lules vives/cm² per a les cèl·lules vero, de 4-6·10³ cèl·lules vives/cm² per a les cèl·lules mesenquimals d'ovella provinents de moll d'os i de 1-3·10³ cèl·lules vives/cm² per a les cèl·lules mesenquimals humanes provinents de moll d'os. Els cultius es ressembren, quan les cèl·lules es troben en plena fase exponencial, en un nou flascó de cultiu i amb els mil·lilitres de medi nou corresponent cada 3-4 dies excepte per a les per a les cèl·lules mesenquimals humanes, amb les que es realitzen alternadament ressembres completes i recanvis de medi sol. D'aquesta manera es proporciona de nou a les cèl·lules tots aquells nutrients que s'estaven exaurint (glucosa, glutamina, altres aminoàcids, vitamines o components del sèrum) i s'eliminen tots aquells subproductes cel·lulars que poden tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula (amoni i lactat que acidifica el medi).

Al cultivar cèl·lules animals adherents, per a la realització de la ressembrança cal provocar el desenganxament de les cèl·lules, i a continuació ja es pot procedir al recompte cel·lular. Un cop s'ha realitzat el recompte cel·lular ja es pot calcular el volum de medi amb cèl·lules que cal centrifugar per a poder obtenir l'inòcul desitjat en el nou cultiu. Aquest càlcul es porta a terme aplicant la següent equació:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot A_2}{C_1} \quad [\text{Eq. 8.1}]$$

on

V₁ és el volum de cultiu vell en mil·lilitres que cal centrifugar,

A₂ és l'àrea del flascó nou al que és realitzarà la ressembrança,

C₁ és la concentració cel·lular recomptada en la solució de cèl·lules desenganxades (en cèl·lules/ml),

C₂ és la concentració cel·lular l'inòcul que es vol tenir en el cultiu nou (en cèl·lules/cm²).

Un cop calculat el volum de medi amb les cèl·lules desenganxades, aquest ja es pot centrifugar a 500g durant 5 minuts, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb el corresponent volum de medi fresc prèviament temperat segons el flascó de cultiu nou i es posa al seu interior. El nou cultiu ja es pot posar a incubar a 37°C , 90% d'humitat i 5% de CO₂.

8.2.3.1 DESADHERIMENT DE CULTIUS DE CÈL·LULES ANIMALS ADHERENTS

En el cas de les cèl·lules adherents, per poder realitzar una ressebra, un recompte cel·lular o simplement poder disposar de les cèl·lules adherides en un flascó, primerament s'ha de desenganxar les cèl·lules de la superfície de creixement. L'ús de tripsina (enzim que degrada les proteïnes d'adhesió), és el mètode més emprat. A continuació es descriu el protocol a utilitzar amb els volums adequats dels medis per a la tripsinització d'un flascó de 25 cm².

- Retirar el sobrenedant.
- Afegir 2 ml de PBS per a rentar el flascó de restes de sèrum (inactivaria l'efecte de la tripsina).
- Afegir entre 0,5 i 1 ml de solució de tripsina (0,05% de tripsina en EDTA) i incubar a 37°C durant uns 5 minuts. S'ha d'anar comprovant visualment si les cèl·lules es desenganxen, per no allargar aquest pas més temps del necessari i evitar que els efectes de la tripsina puguin degradar la membrana de la cèl·lula.
- Un cop desenganxades, afegir el triple de volum de medi amb 10% de sèrum que de solució de tripsina i homogeneïtzar. El sèrum degut al seu alt contingut proteic inhibeix l'efecte de la tripsina sobre les cèl·lules.

8.2.4 CONTROL DE L'ESTERILITAT DELS CULTIUS CEL·LULARS

Les característiques intrínseques dels cultius de cèl·lules animals, velocitats de creixement cel·lular lentes i medis molt rics en nutrients, fan que aquests cultius siguin molt susceptibles a possibles contaminacions. Per aquest motiu, una extremada cura en tots els processos de manipulació i un control regular de l'esterilitat dels cultius són dos factors bàsics per evitar l'aparició de qualsevol contaminació en la línia cel·lular i d'aquesta manera poder realitzar un correcte manteniment de la línia cel·lular.

La contaminació per bacteris, fongs o llevats es comprova regularment observant els cultius directament al microscopi òptic invertit de contrast de fase. En determinades ocasions es pot deduir que hi ha contaminació quan s'observen canvis en el color i terbolesa del medi de cultiu. També és important realitzar un control regular de l'esterilitat dels medis de cultiu i de les diferents solucions emprades durant els experiments com per exemple tripsina, PBS o aigua mili-Q. Per a realitzar aquest control posar uns 2-3 mL del medi o solució que es desitja comprovar en un dels pous d'una placa de 12 pous i incubar a 37°C durant un o dos dies. Després observar el contingut del pou directament al microscopi òptic invertit de contrast de fase. També és convenient realitzar aquesta operació sempre que es cregui que hi hagi hagut un procés de manipulació dubtós de qualsevol de les solucions suposadament estèrils utilitzades.

8.3 MEDIS DE CULTIU

Els medis de cultiu difereixen molt en funció de l'organisme que s'utilitza. Normalment per soques de línies cel·lulars d'animals els medis s'adquireixen ja preparats, bé sigui en format líquid o en pols. Als que es compren en format líquid només els hi resta afegir els suplementos o antibiòtics necessaris, que provenen de solucions estoc estèrils. Pels medis que es compren en pols, només cal pesar la quantitat necessària, addicionar els suplementos o les sals restants en format sòlid corresponents i dissoldre-ho en aigua ultrapura (Milli-Q). La solució s'esterilitza per filtració (filtres de 0,22 µm) dins d'una cambra de flux vertical. El medi és impulsat a través del filtre amb una bomba peristàltica. Finalment s'hi afegeix els suplementos que es disposen en líquid i estèrils. Els medis per cultiu cel·lular disposen en la seva complexa composició de molts nutrients termosensibles, per la qual cosa mai s'esterilitzen per calor.

8.3.1 MEDI BASE PEL CULTIU DE CÈL·LULES VERO

El medi base que s'utilitza pel cultiu de cèl·lules vero és el *Glasgow Minimum Essential Medium* (GMEM). Aquest medi líquid comercial conté les sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement de les cèl·lules animals. La seva composició es detalla a la taula 8.1.

Taula 8.1 Composició del medi base de cultiu de cèl·lules vero, el GMEM.

Components (g/l)					
Sals Inorgàniques		Aminoàcids		Vitamines	
CaCl ₂	0.200	L-Arginine·HC	0.042	Choline Chloride	0.002
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.0001	L-Cystine·2HCl	0.03129	Folic acid	0.002
MgSO ₄	0.09767	L-Glutamine	0.292	Myo-Inositol	0.0036
KCl	0.4	L-Histidine·HCl·H ₂ O	0.021	Niacinamide	0.002
NaHCO ₃	2.75	L-Isoleucine	0.0524	D-Pantothenic acid·½Ca	0.002
NaCl	6.4	L-Leucine	0.0524	Pyridoxal·HCl	0.002
NaH ₂ PO ₄	0.1078	L-Lysine·HCl	0.0731	Riboflavin	0.0002
		L-Methionine	0.015	Thiamine·HCl	0.002
		L-Phenylalanine	0.033		
		L-Threonine	0.0476		
Altres		L-Tryptophan	0.008		
D-Glucose	4.5	L-Tyrosine·2Na·H ₂ O	0.05219		
Phenol Red·Na	0.016	L-Valine	0.0468		

8.3.2 MEDI BASE PEL CULTIU DE CÈL·LULES MESENQUIMALS D'OVELLA

El medi base que s'utilitza pel cultiu de cèl·lules mesenquimals humanes provinents del moll de l'os és el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Aquest medi líquid comercial conté les sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement de les cèl·lules animals. La seva composició es troba detallada a continuació a la taula 8.2.

8.3.3 MEDI BASE PEL CULTIU DE CÈL·LULES MESENQUIMALS HUMANES

El medi base que s'utilitza pel cultiu de cèl·lules mesenquimals humanes provinents del moll de l'os és el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) però, en aquest cas, aquest medi líquid comercial es troba ja suplementat amb 0,11 g/L de piruvat sòdic, a més de les sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines detallades a la taula 8.2.

Taula 8.2 Composició del medi base de cultiu de cèl·lules mesenquimals d'ovella provinents de moll d'os, el DMEM.

Components (g/l)					
Sals Inorgàniques		Aminoàcids		Vitamines	
CaCl ₂	0.200	L-Arginine·HC	0.084	Choline Chloride	0.004
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.0001	L-Cystine·2HCl	0.0626	Folic acid	0.004
MgSO ₄	0.09767	L-Glutamine	0.584	Myo-Inositol	0.0072
KCl	0.4	L-Histidine·HCl·H ₂ O	0.042	Niacinamide	0.004
NaHCO ₃	3.7	L-Isoleucine	0.105	D-Pantothenic acid·½Ca	0.004
NaCl	6.4	L-Leucine	0.105	Pyridoxal·HCl	0.004
NaH ₂ PO ₄	0.109	L-Lysine·HCl	0.146	Riboflavin	0.0004
		L-Methionine	0.030	Thiamine·HCl	0.004
		L-Phenylalanine	0.066		
		Glycine	0.03		
		L-Serine	0.042		
		L-Threonine	0.095		
Altres		L-Tryptophan	0.016		
D-Glucose	1	L-Tyrosine·2Na·H ₂ O	0.10379		
Phenol Red·Na	0.016	L-Valine	0.094		

8.3.4 EL SÈRUM, SUPLEMENT DE MEDIS DE CULTIU PER CÈL·LULES ANIMALS

Entre els fluids biològics que han demostrat tenir més efectes positius per cultivar cèl·lules fora del cos es troba el sèrum. El sèrum és el medi on es troben els eritròcits i leucòcits *in vivo* i per tant no és sorprenent que sigui un suplement excel·lent en els cultius *in vitro* (Maurer·1986). Des dels principis dels cultius

cel·lulars els investigadors han afegit sèrum al medi bàsic de cultiu en una concentració del 1 al 20% (v/v) per fer créixer gairebé tots els tipus cel·lulars (Shacter·1989).

Les principals funcions del sèrum són proveir als cultius d'una sèrie de compostos amb diferents activitats que afavoreixen el creixement cel·lular a partir dels seus precursors i la producció de la proteïna d'interès (Barnes i Sato·1980). Entre aquests compostos del sèrum es destaquen :

- Factors hormonals estimuladors del creixement i de diverses funcions cel·lulars: La majoria d'ells es troben en concentracions de l'ordre de nanograms per ml en el sèrum. Alguns d'ells són específics per a cèl·lules en diferents estadis de diferenciació i d'altres no estan restringits a un sol tipus cel·lular.
- Factors d'adhesió i extensió: Moltes cèl·lules animals s'han d'adherir primer a un determinat substrat i estendre's abans que puguin començar a proliferar i formar una monocapa. Aquest adheriment a un substrat és necessari pel creixement d'algunes, però no de totes les cèl·lules cultivades *in vitro*.
- Proteïnes de transport: L'albumina és l'exemple més clar d'aquest tipus de proteïnes; donada la seva càrrega negativa s'uneix a àcids grassos lliures, vitamines, lípids i hormones entre d'altres, i transporta aquestes molècules entre els teixits i les cèl·lules tant *in vivo* com *in vitro*.
- Elements traça: El paper de varis elements traça inorgànics ha estat només parcialment estudiat però molts actuen com a cofactors d'enzims.
- El sèrum té una capacitat tamponadora important, bàsicament deguda a la presència d'albumina.
- Inhibidors específics de proteases: Aquests protegeixen a les cèl·lules de les proteases afegides al medi per subcultivar cèl·lules adherents, així com de les proteases alliberades per la pròpia cèl·lula.
- Agents estabilitzadors i detoxificadors del cultiu: Alguns components del sèrum poden unir-se i detoxificar metalls pesats o compostos orgànics que es puguin trobar en el medi.
- Protectors davant l'esforç tallant: El sèrum proporciona proteïnes que tenen un efecte protector físic sobre les cèl·lules que creixen en suspensió davant les forces tallants (Papoutsakis·1991). L'albumina sembla ser la principal responsable de la protecció davant les forces tallants en el cultiu, tot i que substàncies que són difícils de separar de l'albumina també hi podrien intervenir.

A més dels components que s'han descrit a l'apartat anterior, el sèrum conté també una àmplia varietat de components, components que o bé estan poc caracteritzats, o encara no s'han identificat. Tot i aquest gran nombre de components presents al sèrum, sembla que només molt pocs són realment essencials (Glassy i col·l·1988).

Aquesta variabilitat de components i factors presents en els sèrum fa que el creixement de cada línia cel·lular es pugui veure influenciat de diferents maneres, no només per el tipus de sèrum utilitzat, sinó que el propi lot del sèrum també pren molta importància. Això fa que per a la utilització de un lot diferent de sèrum, se n'hagi de testar el creixement. A la taula 8.3 es mostren els tipus de sèrum utilitzats per a les diferents línies cel·lulars cultivades.

Taula 8.3 Sèrums corresponents pel cultiu de les diferents línies cel·lulars utilitzades.

Línia cel·lular	Sèrum
Vero	10% Foetal Bobine Serum
Mesenquimals de moll d'os humanes	10% Sèrum AB humà
Mesenquimals de moll d'os d'ovella	10% Foetal Bobine Serum
Mesenquimals de moll d'os humanes	5% Horse Serum

8.3.5 MEDI DE DIFERENCIACIÓ CONDROGÈNICA

Al llarg del capítol 6, d'aplicacions en l'enginyeria tissular, concretament en la regeneració condrogènica, s'utilitza un medi especial per la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals d'ovella cap a condrocits d'ovella. Aquest medi, que s'ha d'utilitzar al llarg de tots els dies de creixement en el cultiu que es vulgui tractar, es troba format per la següent composició:

Taula 8.4 Composició del medi de diferenciació condrogènica.

Components	concentració final (volum)
Medi base + 10% sèrum	(974ml)
Dexamethasone 100x	10^{-4} M (1ml)
Ascorbic Acid 100x	50 mg/ml (1ml)
Pyruvate Na 10x	100 µg/ml (10 ml)
L-Proline 100x	40 µg/ml (1 ml)
TGF-β1 50x	10 ng/ml (2 ml)
ITS+1 10x	10 µg/ml (10 ml)
Penicilin-streptomycin 100x	100 U i 100 µg/ml (1 ml)

8.3.6 MEDI DE DIFERENCIACIÓ CARDÍACA

Al llarg del capítol 6, d'aplicacions en l'enginyeria tissular, concretament en la regeneració cardíaca, s'utilitzen uns medis especials per la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals humanes cap a miocardiocits humans. Hi ha un primer tractament de les cèl·lules amb un medi de diferenciació amb el que es mantén el cultiu durant 24 hores. Un cop passades les 24 hores, ja es pot arrencar el cultiu, utilitzant al

llarg d'aquest un altre medi anomenat medi de post-diferenciació. La composició d'aquests medis es pot observar a la taula 8.5.

Taula 8.5 Composició dels medis de diferenciació i de post-diferenciació cardíaca.

Components i composició		
Component	Medi de diferenciació	Medi de post-diferenciació
Medi Base	Medi base +10% sèrum	Medi base +10% sèrum
Horse Serum (HS)	+ 5%	+ 5%
5-azacytidine	10 μ mols/l	-
amphotericin	0,25 mg/l	-
bFGF	10 μ g/l	10 μ g/l

8.4 SISTEMES DE CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS

Al llarg del treball, els cultius de cèl·lules animals adherents s'han efectuat en diferents equips de cultiu descrits a continuació. Es poden diferenciar en dos grups bàsics, els sistemes comercials de cultiu estàtic, utilitzats pel cultiu rutinari de les diferents línies de cultiu i també com a cultius control amb mesures fora de línia dels experiments realitzats i els sistemes de cultiu per minibioreactors, utilitzats pel monitoratge dels cultius cel·lulars en els diferents experiments.

8.4.1 SISTEMES COMERCIALS DE CULTIU ESTÀTIC

Són sistemes estàndards pel cultiu tant de cèl·lules animals en suspensió com de cèl·lules animals adherents. En el cas de les cèl·lules animals adherents, el volum de treball de medi ve donat a partir la relació de 1 mil·lilitre per cada 3 cm² de superfície de cultiu. Dins dels sistemes comercials de cultiu estàtic, se n'utilitzen de diferents tipus al llarg del treball segons la utilitat desitjada, tal i com es descriu a continuació:

Els flascons de cultiu de poliestirè que s'utilitzen ja s'adquireixen estèrils. S'empren models diferents segons la superfície de cultiu: els de 25, 75 i 150 cm² segons la quantitat desitjada de cèl·lules i la seva grandària. La presència d'un filtre de 0.22 μ m de diàmetre de porus en el tap dels flascons permet el control del pH mitjançant l'intercanvi de gasos amb l'atmosfera controlada de CO₂ de l'incubador. Aquests flascons s'han utilitzat bàsicament per mantenir les ressembres de les línies cel·lulars, i realitzar els escalats de les cèl·lules a partir de què es preparen els inòculs per als diferents experiments.

Les plaques de 6 pou, que es subministren estèrils, són de poliestirè d'alta qualitat i baixes en toxines i disposen d'una superfície de creixement per cèl·lules adherents de 8,92 cm². Han estat utilitzades pels creixements control en els experiments, per a la realització de recomptes cel·lulars fora de línia. Les condicions d'ús estàndard utilitzades per a les plaques de 6 pous en els experiments són la utilització de 3 ml del medi de cultiu corresponent segons la línia cel·lular utilitzada i situada a l'interior d'un incubador que manté una temperatura de 37°C i una atmosfera controlada d'aire amb CO₂.

Les plaques de petri individuals, que es subministren estèrils, són de poliestirè d'alta qualitat i baixes en toxines i disposen d'una superfície de creixement tractada per cèl·lules adherents de 8,92 cm². Han estat utilitzades pel creixement de controls en els experiments per a la realització de recomptes cel·lulars fora de línia, però també han estat utilitzades per a muntatges inicials pel desenvolupament de les mesures de concentració cel·lular en línia, així com per a l'estimulació elèctrica, amb la incorporació de microelèctrodes per a la mesura d'impedància i d'elèctrodes de platí respectivament. També s'utilitzen a l'interior d'un incubador.

8.4.2 SISTEMES DE CULTIU DINÀMIC: MINIBIOREACTORS

Els minibioreactors són sistemes de cultiu d'un sol ús fabricats amb poliestirè cristall, que s'esterilitzen mitjançant rajos γ a 20-25 kGy, l'àrea útil pel cultiu de cèl·lules adherents és de 7,07 cm² i tenen un volum de treball de fins a 15 ml. Aquest sistema de cultiu, no només permet realitzar els cultius de cèl·lules animals adherents, sinó que a la vegada permet l'adequació de sondes pel monitoratge dels paràmetres clau dels cultius cel·lulars. Això fa que els dissenys hagin anat variant al llarg del treball. Les especificacions bàsiques inicials dels minibioreactors (figura 8.1) són les següents:

- Sèptum: utilitzat per a efectuar la seva inoculació a través d'un xeringa amb el medi corresponent.
- Port polarogràfic: utilitzat per a la mesura d'oxigen dissolt en el medi.
- Filtres pel bescanvi de gasos mitjançant aeració per capçal: utilitzat per a les mesures d'OUR, on es realitzen addicions de nitrogen per a la presa de mesures en l'OUR, i addicions d'aire amb 5% de CO₂, per a la recuperació de la concentració d'oxigen.
- Port òptic: utilitzat en cultius de cèl·lules animals en suspensió pel seguiment en línia de la densitat òptica dels cultius, així com el monitoratge del pH a partir del seguiment òptic del viratge del roig de fenol degut a la variació del pH del medi de cultiu.
- Mosca d'agitació pel manteniment de l'homogeneïtat del medi de cultiu.

Al llarg del treball, les necessitats de cultiu i monitoratge han anat variant, de manera que el disseny s'ha anat evolucionat per a la incorporació de sondes i sistemes d'actuació (figura 8.1). La primera de les modificacions, tal i com ja s'ha comentat anterior a l'apartat 3.4 (figura 3.9), consisteix en la incorporació d'un sistema d'agitació pendular (figura 8.1, n° 5) que permeti l'homogeneïtzació del medi de cultiu sense l'estrès cel·lular que crea una barra magnètica.

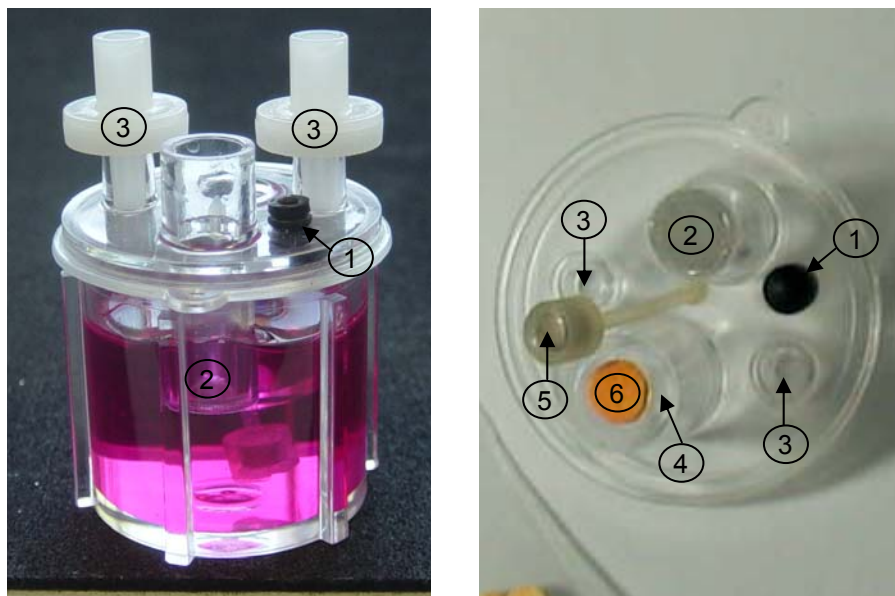


Figura 8.1 Fotografies dels minibioreactors amb les modificacions efectuades, primer amb un sistema d'agitació pendular (esquerra) i després amb la substitució del port polarogràfic per un altre d'òptic amb la membrana sensible a l'oxigen adherida a la seva base. 1) sèptum. 2) port polarogràfic. 3) entrada i sortida d'aire. 4) port òptic. 5) sistema agitació pendular. 6) membrana sensible a l'oxigen per a la mesura òptica del mateix.

La segona modificació que s'ha efectuat, tal i com ja s'ha comentat anteriorment a l'apartat 3.6, es basa en la substitució de la mesura polarogràfica de l'oxigen dissolt per una mesura òptica del mateix i, per tant, de la substitució del port polarogràfic per un altre port òptic amb la membrana sensible a l'oxigen adherida a la seva base (figura 8.1, n° 6).

8.4.3 EQUIP DE MONITORATGE I CONTROL DEL CULTIU: HEXASCREEEN

A diferència dels sistemes de cultiu estàndard de cèl·lules animals, que s'utilitzen a l'interior d'un incubador per mantenir unes condicions constants de temperatura i pH (atmosfera d'aire amb 5%de CO₂), pels cultius en minibioreactors s'utilitza un Hexascreen ® com a equip de monitoratge i control (figura 8.2, esquerra). Aquest equip, utilitza un plàstic de cultiu de 6 minibioreactors (figura 8.2, dreta) situats en una cavitat comuna que s'utilitza com a bany per a mantenir els minibioreactors a temperatura constant un cop aquesta cavitat es troba plena d'aigua ultrapura. L'Hexascreen ® és l'encarregat de mantenir una temperatura constant d'aquest bany, que es troba agitat per una millor homogeneïtzació, així com de

mantenir una atmosfera d'aire amb 5% de CO₂ als capçals dels minibioreactors, mitjançant el pas d'un cabal d'aire amb el 5% de CO₂ (barreja comercial), seqüencialment pels 6 minibioreactors.

A la vegada de mantenir aquestes condicions estàndards de cultiu, exposades més detalladament a continuació, l'equip de cultiu permet el monitoratge en línia de la temperatura mitjançant una sonda situada al bany comú, mentre que per a cada un dels minibioreactors permet efectuar el monitoratge de l'oxigen dissolt en el medi a partir de la mesura de fluorescència desenvolupada al llarg del capítol 3, del pH a partir de la mesura òptica desenvolupada al llarg del capítol 5, així com de la densitat òptica a partir de la mateixa sonda òptica de mesura del pH. A més, l'equip permet efectuar mesures d'OUR (apartat 8.7.1) en els períodes de temps indicats.

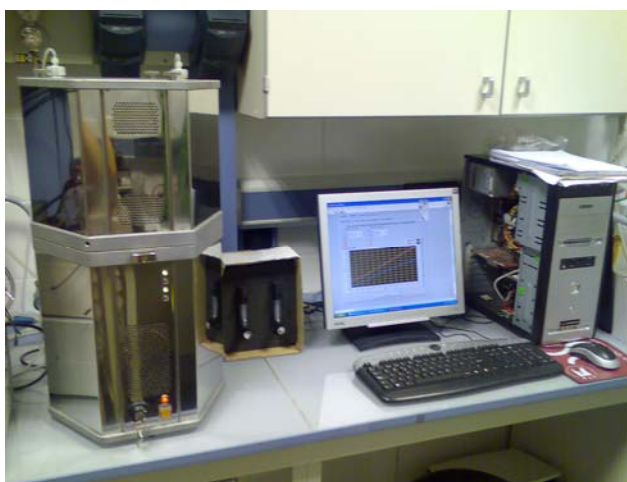


Figura 8.2 Fotografies del sistema de monitoratge i control del cultiu de cèl·lules animals Hexascreen® (esquerra), amb el corresponent plàstic de cultiu de 6 minibioreactors (dreta).

8.4.3.1 CONDICIONS D'ÚS ESTÀNDARD

Tal i com s'ha comentat al llarg d'aquest treball, s'han utilitzat unes condicions d'ús estàndard pel cultiu de cèl·lules animals adherents en minibioreactors. Aquestes condicions utilitzades són d'un volum útil de medi de 13ml per minibioreactor, medi que es troba homogeneïtzat a través d'una agitació de 150 rpm. A més, es manté una temperatura constant de 37°C, així com una atmosfera d'aire amb el 5% de CO₂, mantinguda mitjançant polsos de 10 segons de durada d'una barreja comercial d'aire amb el 5% de CO₂ i actuats cada 250 segons amb un cabal de 200 litres per minut (lpm). Per a la mesura de la OUR (en el cas que es dugui a terme) es manté una atmosfera de nitrogen al capçal del minibioreactor mitjançant polsos de nitrogen comercial de 10 segons de durada actuats cada 60 segons al llarg de la mesura de la OUR, amb un cabal de 400 lpm.

En el cas de treballar amb microcàrrers, les condicions de cultiu estàndard són els 13 ml de medi de cultiu, el minibioreactor es troba tractat per a la no-adherència cel·lular (activació de la superfície per plasma) i una agitació de 250 rpm pel manteniment dels microcàrrers en suspensió. El protocol d'adhesió cel·lular i colonització dels microcàrrers es realitza amb 5ml de medi de cultiu i 2ml de solució concentrada de microcàrrers i consta de polsos d'agitació a 200 rpm de 1,5 minuts efectuats cada 30 minuts i durant 5 hores. Un cop acabada la colonització, es retira 5 ml de medi de cultiu (separació per decantació dels microcàrrers) i s'afegeix la resta de medi de cultiu restant (11 ml de medi fresc).

8.5 EQUIPS DE MESURA

Al llarg d'aquest treball, s'ha anat utilitzant varis equips de mesura al llarg del desenvolupament de les diferents mesures que s'han anat implementant, així com d'altres equips d'actuació sobre els cultius cel·lulars. A continuació es realitza una breu descripció de cada un dels equips utilitzats al llarg del treball.

8.5.1 EQUIP DE MESURA D'OXIGEN DISSOLT PER DESMODULACIÓ COHERENT

Per a fer la lectura dels apartats de resultats i discussió més fàcil i entenedora, s'ha trobat interessant efectuar la descripció de l'equip dins de l'apartat de resultats i discussió corresponent (mesura de la l'activitat cel·lular), concretament a l'apartat 3.8.3.

8.5.2 EQUIP DE MESURA DE LA IMPEDÀNCIA

Per a fer la lectura dels apartats de resultats i discussió més fàcil i entenedora, s'ha trobat interessant efectuar la descripció de l'equip dins de l'apartat de resultats i discussió corresponent (mesura de la concentració cel·lular: espectroscòpia d'impedància), concretament a l'apartat 4.4.1.

8.5.2.1 CONDICIONS D'ÚS ESTÀNDARD

Les condicions d'ús estàndard de l'analitzador d'impedàncies HP4192A per a l'adquisició de dades i mesura de la impedància en els cultius cel·lulars monitorats són la realització d'escombrats de freqüències 10 kHz i 10 MHz, amb 31 punts de freqüències espaiats logarítmicament (10 punts per dècada). Augmentar el rang de l'escombrat no té interès, ja que els extrems escollits ja es troben en zones on l'error de mesura comença a augmentar considerablement. En el cas del monitoratge de creixements cel·lulars, els 31 punts de freqüència s'obtenen del promig de 10 escombrats consecutius. Les mesures es realitzen a 0,3V i cada 15 segons per a les simulacions per sedimentació de cèl·lules i durant la optimització de la mesura (estabilitat, fiabilitat, efecte dels paràmetres de cultiu...), mentre que pel seguiment dels cultius, l'espai de temps entre mesures és de 900 segons.

8.5.3 EQUIP D'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA

Per a fer la lectura dels apartats de resultats i discussió més fàcil i entenedora, s'ha trobat interessant efectuar la descripció de l'equip dins de l'apartat de resultats i discussió corresponent (aplicacions a la teràpia tissular), concretament a l'apartat 6.3.3.2.

8.5.3.1 ELÈCTRODES DE PLATÍ

Per a poder estimular cultius cel·lulars, cal la construcció d'uns elèctrodes de platí, que abracin tot el polímer amb les cèl·lules i que es puguin col·locar a l'interior del sistema de cultiu cel·lular. Per tal de poder fer uns elèctrodes més robusts i reproduïbles, a més de possibilitar la seva esterilització per diferents mètodes, s'ha construït una base de tefló a on es posaran les espirals del fil de platí (figura 8.3).

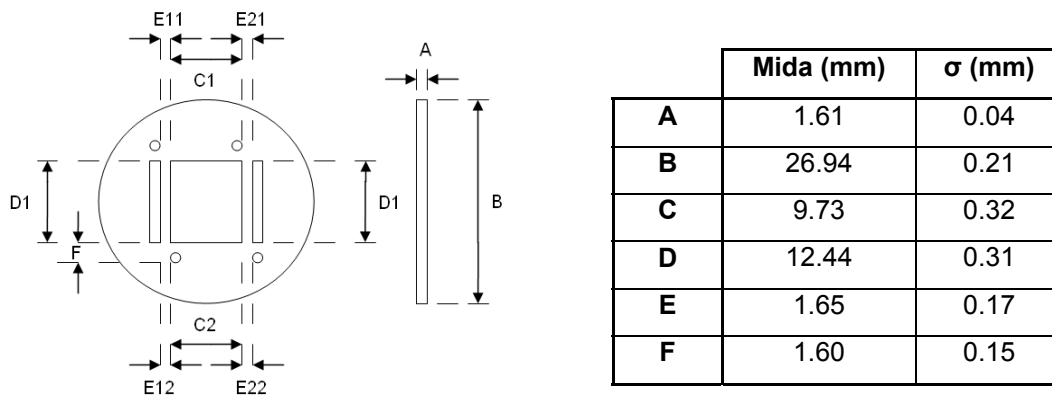


Figura 8.3 Diagrama de la base de tefló utilitzada per a la construcció dels elèctrodes de platí de l'estimulador elèctric. La taula indica les mides (amb la corresponent desviació estàndard) de les cotes marcades en el diagrama.

Un cop es disposa de la base de tefló, es munten els elèctrodes de platí a partir d'un fil de platí de 0,25 mm de diàmetre i 167,5 mm de llarg (àrea de 131.6 mm² de platí) per a cada un dels elèctrodes, fil que es col·loca en espiral (30 voltes) al voltant de les barres de tefló de la base i subjectat a través dels forats efectuats a la base. Amb aquesta configuració dels elèctrodes, s'obté una resistència mitjana dels estimuladors de 38 ohms (amb desviació estàndard de 6,8 ohms), essent aquest un valor molt petit que permetrà usar voltatges no gaire elevats per a la estimulació dels cultius cel·lulars. Un cop ja es disposa dels elèctrodes d'estimulació ja es poden determinar les característiques de l'ona de l'estimulació necessàries per a obtenir una estimulació òptima dels cultius cel·lulars a estimular.

8.5.3.2 CONDICIONS D'ÚS ESTÀNDARD: PROVES DE FUNCIONALITAT

Així doncs, per conèixer quines són les característiques d'estimulació que permeten controlar els batecs dels cardiomiòcits, s'han d'efectuar diferents proves d'estimulació a partir de variacions en els paràmetres de l'ona d'estimulació, per tal de poder observar els resultats que s'obtenen en el cultiu. Per tal de realitzar

aquestes proves, s'han aplicat diferents ones d'estimulació en un cultiu de cardiomiòcits aïllats (Farré 2008) i inclosos en un polímer de fibrina (protocol a l'apartat 8.7.8 de Materials i Mètodes).

Els paràmetres variables de l'ona d'estimulació són el voltatge total (V_t), la intensitat que circula pel cultiu (al variar el voltatge total també varia la intensitat, I) i l'amplada de l'ona (pw), mentre que la freqüència a la que s'estimula es manté constant a 1 Hz al no ser un factor determinant a l'hora d'induir les cèl·lules a bategar. Una vegada es té el cultiu estimulat amb els paràmetres escollits s'observa, a través d'un microscopi invertit, si el ritme dels batecs dels cardiomiòcits funcionals no presenta arítmies i, per tant, aquests bateguen constantment a 1Hz. Els resultats obtinguts es poden observar a la taula 8.6.

Taula 8.6 Resum de les observacions, del voltatge dels elèctrodes (V_e) i de la intensitat de pas obtingudes per a cada una de les proves d'estimulació elèctrica efectuades sobre un cultiu de cardiomiòcits en fibrina. L'última prova, marcada amb negreta, indica els valors òptims dels paràmetres per a l'estimulació elèctrica de cultius.

nº	Hz	V_t	pw (ms)	V_e (V)	I (mA/cm ²)	observacions
1	1	50	7	35	150	bateguen sense arítmies a 1Hz
2	1	40	7	30	100	bateguen sense arítmies a 1Hz
3	1	30	7	21	90	bateguen amb inici arítmies a 1Hz
4	1	20	7	11	90	bateguen amb algunes arítmies a 1Hz
5	1	10	7	8	20	no bateguen a 1 Hz, totalment espontani
6	1	40	5	31	90	bateguen sense arítmies a 1Hz
7	1	40	3	31	90	bateguen sense arítmies a 1Hz
8	1	40	1	30.5	95	bateguen sense arítmies a 1Hz
9	1	40	5	30.5	95	bateguen sense arítmies a 1Hz

Els resultats obtinguts en aquestes proves mostren un comportament totalment diferent pel que fa als dos paràmetres que s'han anat variant (pw i V_t). Per una banda, tenim que la variació del voltatge total aplicat en el sistema d'estimulació (i, per tant, la intensitat de pas) té una relació forta sobre el ritme de batec dels cardiomiòcits.

D'aquesta manera, mentre que quan s'estimula amb un voltatge total de 50V es pot observar un batec constant a 1 Hz sense cap arítmia, a l'anar disminuint el voltatge total de 50 a 10 V (nº 1-5), es pot observar que apareixen indicis d'arítmies, observades per a voltatges inferiors a 40V. S'ha escollit l'estimulació a 40V, tenint en compte que el fet que la intensitat de pas obtinguda per a la estimulació a 50V sigui un 50% superior a la obtinguda quan s'estimula a 40V, indica que aquesta intensitat de

l'estimulació a 50V es troba àmpliament sobredimensionada, podent crear un estrès cel·lular a llarg termini. Per altra banda, es pot observar que la variació de l'amplitud de l'ona d'estimulació (pw) no afecta al ritme dels batecs dels cardiomiòcits, obtenint per a tots els casos un ritme de batec constant a 1 Hz i sense cap indicati d'arítmia.

8.5.4 EQUIP D'ESTIMULACIÓ MECÀNICA

Tal i com s'ha comentat anteriorment a l'apartat 6.2.2, per tal d'escollir quin és el polímer que presenta millors propietats per a ésser utilitzat en teràpies tissulars, es fa necessària la mesura d'alguna de les propietats físiques com, per exemple, les propietats mecàniques (mòdul d'elasticitat) dels polímers candidats. Així, per tal de mesurar doncs el mòdul elàstic dels polímers candidats, es disposa d'un estimulador mecànic desenvolupat pel grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC (figura 8.4).

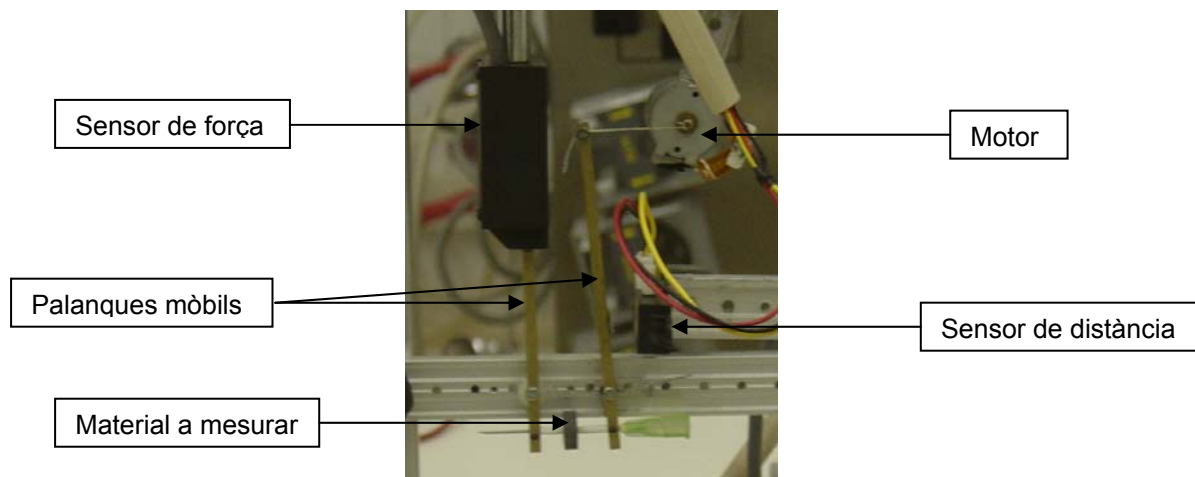


Figura 8.4 Foto de l'equip d'estimulació mecànica.

El seu funcionament es basa en el moviment controlat, a través d'un motor i un sensor de distància, d'una palanca mòbil que comprimeix el polímer a mesurar contra una altra palanca mòbil que es troba en contacte amb un sensor de força. Per tant, amb el seguiment de varis cicles de compressió amb la conseqüent relaxació es poden obtenir els corresponents diagrames de força-compressió i, d'aquesta manera, mesurar el mòdul elàstic del polímer (càlculs exposats posteriorment a l'apartat 8.8.3 de Materials i Mètodes).

8.6 MÈTODES ANALÍTICS

Al llarg del treball, s'han utilitzat varis mètodes analítics que han permès realitzar un anàlisi complet dels resultats que s'han anat obtenint. Els diferents mètodes analítics utilitzats es comentaran a continuació.

8.6.1 ANÀLISI DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR

Per tal de conèixer la concentració cel·lular present en un cultiu de cèl·lules animals adherents, s'utilitza un microscopi invertit de contrast de fases (Nikon, TMS) i un hematocitòmetre (Improved Neubauer Chamber, Brand). L'hematocitòmetre és un portaobjectes amb quatre camps d'un volum de mostra conegut i que contenen setze requadres gravats que faciliten el recompte de les cèl·lules presents a cada camp. El recompte cel·lular dels cultius de cèl·lules animals adherents varia segons la superfície de cultiu a la que es dugui a terme el creixement cel·lular.

8.6.1.1 RECOMPTE DIRECTE

Quan el creixement del cultiu es realitza en monocapa sobre una superfície de cultiu plana, aleshores es pot realitzar una mesura directa del nombre de cèl·lules viables, mortes, totals i el percentatge de viabilitat que presenta el cultiu.

Prèviament a efectuar el recompte cel·lular, s'ha de procedir al desenganxament de les cèl·lules mitjançant el protocol descrit a l'apartat 8.2.3.1, protocol que s'ha de complementar amb un protocol de concentració cel·lular quan es sospita que la concentració cel·lular de la solució contenidora de les cèl·lules és massa petita pel recompte en hematocitòmetre, com per exemple quan ens trobem a estats inicials del creixement, o tenim unes superfícies de creixement petites. Aquest protocol de concentració cel·lular es resumeix a continuació:

- Agafar una quantitat coneguda del medi amb les cèl·lules i traspasar-ho en un eppendorf.
- Centrifugar a 500g durant 5 minuts.
- Aspirar el sobrenedant i resuspendre-ho en un volum petit conegut.

Un cop es té una solució cel·lular adequat ja es pot procedir al recompte de la concentració cel·lular. Per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, aquestes es tenyeixen amb una mescla 1:1 d'una dissolució de blau de tripà (Sigma, T8154) diluïda al 0.2% (v/v) en PBS 0.1 M a pH 7.4 o NaCl 0.9% (p/v). El colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes i els dona un color blavós. Per contra, les cèl·lules vives es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant. Per realitzar l'observació al

microscopi doncs es barregen 75 µL de mostra del cultiu amb 75 µL de blau de tripà al 0.2% (v/v). Una gota de la dilució es diposita a la zona de recompte de l'hematocitòmetre i es cobreix amb un cobreobjectes.

A continuació es realitza el recompte de cèl·lules viables i mortes en cada un dels quatre camps. Els dos valors superior i inferior obtinguts, es rebutgen, mentre que dels altres dos se'n fa la mitjana. El càlcul de la concentració de cèl·lules present al cultiu es realitza mitjançant la següent fórmula:

$$[\text{Cèl·lules/ml}] = \frac{\frac{n_1 + n_2}{m}}{d \times V} = (n_1 + n_2) \cdot 10^4 \quad [\text{Eq. 8.2}]$$

on

n_1 i n_2 són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps acceptats,

m és el nombre de camps comptats i té un valor de 2,

d és la dilució amb blau de tripà realitzada i el seu valor és de 0.5,

V és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de 10^{-4} mL.

Aquesta fórmula és aplicable a les cèl·lules viables i a les mortes. Un cop s'obté el número de cèl·lules per mil·lilitre de solució, s'ha de multiplicar pel volum total de tripsina i medi utilitzat pel desenganxament de les cèl·lules, tenint en compte si s'ha efectuat una concentració cel·lular, en els que s'afegeix el factor de concentració corresponent. Una vegada obtingut el número de cèl·lules totals, s'ha de dividir per la superfície de creixement utilitzada pel creixement cel·lular.

Finalment, Per obtenir el percentatge de viabilitat cal calcular el nombre total de cèl·lules (suma de les viables i de les mortes) i aplicar la següent expressió:

$$\text{Viabilitat [\%]} = \frac{\text{cèl·lules viables}}{\text{cèl·lules totals}} \cdot 100 \quad [\text{Eq. 8.3}]$$

8.6.1.2 RECOMPTE PER EXCLUSIÓ NUCLEAR

Quan els cultius de cèl·lules animals adherents es realitzen sobre la superfície de microsuports, aleshores el procés de tripsinització no és adequat pel desenganxament cel·lular, ja que aquest procediment també provoca el disgregament parcial dels suports fent que el posterior recompte cel·lular no es pugui dur a terme. Cal doncs un protocol de recompte cel·lular diferent, el recompte cel·lular per exclusió nuclear. Aquest es basa en fer un tractament al cultiu de microsuports, de manera que els nuclis de les cèl·lules s'alliberin del citoplasma cel·lular sense que es disgreguin els microsuports i puguin esser comptats a partir de l'hematocitòmetre. El protocol d'aquest tractament es detalla a continuació.

Es pren una mostra de cultiu amb els microsuports de 1 ml, i s'introdueix en un tub de centrífuga per afavorir la seva sedimentació. Degut a la mida del microsuport, i a les cèl·lules adherides, en uns minuts ja s'ha format el pòsit. Una vegada s'ha dipositat al fons del tub els microsuports, s'extreuen 0,8 ml del sobrenedant, i es resuspenen en 0,8 ml de PBS. Després de deixar precipitar de nou els suports s'extreuen 0,8 ml i s'afegeix 1,8 ml d'una solució 0,1M d'àcid cítric en un 0,1% de cristall de violeta. S'homogeneïtza la mostra i s'incuba a 37°C durant un mínim de 2-4 hores. Per tal d'aconseguir el desancorament i l'alliberació dels nuclis, es convenient homogeneïtzar vigorosament amb una pipeta.

Finalment es recompten els nuclis a l'hematocitòmetre, que s'han teñit de color violeta, i la concentració cel·lular s'aconsegueix aplicant l'equació 8.2.

8.6.2 ANÀLISI ENZIMÀTIC DE LA GLUCOSA I LACTAT

Les concentracions de glucosa i lactat de les mostres extretes durant els cultius es mesuren amb un analitzador automàtic de glucosa i lactat YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments). Aquest aparell disposa d'un elèctrode format per una fina membrana amb enzims immobilitzats que envolta un ànode de platí. Les molècules de D-glucosa o L-lactat presents a la mostra difonen a través de la membrana, i pateixen una transformació enzimàtica per acció de la glucosa i la lactat oxidases, aquestes reaccions alliberen electrons que són finalment detectats per l'elèctrode. La intensitat dels senyals elèctrics produïts és proporcional a la concentració de cadascun dels dos substrats. La mesura elèctrica no es veu afectada pel color, terbolesa, densitat o temperatura de la mostra, i només precisa que l'alíquota presa per la mesura sigui filtrada o centrifugada amb anterioritat per tal d'eliminar les cèl·lules o impureses que puguin obstruir la membrana.

L'analitzador pren 25-50 µL de la mostra i retorna els valors corresponents de concentració de glucosa i lactat en g/L, amb un error aproximat de ± 0.1 g/L. El rang de concentracions que pot mesurar l'aparell oscil·la de 0.05 a 20.0 g/L per la glucosa i 0.05 a 2.00 g/L pel lactat. Quan les mostres estan excessivament concentrades és necessari diluir-les amb aigua ultrapura fins que les mesures entren en el rang de mesura.

8.6.3 ANÀLISI GENÈTIC I HISTOLÒGIC

Al llarg del capítol 6, capítol d'aplicacions en teràpies tissulars del sistema de monitoratge en línia de la concentració cel·lular, es van utilitzant agents de diferenciació cel·lular per induir els cultius de cèl·lules

mare mesenquimals a la diferenciació cap a condrocits o cap a cardiomiòcits. Així, per tal de poder observar el grau de diferenciació obtingut en aquests cultius als que se'ls ha afegit algun dels agents de diferenciació cel·lular, cal efectuar anàlisis genètic, morfològic i histològic. Mentre que l'anàlisi morfològic es basa en una observació del cultiu cel·lular a través d'un microscopi invertit de fase, pels anàlisis genètic i histològic és necessari aplicar diferents tècniques sobre els cultius a analitzar. Aquestes tècniques es descriuen a continuació.

8.6.3.1 PURIFICACIÓ I QUANTIFICACIÓ DEL RNA TOTAL

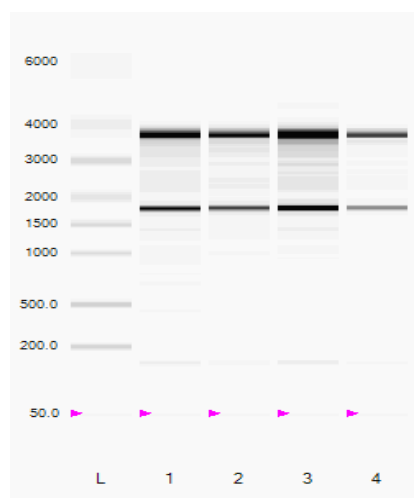
Les tècniques actuals d'anàlisi genètic d'un cultiu cel·lular es basa en determinar l'expressió gènica d'una població cel·lular a partir de l'amplificació del propi RNA missatger intracel·lular. L'amplificació del RNA missatger es realitza mitjançant la tècnica anomenada de *RT-PCR* (reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa prèvia) que consisteix en una primera transcripció inversa, on es copia el RNA missatger en forma de cDNA i una posterior amplificació del cDNA a partir de la tècnica de PCR.

En conjunt, la tècnica per *RT-PCR* es pot considerar molt sensible pel que fa a la poca quantitat de RNA missatger necessari per a la correcta realització de la tècnica, i específica pel que fa a l'estudi concret de l'expressió de determinats gens, ja que per a l'inici del procés de còpia del RNA missatger i posterior amplificació es requereixen dos fragments complementaris al gen que es vol estudiar i que serveixen com a motlles, amplificant de forma específica el gen a estudiar. Per tal de poder analitzar l'RNA, primer s'ha d'aïllar de la resta de components cel·lulars i amplificar-lo per tal que sigui més fàcil de detectar. Per tal d'aconseguir aquest propòsit, cal seguir el protocol l'indicat en el Kit RNeasy Mini de *Qiagen*, que s'aplica a una població cel·lular en suspensió (provinents de la tripsinització d'una monocapa o de la disgregació d'un polímer), i amb una concentració cel·lular recomanable de $4 \cdot 10^5$ cel/ml. Aquest protocol és el següent:

- Es trenca amb 350 µl de *buffer* RLT i s'homogeneïtza la mostra (s'han d'afegir 10 µl de β-mercaptoetanol per cada ml de *buffer* RLT que s'hagi d'utilitzar). S'afegeix el mateix volum que tenim d'etanol al 70%. No s'ha de centrifugar després d'afegir etanol.
- Transferir la mostra a la columna RNeasy en un tub de 2 ml. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 350 µl de *buffer* RW1 a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 10 µl de DNase I *stock solution* a 70 µl de *Buffer* RDD. Barrejar generosament invertint el tub i centrifugar breument.

- Afegir DNase I *incubation mix* (80 µl) directament sobre la membrana de la columna i col·locar a durant (20-30°C) 15 minuts.
- Afegir 350 µl de *buffer* RW1 a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 500 µl de *buffer* RPE a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 350 µl de *buffer* RW1 a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Col·locar la columna RNeasy en un tub de 2 ml nou, centrifugar a màxima velocitat durant 1 minut.
- Col·locar la columna RNeasy en un tub de 1,5 ml nou. Afegir 30-50 µl d'aigua RNase free. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.

Prèviament a la realització de la RT-PCR s'ha de quantificar i analitzar la seva qualitat utilitzant el sistema Experion RNA StdSens Analysis Kit, per tal de comprovar si l'extracció de l'RNA s'ha efectuat sense cap tipus de degradació i, a més, ens dóna informació sobre la concentració del RNA de les mostres, dada que ens serveix per decidir la quantitat de mostra que es processarà per RT-PCR. Els resultats obtinguts pels diferents cultius han mostrat que no hi ha hagut degradació de l'RNA de les mostres i, per tant, es pot procedir a la RT-PCR. A la figura 8.5 es pot observar un exemple d'anàlisi i quantificació de l'RNA.



Canal	Concentració RNA (µg/µl)
Canal 1: Diferenciació A	330,77
Canal 2: Medi normal A	252,1
Canal 3: Diferenciació B	445,84
Canal 4: Medi normal B	156,21

Figura 8.5 Simulació del gel de les mostres de RNA feta pel sistema Experion RNA StdSens Analysis Kit (esquerra) amb la corresponent quantificació de la concentració de RNA de les mostres (dreta). Les mostres analitzades en aquest exemple són del cultiu en monocapa de oMSC, tant amb medi de diferenciació cardíaca com amb el corresponent medi de cultiu estàndard.

Pel que fa al funcionament, el software de l'equip simula el resultat que obtindríem si haguéssim fet el mateix amb un gel d'electroforesi. A partir de la simulació del gel, s'obtenen les dues bandes

corresponents al fragment 18S i 28S del RNA ribosòmic (figura 8.5, esquerra), fet que permet observar que no hi hagut degradació del RNA, condició essencial perquè la RT-PCR es pugui dur a terme. Per altra banda, el xip és una tècnica quantitativa i ens dóna informació sobre la concentració del RNA que tenim a les mostres (figura 8.5, dreta), dada que serveix per decidir la quantitat de mostra per a fer la RT-PCR.

8.6.3.2 La RT-PCR

Un cop es disposa del RNA aïllat i analitzat, ja es pot procedir a la seva amplificació, utilitzant el Kit *Titan one tub RT-PCR kit*. El protocol es descriu a continuació:

- Es preparen les solucions mare I i II (taula 8.7).
- S'afegeix la solució mare I a la solució mare II de cada gen, donem un cop al tub per homogeneïtzar i centrifuguem breument per tenir la solució en el fons del tub de PCR.
- Es col·loquen els tubs de PCR en el termociclador *Gene Cycler (Bio-Rad)* i s'inicia la seqüència d'amplificació que es mostra a la taula 8.9.
- Una vegada ha finalitzat la RT-PCR, es pot observar el material amplificat a partir de l'addició del material resultant en un gel d'agarosa al 2% p/v amb la posterior aplicació d'un camp elèctric.

Taula 8.7 Composició de les solucions mare I i II. On els oligos (FW i RV) es poden observar a la taula 8.8.

Solució Mare I				Solució Mare II		
Component	Control	Mostra	Concentració final	Component	Control	Mostra
Aigua estèril	10,5 µl	14,5 µl	-	Tampó RT-PCR (5x)	10 µl	10 µl
dNTP mix	4 µl	4 µl	0,2 mM	Mescla enzimàtica	1 µl	1 µl
Solució DTT	2,5 µl	2,5 µl	5mM	Aigua estèril	14 µl	14 µl
Inhibidor RNasa	1 µl	1 µl	5U	Volum total	25 µl	25 µl
Oligo control	2 µl	-	0,4µM			
Oligo FW	-	1 µl	0,4µM			
Oligo RV	-	1 µl	0,4µM			
RNA control	5 µl	-	10 pg			
RNA motlle	-	1 µl	1µg-1pg			
Volum total	25 µl	25 µl	-			

Taula 8.8 Seqüències i propietats dels oligos utilitzats en les RT-PCR al llarg del treball.

Gen	Oligo	Mida oligo (bp)	T _m (°C)	Mida gen (bp)
Desmina FW	CCAACAAGAACAACGACG	18	53,1	408
Desmina RV	TGGTATGGACCTCAGAACC	19	51,7	408
α -actina FW	GCCTTCCTCATTTAAAGCTC	20	52,2	418
α -actina RV	AACACCACTGCTCTAGCCACG	21	60,1	418
β -MHC FW	GATCACCAACAACCCCTACG	20	56,6	528
β -MHC RV	ATGCAGAGCTGCTCAAAGC	19	56	528
Troponina T FW	AGGCGCTGATTGAGGCTCAC	20	61,4	416
Troponina T RV	ATAGATGCTCTGCCACAGC	19	52,7	416
GAPDH FW	CGGATTTGGTCGTATTGG	18	53	861
GAPDH RV	TCAAAGGTGGAGGAGTGG	18	53,4	861
Col·lagen tipus II FW	ACGGTGGACGAGGTCTGACT	20	65	141
Col·lagen tipus II RV	GGCCTGTCTCTCCACGTTCA	20	65	141
Col·lagen tipus I FW	CCACCAGTCACCTGCGTACA	20	65	460
Col·lagen tipus I RV	GGAGACCACGAGGACCAGAA	20	65	460
Aggrecan FW	CCGCTATGACGCCATCTGCT	20	65	375
Aggrecan RV	TGCACGACGAGGTCCTCACT	20	65	375
Byglican FW	CCATGCTGAACGATGAGGAA	20	65	204
Byglican RV	CATTATTCTGCAGGTCCAGC	20	65	204
TGF β FW	CGGCAGCTGTACATTGACTT	20	60	271
TGF β RV	AGCGCACGATCATGTTGGAC	20	60	271

Taula 8.9 Seqüència d'amplificació utilitzada en el termociclador *Gene Cycler* (Bio-Rad).

Nº de cicles	Temperatura(°C)	Duració(min.)	Funció
1	50	30	Transcripció ARN-cADN
1	94	2	Desnaturalització motlle
35	94	0,5	Desnaturalització
	55	0,5	Unió motlle-oligos
	68	1	Allargament
1	68	7	Allargament addicional

Els resultats obtinguts s'han anat mostrant al llarg del capítol 6 en els corresponents apartats d'anàlisi genètic, tant per a les aplicacions a la diferenciació condrocitària, com per a les aplicacions a la diferenciació cardíaca.

8.6.3.3 HISTOLOGIA DE SAFRANINA O

L'anàlisi histològic i Immunohistoquímic permet, mitjançant la utilització de colorants específics i anticossos respectivament, un estudi ampli de l'estructura cel·lular i morfològica de les cèl·lules que es troben incloses en teixits d'interès. Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, la histologia de Safranina O permet tenyir cartílag, mucines i mastòcits. Tenyeix de color vermell-carabassa els glicosaminoglicans de la matriu extracel·lular cartilaginosa, de color negre els nuclis i de color verd-gris el citoplasma. El protocol d'aquesta tècnica, que es duu a terme a partir de mostres prèviament parafinades i tallades del polímer a analitzar, es detalla a continuació:

- Desparafinar i hidratar amb aigua destil·lada.
- Hematoxilina de Weighert durant 10 minuts.
- Deixar 10 minuts sota l'aixeta amb aigua corrent.
- Incubació amb 0.02% Fast Green durant 5 minuts.
- Es fa un pas per àcid acètic 1% durant 3 segons.
- Incubació amb Safranina O 0.1% durant 5 minuts.
- Es fan 10 passos amb Alcohol de 70°.
- Es fan 10 passos amb Alcohol de 90°.
- Es fan 10 passos amb Alcohol absolut.
- Es fan 10 passos amb Xilè.

8.6.3.4 IMMUNO-HISTOQUÍMICA PER COL·LAGEN TIPUS II

La immunohistoquímica ens permetrà saber, d'aquells teixits o agregats cel·lulars que puguem fixar en un lloc de parafina, la expressió o no de la proteïna col·lagen tipus II característica del cartílag hialí. Aquesta tècnica ofereix una precisió molt alta ja que es basa en la utilització d'anticossos específics, prèviament marcat amb una molècula fluorescent, per la detecció d'antígens sobre mostres tissulars o citològiques. Els reactius principals són l'anticòs primari de col·lagen II (Chemicón ref.: MAB 8887), l'anticòs secundari i la streptavidina (KIT DAKO Cytomation LSAB2 System-HRP. ref.: K0675) i el Líquid *DAB Substrate-Chromogen system* de grau per a us en laboratori. El protocol a seguir és el següent:

- Les mostres histològiques es deixen a l'estufa 24 hores a 37 °C.
- Desparafinar i hidratar.
- Desemascament enzimàtic (Pepsina 0,1% en HCl 0.01N) durant 20 minuts a temperatura ambient.
- Dos rentats amb PBS de 5 minuts cada un.

- Bloqueig de la Peroxidassa endògena amb H_2O_2 3% en H_2O . Es prepara al moment. 30 minuts en una cubeta d'agitació a temperatura ambient.
- 3 rentats de 5 minuts amb PBS+ 0,1 Tritó (100 mL de PBS + 100 μL de Tritó).
- Bloqueig d'unions inespecífiques amb 3% BSA PBS+Tritó durant 1 hora i 30 minuts a temperatura ambient. Decantar l'excés, no rentar.
- Aplicar l'anticòs primari (dilució 1:200 en 1% BSA en PBS-0.1%Tritó), amb 1mL per 10 portes (100 μL per porta) posant-ho en eppendorf o tub petit durant tota la nit a 4°C (es pot cobrir amb parafilm). Pel control negatiu, enlloc de l'anticòs primari, utilitzar 1% BSA en PBS-0.1%Tritó.
- 3 Rentats de 5 minuts amb PBS+ 0,1 Tritó.
- Aplicar l'anticòs secundari KIT DAKO 1 durant 10 minuts a temperatura ambient.
- 3 rentats de 5 minuts amb PBS-Tritó.
- Incubació en Streptavidina Kit Dako2 durant 10 minuts a temperatura ambient.
- 3 rentats de 5 minuts amb PBS.
- Revelar amb Diaminobencidina (DAB). 20mL de PBS més una alíquota de DAB(450 μL a 25 mg/ml) + 2 μL de H_2O_2 . Filtrar amb una xeringa Afegir la DAB a les preparacions i es controla el color del teixit microscòpicament durant 5 minuts. Per a parar la reacció es submergeix la preparació en PBS. Si no ha pujat molt el color es poden deixar una estona més, però si tarda molt es poden retirar les mostres.
- Rentat amb aigua destil·lada.
- Incubació amb Hematoxilina de Mayer 25% en aigua desmineralitzada durant 1 minut.
- Rentar amb aigua corrent fins que viri i efectuar el corresponent muntatge.

8.7 MESURES I PROTOCOLS

Al llarg d'aquest treball, s'han anat utilitzant diverses mesures que precisen d'un determinat protocol a l'hora d'efectuar-se, així com varis tractaments o protocols efectuats a alguna de les parts del sistema de cultiu (superfície de creixement, sondes òptiques...). A continuació es detallen els més importants.

8.7.1 MESURA DE LA VELOCITAT DE CONSUM D'OXIGEN: LA OUR

El primer pas en el desenvolupament d'una mesura d'activitat cel·lular en cultius de cèl·lules animals adherents, passa per l'adequació d'una mesura de la velocitat de consum d'oxigen obtinguda, tal i com ja s'ha comentat anteriorment (apartat 3.2), a partir del seguiment de la concentració d'oxigen dissolt durant una aturada en el subministrament de l'aeració. Aquest seguiment de la concentració d'oxigen dissolt s'ha dut a terme en el treball mitjançant sondes polarogràfiques i sondes òptiques, variant una mica els protocols de mesura. Aquests protocols, que es basen en un calibrat inicial seguit d'una mesura de la

constant de desorció pel corresponent sistema d'aeració, essent ambdós previs a les mesures de la OUR (a partir del corresponent protocol de mesura), es detallen a continuació.

8.7.1.1 CALIBRAT DE LA MESURA D'OXIGEN DISSOLT

Prèviament a l'inici de les mesures de la OUR en un cultiu cel·lular en minibioreactors mitjançant sondes d'oxigen dissolt polarogràfiques (el calibrat de les sondes d'oxigen òptiques ja es troba descrit a l'apartat 3.8.8), cal realitzar un calibrat previ d'aquestes sondes per a poder obtenir els perfils de concentració d'oxigen. Aquest calibrat es compon dels passos següents i es realitza abans d'inocular el sistema, és a dir, sense la presència de cèl·lules:

- S'omple el minibioreactor amb medi de cultiu al volum de treball de l'experiment en qüestió.
- Es passa un cabal d'aire amb CO₂ (barreja de 21% d'oxigen, 5% de CO₂ i 74% de nitrogen) pel capçal del minibioreactor fins a aconseguir una mesura estable del valor de voltatge (i per tant d'intensitat).
- Es canvia el cabal d'aire amb CO₂ per un de nitrogen i s'espera fins a obtenir una mesura estable del voltatge. Es pot prescindir d'aquest pas, que al no tenir presència d'oxigen en el medi, el voltatge coincideix amb el voltatge base de la placa de mesura (2,5 V) i per tant la intensitat ha de ser nul·la (l'error de zero del circuit de mesura és inapreciable en l'escala de mesura).
- Amb la variació d'intensitat obtinguda entre l'absència i la presència d'oxigen es pot calcular el pendent a aplicar a la mesura de la intensitat per a transformar-la a una escala percentual d'oxigen (0 a 100%).

8.7.1.2 MESURA DE LA CONSTANT DE DESORCIÓ

Un cop es té el pendent (o el calibrat corresponent per a les sondes òptiques) i prèviament a la inoculació de les cèl·lules al sistema de cultiu, s'ha d'efectuar el càlcul de la constant de desorció de l'oxigen. Per a realitzar el càlcul cal seguir els mateixos passos que s'utilitzen per a la mesura de la OUR (apartat 8.7.1.3), tot i que en aquest cas s'utilitza l'equació 8.4 per a trobar el valor de la constant de desorció de l'oxigen. Es repeteix el següent procediment per triplicat per obtenir un valor fiable de la constant.

$$\frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = -K_{des} C_{O_2}(t) \quad [\text{Eq. 8.4}]$$

8.7.1.3 MESURA DE LA OUR

El procediment per a la mesura de l'OUR, que es realitza utilitzant el mètode dinàmic de mesura, es basa en els passos descrits a continuació.

- En el cas que la concentració d'oxigen dissolt en el medi sigui inferior al 65%, s'introdueix un corrent d'aire amb 5% de CO₂ per capçal, fins a assolir la concentració desitjada. L'addició del corrent es dona de manera discontinua, per capçal, suficient per mantenir una atmosfera d'aire ric en oxigen.
- Un cop tenim la concentració d'oxigen per sobre del 65%, s'atura el subministrament d'aire i s'introdueix un corrent de N₂ pel capçal del minibioreactor per esgotar l'oxigen en la fase gas. L'aportació de nitrogen es duu a terme de manera contínua per assegurar l'esgotament de l'oxigen.
- Es registren les lectures d'oxigen dissolt respecte el temps des del 60% en tots els cultius, fins que el valor de pO₂ baixa al 40% de la saturació. La disminució de l'oxigen dissolt en aquest període es deu al consum d'oxigen per les cèl·lules, i a la transferència d'oxigen pel nitrogen gas.
- Una vegada assolit el 40% de la saturació de l'aire es tanca l'entrada de nitrogen gasós i es reprèn el subministrament d'aire amb 5% de CO₂ per capçal.

S'ha de tenir en compte que a l'executar el procediment descrit, a l'afegir el corrent de nitrogen no només es veu desplaçat l'oxigen, sinó que la concentració que hi ha de CO₂ també es veu desplaçada modificant doncs el pH del medi i, al tractar-se de cèl·lules animals adherents, el temps que el cultiu es queda sense CO₂ augmenta considerablement. Aquest fet, juntament amb el fet de variar la concentració d'oxigen fins a nivells baixos, fa que la mesura de l'OUR no es pugui fer d'una manera continuada i, es necessiti que el cultiu reposi per a poder recuperar les condicions òptimes i no variar així el metabolisme de les cèl·lules. Així doncs les mesures de l'OUR es realitzaran un màxim de 2 cops diaris.

El càlcul de l'OUR es realitza amb el perfil de l'oxigen dissolt respecte la saturació en l'interval enregistrat de les lectures enfront el temps, i es pot caracteritzar amb l'equació 8.5.

$$OUR = 0.00194 \times \left[\frac{c_{O_2}(t_0) - c_{O_2}(t_f)}{t_f - t_0} + \frac{\int_{t_0}^{t_f} (-K_{des} \times c_{O_2}(t)) dt}{t_f - t_0} \right] \quad [\text{Eq. 8.5}]$$

on

l'OUR s'obté en [mmols O₂/(l·h)]

Co₂ és la concentració d'oxigen en el bioreactor [%]

t és el temps [s] (els subíndexs 0 i f es refereixen al temps inicial i final de les mesures respectivament)

la constant 0.00194 serveix per passar d'unitats de saturació d'aire a mmols/l

la K_{des} [h⁻¹] és la constant de desorció de l'oxigen en el medi del minibioreactor calculada prèviament

8.7.2 MESURES FORA DE LÍNIA: CREIXEMENTS PARAL·LELS

Al llarg dels diferents capítols s'ha vist necessari l'obtenció de mesures de concentració cel·lular efectuades fora de línia com a contramesura per a les diferents mesures en línia desenvolupades al llarg del treball. Tal i com ja s'ha comentat a la introducció, un dels problemes de les mesures fora de línia de la concentració cel·lular, és la necessitat de destrucció del cultiu cel·lular per tal de poder realitzar aquesta mesura. A més, al tractar-se de sistemes biològics, cal efectuar repeticions de les mesures per tal de poder tenir una dada estadísticament més exacta, fent que es necessiti una gran quantitat de creixements en paral·lel per a poder obtenir el seguiment de la concentració cel·lular fora de línia al llarg d'un experiment. Aquest fet, fa que sigui necessari efectuar la inoculació d'aquests creixements en paral·lel amb una alta repetibilitat, de manera que s'ha seguit el protocol següent.

- Calcular el número de mesures de concentració a fer (dies a mesurar, diferents cultius i repeticions).
- Calcular el número de cèl·lules totals per engegar l'experiment a partir de la concentració de l'inòcul a utilitzar en l'experiment, multiplicat pel número total de mesures de concentració (tenint en compte 2 mesures extra més per pal·liar possibles pèrdues de volum).
- Calcular volum total de l'inòcul comú tenint en compte que s'utilitzarà 1 ml de l'inòcul comú per cada una de les mesures a fer (tenir en compte les 2 mesures extra).
- Tripsinitzar les cèl·lules del pre-inòcul, separar el número de cèl·lules totals necessàries per l'experiment i resuspendre-les en el volum total de l'inòcul comú del medi de cultiu corresponent.
- Inocular amb 1 ml de la barreja de cèl·lules i medi de cultiu a cada un dels pous de cultiu d'una placa de 6 pous (o minibioreactor segons l'experiment a realitzar). S'ha de tenir en compte que, per aconseguir l'elevat grau d'homogeneïtat necessari per a obtenir unes mesures repetitives, cal agitar (suaument) constantment la barreja de cèl·lules i medi.
- Afegir la resta de medi de cultiu a cada un dels pous (o minibioreactors) fins a arribar al volum de treball corresponent.

Si no es vol tenir en compte el temps d'adherència cel·lular en l'experiment (opció òptima i molt adequada per a línies cel·lulars amb un temps d'adherència i de duplicació elevat), cal disminuir la concentració de l'inòcul pel càlcul del número de cèl·lules totals (segons temps de duplicació de la línia), augmentar el número de mesures de concentració a fer amb les mesures necessàries pel càlcul exacte de la concentració cel·lular a l'iniciar l'experiment (amb les corresponents repeticions per tenir una mesura més exacta) i l'últim punt del protocol es pot efectuar un cop les cèl·lules es troben adherides a la superfície de cultiu (amb recanvi del medi inclòs).

8.7.3 TRACTAMENTS D'ACTIVACIÓ DE LA SUPERFÍCIE DE CULTIU

Tal i com s'ha comentat anteriorment a l'apartat 3.3.1, per poder aconseguir un creixement òptim en els cultius en minibioreactors i, per tant, obtenir un creixement similar al que s'obté en els sistemes comercials de cultiu estàtic, cal aplicar un tractament d'activació de la superfície de cultiu. Aquests tractaments que es basen en fer reaccionar la superfície de cultiu per tal de crear grups hidroxils carregats negativament que ajudin a l'adherència cel·lular, poden ser de dos tipus, químics i per plasma.

Prèviament a la realització de qualsevol dels dos tractaments cal assegurar que el minibioreactor es trobi en un estat de neteja elevat. Per tal d'aconseguir aquest estat, els minibioreactors es netegen amb aigua ultrapura durant un mínim de 72h.

8.7.3.1 ACTIVACIÓ QUÍMICA

El tractament d'activació química es basa en una modificació, menys ofensiva, del tractament de neteja i activació d'Abtech (Abtech Scientific). El procediment és el següent.

- Escalfar a 50°C una solució 4:1 d' H_2SO_4 : H_2O_2 (al 30% en solució aquosa).
- Afegir 1 ml de la solució a la base del minibioreactor a tractar, esperar 30 segons i retirar-la.
- Rentar amb un flux d'aigua destil·lada durant un mínim de 3 minuts.
- Assecar amb un corrent de nitrogen filtrat.

8.7.3.2 ACTIVACIÓ PER PLASMA

L'activació per plasma és un procés en el que la superfície a tractar (en aquest cas la superfície de creixement dels minibioreactors) es situa a l'interior d'un recipient al que se li aplica el buit i, seguidament, es reomple amb un gas a poca pressió (en aquest cas oxigen). Aquest gas, s'excita energèticament per a que les seves molècules creïn grups hidroxils a la base dels minibioreactors en el moment de xocar-hi. Així, al necessitar un sistema complex per a l'activació per plasma dels minibioreactors utilitzats, aquesta es realitza a *Diener Electronic*.

8.7.4 PROTOCOL D'INCLUSIÓ DELS FLUORÒFORS EN MEMBRANES

Al llarg del desenvolupament de la mesura òptica de l'oxigen dissolt (capítol 3), s'han efectuat proves amb diferents fluoròfors, proves que s'han realitzat utilitzant els corresponents protocols d'inclusió en matrius respectius per a cada un dels fluoròfors i, en el cas del $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$, se n'han utilitzat varis. Aquests protocols es mostren a continuació.

8.7.4.1 PROTOCOL D'INCLUSIÓ DEL $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$

Només s'utilitza un protocol al llarg del desenvolupament ja que és descartat després de les primeres proves. El protocol utilitzat és el que es mostra a continuació:

- preparar una membrana de silicona (Elastosil E43) per assecament, ja sigui manualment (anomenat capa prima) o mitjançant un *spin coater* (s'obté una membrana molt més prima i uniforme).
- preparar la solució de ruteni de 1,25 g/l en cloroform (no es dissol del tot).
- submergir la membrana en la solució de ruteni durant 5 minuts i assecar amb aire.
- Rentar lleugerament amb etanol (així s'elimina el ruteni de la superfície i no presenta toxicitat en els cultius).
- En cas de presentar toxicitat es pot recobrir la membrana de silicona que conté el ruteni amb una altra membrana de silicona.

8.7.4.2 PROTOCOL D'INCLUSIÓ DEL $\text{Ru}(\text{dpp})_3(\text{ClO}_4)_2$

Per a les proves inicials, el protocol a utilitzar és el mateix que pel $\text{Ru}(\text{p})_3(\text{ClO}_4)_2$ (apartat 8.7.4.1). A l'apartat 3.5.3 però, s'utilitzen altres protocols d'inclusió. Aquests protocols parteixen de la solució de solubilització per a cada un dels polímers (la silicona en cloroform, el PVC en diclorometà i l'EC en 80:20 v/v toluè:etanol) a la que se li dissol el complex de ruteni. Un cop es disposa de la solució del complex de ruteni amb la matriu d'immobilització, els diferents protocols de fabricació utilitzats es mostren a la figura 3.30 de l'apartat 3.5.3.

8.7.4.3 PROTOCOL D'INCLUSIÓ DEL PdOEp

Només s'utilitza un protocol al llarg del desenvolupament ja que és descartat després de les primeres proves. El protocol utilitzat és el que es mostra a continuació:

- preparar una solució de PdOEp de 2 mg en 2 ml de THF (tetrahidrofurà).
- Preparar una solució polimèrica d'EC (46% ethoxy) 10% p/v en 80:20 v/v toluè:etanol.
- Afegir la primera solució completa a 5 g de la solució polimèrica d'EC.
- Fer la membrana per spin coating o per capa prima.

8.7.4.4 PROTOCOL D'INCLUSIÓ DE LA CAMPHORQUINONE

Només s'utilitza un protocol al llarg del desenvolupament ja que és descartat després de les primeres proves. El protocol utilitzat és el que es mostra a continuació:

- Preparar una solució de PVC 10% p/v en diclorometà.
- Afegir 20% p/p de camphorquinone.
- Escampar en un vidre la solució mitjançant una fulla d'amplada de pas graduable.
- Assecar per buit durant un mínim de 18 hores i a 100°C.
- Separar-los del vidre, tallar-los a la mida adequada i muntar-los en un portador

El protocol d'immobilització també es pot fer en silica gel:

- preparar solució al 10% de camphorquinone amb dicloromethane
- escampar 5 µl de la solució en sílica gel (un 10 % p/p)
- incrustar les partícules formades en silicona (E43).
- fer la membrana per capa prima.

8.7.5 ADHESIÓ DE LA SILICONA SYLGARD: OPTIMITZACIÓ DEL TEMPS DE RESPOSTA

Tot i que la membrana d'EC enganxada mitjançant sylgard compleix amb les necessitats de variació de fase i d'estabilitat de la mesura (apartat 3.8.7), s'ha observat que per una banda es produïa el desenganxament en algunes de les matrius adherides, mentre que en altres membranes es tardava més estona en arribar a les concentracions de 0 i 100% d'oxigen en fase gas.

Aquests fets ocorren degut a que la utilització de silicones per a l'adhesió de la membrana al port òptic del minibioreactor comporta la possibilitat de que el dissolvent present en la silicona pugui reaccionar amb la pròpia membrana impermeabilitzant-la si no es deixa un temps previ suficient per a que se n'evapori una quantitat suficient o bé que la silicona perdi les propietats adherents si es deixa que se n'evapori la gran majoria. Cal doncs determinar el temps òptim d'espera entre l'aplicació de la silicona al port òptic i la col·locació de la membrana per a obtenir una variació de fase màxima i un temps de resposta mínim.

Per a poder determinar aquest temps òptim de curat de la silicona es realitzaran les mesures de la variació de fase total entre les concentracions de 0 i 100% d'oxigen en fase gas i del temps de resposta en medi líquid al passar d'una concentració de 100% a 0% d'oxigen dissolt, per a diferents membranes comercials i d'EC adherides mitjançant silicona sylgard amb diferents temps de curat efectuat a una temperatura constant de 45°C.

La mesura de la variació de la fase es mesura a 50 KHz per el sistema en qüestió en fase gasosa des d'una atmosfera d'aire fins a una atmosfera de nitrogen, mantingudes a l'interior del minibioreactor per un cabal de gas constant de 0,7 l/min. La mesura del temps de resposta es realitza a través del monitoratge de la mesura de fase a 50 KHz al llarg del temps al traspasar la tapa amb el corresponent port òptic amb la membrana adherida des d'un minibioreactor omplert amb un volum de 13 ml d'aigua ultrapura, on s'ha bombollejat nitrogen amb un cabal de 0,3 l/min durant un mínim de 30 minuts fins a la estabilització de la mesura (0% d'oxigen dissolt) cap a un altre minibioreactor prèviament airejat (100% d'oxigen dissolt), moment en que es canvia el nitrogen per aire tot mantenint el cabal.

Un cop es disposa del perfil de fase al llarg del temps fins a l'estabilització de la mesura a la concentració de saturació d'oxigen dissolt, es mesura el temps de resposta (τ) corresponent a la cinètica de primer ordre (equació 3.2). Els resultats obtinguts tant de a la variació de fase (esquerra) com del temps de resposta (dreta) en funció del temps de curat es troben representats a la figura 8.6.

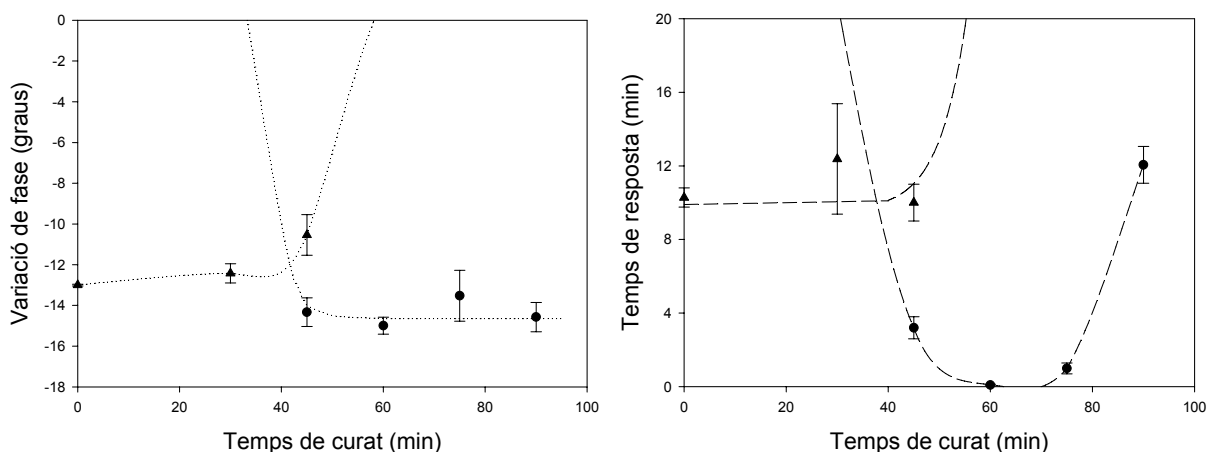


Figura 8.6 Perfils de la variació de fase obtinguda en fase gas (esquerra) i del temps de resposta obtingut en líquid (dreta) en funció del temps de curat a 45 °C (efectuat prèviament al contacte entre la silicona i la membrana) per a les membranes d'EC (▲) i d'Ocean Optics (●), adherides mitjançant silicona sylgard al port òptic del minibioreactor.

El primer que es pot observar amb els resultats obtinguts, és que el comportament del temps de curat previ a 45 °C de la silicona és completament diferent per a les membranes d'EC i les comercials d'Ocean Optics, de manera que per a temps superiors a 45 minuts de curat a 45 °C es produeix el desenganxament de les membranes d'EC (el desenganxament de les membranes es troba representat a les gràfiques amb el fet que la línia de tendència surti fora del rang), mentre que per a les membranes comercials és totalment a l'inrevés, necessitant un mínim de 45 minuts de curat previ de la silicona per a que la membrana no es desenganxi. Si entrem més en detall i ens fixem en la variació de fase en gas obtinguda per als diferents temps de curat realitzats, es pot observar que no hi ha cap influència clara respecte el temps de curat per

a cap de les dues membranes analitzades, a no ser que es trobi proper a la zona de desenganxament de la membrana.

Per altra banda, si observem els resultats dels temps de resposta en fase líquida obtinguts, obtenim que mentre per a les membranes comercials d'Ocean Optics existeix una forta dependència i es pot trobar un mínim del temps de resposta a la hora de curat a 45 °C, en el que la resposta s'equipara a la resposta obtinguda en fase gas (pocs segons), per a les membranes d'EC no es pot observar aquesta dependència del temps de curat i es situa a un temps de resposta aproximat d'uns 10 minuts, valor molt superior als temps de resposta obtinguts en fase gas.

El fet que els temps de resposta típics per a les sondes polarogràfiques miniaturitzades rondin els 2,5 minuts, i que una de les característiques dels sistemes òptics de mesura de la concentració d'oxigen és la disminució d'aquests temps de resposta tal i com es pot observar en les membranes comercials analitzades, indica que la membrana d'EC no es troba totalment optimitzada per a la mesura en medi líquid. El problema no pot ser el protocol d'adhesió utilitzat ja que, tot i que el temps de resposta es trobi limitat per a la membrana desenvolupada i no pugui disminuir dels 10 minuts aproximats tal com es pot observar a la figura 8.6 (dreta), aquest temps de resposta sí que es troba totalment optimitzat per a la membrana comercial d'Ocean optics, amb la disminució d'aquest temps de resposta cap a valors pràcticament nuls.

El fet més plausible d'aquesta limitació que pateixen les membranes desenvolupades en el temps de resposta, ha de recaure en una densitat massa elevada de les membranes d'EC que no permeti la difusió de l'oxigen a través de la fibra de vidre de la membrana. Així doncs, per a poder obtenir un temps de resposta més idoni per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt en medi líquid, caldrà optimitzar la concentració d'etil cel·lulosa utilitzada per a la fabricació de les membranes i, d'aquesta manera, aconseguir augmentar-ne la seva permeabilitat.

Per a observar-ne l'efecte de la concentració d'EC en el temps de resposta de la membrana desenvolupada, s'ha repetit l'experiment de mesura del temps de resposta juntament amb la variació de fase resultant, però amb diverses membranes preparades amb concentracions d'etil cel·lulosa més diluïdes i que permetin una millor permeabilitat de la membrana resultant. Les concentracions d'EC utilitzades per a la solució de solubilització del fluoròfor de ruteni són de 75, 50 i 25 mg/ml juntament amb la concentració inicial de 100 mg/ml utilitzada per a la fabricació de les membranes anteriors.

Els resultats obtinguts tant del temps de resposta com de la variació de fase corresponent per a les diferents membranes es pot observar a la figura 8.7. Amb aquests resultats, es pot observar com el fet de disminuir la concentració d'etil cel·lulosa de la solució de solubilització del fluoròfor de ruteni fa que el temps de resposta de la membrana al canviar la concentració d'oxigen dissolt del 0% al 100% disminueixi clarament respecte el temps de resposta per a la concentració d'EC utilitzada inicialment.

D'aquesta manera, s'aconsegueix disminuir dels aproximadament 10 minuts de temps de resposta als 15-20 segons per a concentracions d'EC inferiors a uns 60 mg/ml. Si es té en compte però, la variació de fase obtinguda per a les diferents membranes fabricades, es pot observar que el fet de disminuir la concentració d'EC de la solució de solubilització per a la formació de les membranes també fa disminuir lleugerament la variació total de fase obtinguda, fent-se aquesta disminució significativa per a la concentració d'etil cel·lulosa de 25 mg/ml amb els -8,24 graus de variació de fase obtinguts per a aquestes membranes respecte els $-9,50 \pm 0,25$ graus de variació de fase per a la resta de les membranes.

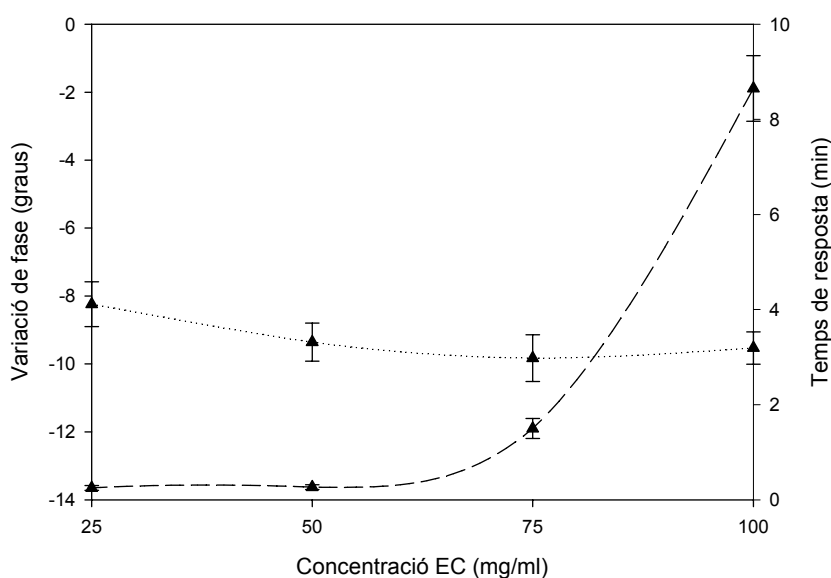


Figura 8.7 Perfils de la variació de fase obtinguda en fase gas (esquerra) i del temps de resposta obtingut en líquid (dreta) en funció de la concentració d'EC utilitzada per a la fabricació de les membranes d'EC, adherides al port òptic del minibioreactor mitjançant silicona sylgard.

Per tant, es pot concloure que per a obtenir una disminució suficient del temps de resposta de les membranes sense comportar una disminució significativa de la variació de fase resultant per a les membranes fabricades, s'utilitzarà una concentració d'etil cel·lulosa de 50 mg/ml en la solució utilitzada per a la solubilització del fluoròfor de ruteni en el procés de fabricació de les membranes per a la mesura de la concentració d'oxigen dissolt.

8.7.6 MUNTATGE DELS MICROELÈCTRODES EN SISTEMES DE CULTIU

Al llarg del treball s'ha anat utilitzant els microelèctrodes per a la mesura de la bioimpedància, els quals s'han col·locat a l'interior tant de plaques petri com de minibioreactors. El protocol a seguir, que s'exposa a continuació, és el mateix per ambdós sistemes de cultiu:

- Mitjançant una serra de marqueteria, realitzar un forat des de l'exterior a l'alçada de la base, pel que hi ha de passar la zona de les pistes gruixudes del microelèctrode. Comprovar que l'amplada del forat és la correcta mitjançant un microelèctrode vell.
- Per altre banda, unir les pistes gruixudes del microelèctrode a utilitzar a les pistes de la placa de contactes mitjançant "adhesive epoxy silver fill 30G" i es deixa a l'incubador durant 24 hores. Tenir en compte les consideracions següents:
 - Per mantenir unit utilitzar un parell de pinces per que es mantinguin les dues parts unides.
 - En el cas que no es tingui cap tros de placa per utilitzar, s'ha "d'imprimir" una placa nova i retallar-la degudament.
 - A partir d'aquest moment s'ha de tenir cura amb la manipulació del muntatge, ja que es podria desenganxar la resina d'alguna de les dues parts.
- Un cop passades les 24 hores, comprovar mitjançant un tester els contactes i la resistència existent entre la zona de mesures del microelèctrode i les puntes metàl·liques de la placa. Si la resistència és massa elevada o be no existeix contacte entre el microelèctrode i la placa en alguna de les quatre pistes s'ha de desenganxar i tornar a repetir el procediment.
- Inserir el muntatge a través forat allargat a dins del minibioreactor i unir el microelèctrode a la base del minibioreactor amb silicona Elastosil E43 i deixar el muntatge del minibioreactor de cap per avall (per mantenir el contacte de la silicona entre la base del minibioreactor i els microelèctrodes) a dins de l'incubador durant 24 hores.
- Utilitzar la silicona Sylgard 184 per segellar el forat realitzat per introduir el microelèctrode a dins del minibioreactor i deixar assecar a dins d'un assecador i/o ajudar amb un corrent d'aire sec.
- Comprovar els contactes un altre cop amb el tester així com el valor de la resistència que hi ha entre les zones de mesura i les puntes de la placa metàl·lica. En el cas que la resistència sigui massa elevada o be no existeixi contacte entre el microelèctrode i la placa en alguna de les pistes, caldria repetir el procés.
- Aplicar una capa de cola "loctite" sobre la interfase entre el microelèctrode i placa (part externa al minibioreactor) per assegurar-ne la perdurabilitat dels contactes i augmentar-ne la resistència a l'estrès. Esperar un parell d'hores (es pot posar a dins de l'incubador per disminuir el temps de curat).

S'ha de tenir en compte que per a connectar la placa de contacte i el Front-End, no es pot agafar pel minibioreactor, sinó que s'ha d'agafar per a la pròpia placa de contacte, ja que sinó es podria provocar un estrès prou elevat per perdre el contacte d'alguna de les pistes i per tant, impossibilitar la mesura posterior a 4 fils i possiblement també a 2 fils.

8.7.7 FABRICACIÓ DE MATRIUS DE PLGA

Per la fabricació de matrius de Poly Lactic Glycolic Acid (PLGA) utilitzades a l'apartat 6.2.2 del capítol d'aplicacions en teràpies tissulars, dels sistemes de mesura en línia desenvolupats al llarg del treball, s'utilitza el polímer comercial de la casa NP Pharm, de característiques PLGA 50:50 inherent i de viscositat 0.55-0.75. Per a la generació de porus per a la colonització dels polímers resultants, s'utilitza Clorur Sòdic tamisat, mentre que com a dissolvent s'utilitza cloroform. La relació de polímer i porògen que s'utilitza és 1:9. El protocol utilitzat és el que es descriu a continuació: (Caminal·2006).

- Es tamisa el clorur sòdic en un tamís amb unes safates de pas de llum determinat, durant un mínim de 30 minuts.
- Es pesa 1g de PLGA i 9g de clorur sòdic tamisat.
- Es dissol el PLGA (lentament i en petites quantitats) en cloroform a dins d'una campana de gasos amb un agitador magnètic i una mosca.
- Un cop està tot dissolt, s'aboca el PLGA dissolt sobre un vidre de rellotge on tenim el clorur sòdic. Es barreja el conglomerat fins que el cloroform es va evaporant i queda una massa sòlida. S'ha de tenir molta cura en el moment que s'endureix perquè és crític per donar la forma final del polímer, en aquest cas en forma de cilindres.
- El cilindre es traspassa a la superfície plana d'un vidre de rellotge, i es deixa assecar tota la nit.
- Es deixa el polímer amb una gran quantitat d'aigua mili-Q (3-4 litres, amb recanvis) fins que no quedi clorur sòdic a dintre del polímer. En una observació visual d'un recanvi d'aigua es veu clarament la dissolució de clorur sòdic.
- Es deixen assecar les matrius durant 12-24h.
- Es congelen les matrius a -80°C per poder-les liofilitzar per tal de poder extreure totes les restes del dissolvent orgànic.
- S'emmagatzemen les matrius a -20°C per a la seva conservació.
- Per utilitzar-les s'han de tallar amb un diàmetre determinat. S'utilitzen "sacabocados" BIOPSY PUNCH que generen cilindres de PLGA.

8.7.8 FABRICACIÓ DE MATRIUS DE FIBRINA

El protocol de fabricació es pot realitzar per a les dues fibrines utilitzades al llarg del capítol, la fibrina A (concentració de proteïna coagulable de 80 mg/ml de polímer a gelificar i de Trombina humana de 500 IU/ml d'agent gelificant) o la fibrina B (concentració de proteïna coagulable de 130 mg/ml de polímer a gelificar i de Trombina humana de 45 mg/ml d'agent gelificant). S'ha de tenir en compte a l'hora de manipular el fibrinogen (proteïna coagulable) que el de la fibrina B és més dens. El protocol, calculat i indicat per a la realització de 10 polímers, tot i l'obtenció només entre 6 i 8 dels mateixos degut a les pèrdues obtingudes durant el procés, es mostra a continuació:

- Amb una micropipeta i una punta estèril s'agafen 0,5 ml de fibrinogen i es posen en un eppendorf estèril.
- S'agafa el volum necessari de la suspensió cel·lular per tenir $2,12 \cdot 10^6$ cèl·lules totals. Es centrifuguen tantes vegades com sigui necessari fins a obtenir un pèl·let en un eppendorf estèril. Aquestes centrifugacions es realitzen de 10 minuts i a 500g.
- Es resuspèn el pèl·let de cèl·lules, s'afegeix a l'eppendorf on es té fibrinogen i es barreja utilitzant la mateixa micropipeta fins a tenir una barreja homogènia. Al barrejar en compte amb la formació de bombolles i, en cas d'obtenir-ne al final, realitzar un pols de centrifugat.
- En dues plaques de 6 pous es posen a cada pou 50 μ l de la barreja de fibrinogen amb les cèl·lules, utilitzant una micropipeta.
- A sobre de la solució anterior es posen 50 μ l de trombina a poc a poc per evitar la deformació de la gota de la barreja de fibrinogen amb les cèl·lules, deformacions que crearien forats al polímer resultant.
- Es deixa polimeritzar durant 10 minuts i s'afegeix a cada pou 3 ml del medi corresponent.

8.7.8.1 DISGREGACIÓ DELS POLÍMERS DE FIBRINA

Per tal de poder analitzar genèticament els cultius tridimensionals en polímers de fibrina, cal efectuar una disgregació dels mateixos per tal de poder obtenir les cèl·lules en solució. Aquest protocol es descriu a continuació:

- Extreure el medi de cultiu del pou on es troba el polímer a disgregar.
- Netejar amb PBS 0,1 M.
- Addicionar 900 μ l de tripsina 1x i incubar a 37°C
- Passats aproximadament uns 20 minuts, anar controlant mitjançant un microscopi invertit de contrast de fases fins que s'observi la completa disgregació del polímer.
- Parar l'acció de la tripsina amb 2 ml de medi de cultiu corresponent amb un 10% de sèrum.

8.8 CÀLCULS

Al llarg del treball s'han anat realitzant un seguit de càlculs, ja sigui pel càlcul de paràmetres del cultiu cel·lular, com la velocitat màxima de creixement, velocitats específiques de consum de glucosa i de producció de làctic i temps de duplicació, o pel càlcul d'altres paràmetres, com per exemple el mòdul d'elasticitat dels polímers que s'han provat. En algun dels casos, per a una millor comprensió dels resultats, ha resultat interessant indicar la metodologia de càlcul en l'apartat corresponent o bé en un altre apartat dins d'aquest capítol de materials i mètodes.

8.8.1 VELOCITAT MÀXIMA DE CREIXEMENT I TEMPS DE DUPLICACIÓ

En la fase de creixement exponencial d'un cultiu cel·lular, on la velocitat de creixement és constant i igual a la màxima velocitat de creixement a la que pot créixer el cultiu, la relació entre la concentració cel·lular i el temps de cultiu es pot expressar amb les fórmules següents (l'equació 8.6 i l'equació 8.7, on s'han aplicat el logaritme neperià a cada costat de l'equació 8.6).

$$Cc = Cc_o \cdot \exp(\mu_{m\grave{a}x} \cdot t) \quad [\text{Eq. 8.6}]$$

$$\ln(Cc) = \mu_{m\grave{a}x} \cdot t + \ln(Cc_o) \quad [\text{Eq. 8.7}]$$

on

Cc és la concentració cel·lular (Cc_o indica la concentració cel·lular inicial)

$\mu_{m\grave{a}x}$ és la màxima velocitat de creixement pel cultiu en qüestió

t és el temps de cultiu

Per tant, l'obtenció de la velocitat màxima de creixement es pot realitzar de dues maneres diferents. Per una banda, a partir de la representació de la concentració cel·lular en front el temps de cultiu (figura 8.8, eix de l'esquerra) es pot efectuar un ajust exponencial en la zona de creixement exponencial (equació 8.6), descartant els punts inicials que es troben en fase de latència i els punts finals en el que el cultiu ja es troba limitat (en ambdós casos el cultiu no creix a la màxima velocitat de creixement i, per tant, no interessen).

Per altra banda, la realització d'un ajust exponencial no és sempre possible realitzar-la, de manera que, representant els valors del logaritme neperià de la concentració cel·lular respecte el temps de cultiu (figura 8.8, eix de la dreta), es pot obtenir el valor de la velocitat màxima de creixement a partir d'un ajust lineal de

les dades (equació 8.7). Altra vegada, cal descartar tant els punts inicials que es troben en fase de latència com els punts finals en el que el cultiu ja es troba limitat. A continuació a la figura 8.8, es mostra un exemple de càlcul de la velocitat màxima de creixement en un cultiu de cèl·lules vero, per a ambdues metodologies.

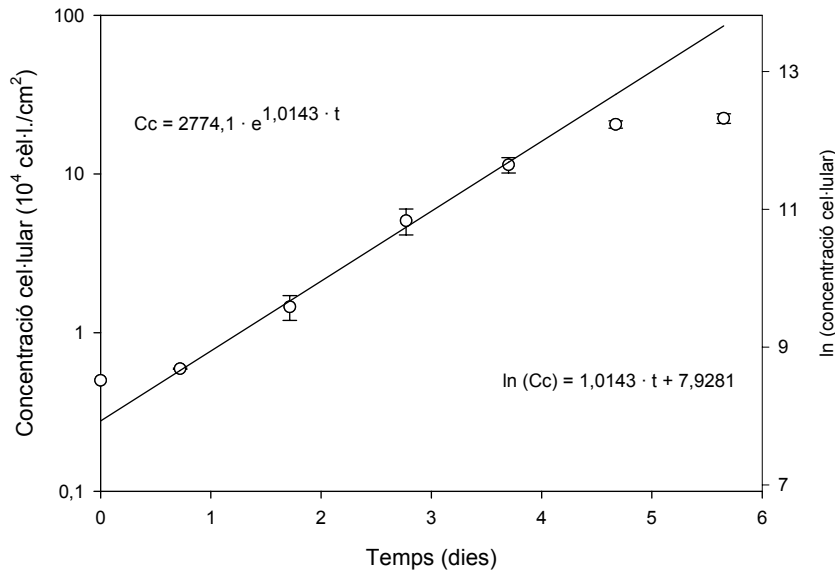


Figura 8.8 Exemple de càlcul de la velocitat màxima de creixement per un cultiu de cèl·lules vero, a partir d'un ajust exponencial directament de les dades de concentració cel·lular (eix i fórmula de l'esquerra) o a partir d'un ajust lineal de les dades del logaritme neperià de les mesures de concentració cel·lular (eix i fórmula de la dreta).

En ambdós casos, s'obté el mateix valor de la màxima velocitat de creixement que, per a aquest cas, és de $1,0143 \text{ d}^{-1}$. Tot i ser un dels paràmetres més importants a obtenir per un cultiu cel·lular, per a poder-nos fer una idea del que representa, és recomanable el càlcul del temps de duplicació corresponent, que és el temps que tarda el cultiu en doblar un cop la concentració cel·lular, i es pot calcular a partir de l'equació 8.8. En aquest exemple, el temps de duplicació corresponent a una velocitat de $1,0143 \text{ d}^{-1}$, equival a 0,68 dies (16,4 hores).

$$t_{\text{dup}} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{màx}}} \quad [\text{Eq. 8.8}]$$

on

t_{dup} és el temps de duplicació

$\mu_{\text{màx}}$ és la màxima velocitat de creixement pel cultiu en qüestió

8.8.2 VELOCITATS ESPECÍFIQUES DE CONSUM I PRODUCCIÓ DE METABOLITS

Per tal de calcular les velocitats específiques de consum de glucosa i de producció d'àcid làctic en cultius de cèl·lules animals, s'utilitzen les següents equacions (equacions 8.9 i 8.10), provinents dels balanços de substrats i productes en cultius animals.

$$\Delta S = -q_s \cdot ICV \quad [\text{Eq. 8.9}]$$

$$\Delta P = q_p \cdot ICV \quad [\text{Eq. 8.10}]$$

on

ΔS és el consum acumulat de glucosa (mesurada en μmols),

ΔP és la producció acumulada d'àcid làctic (mesurada en μmols),

ICV és la integral de cèl·lules viables (mesurada en $10^6 \text{ cèl·l.} \cdot \text{dia}$), que es calcula de la següent manera:

$$ICV_n = \int_0^n X_v t = \sum_{i=0}^{n-1} [X_{vm,i} \cdot (t_{i+1} - t_i)] \quad [\text{Eq. 8.11}]$$

on

$X_{vm,i}$ és la mitjana de les cèl·lules viables en interval de temps entre t_{i+1} i t_i .

Per tant, a partir de la representació dels consums acumulats de glucosa i de làctic respecte la integral de cèl·lules viables al llarg d'un cultiu cel·lular, es podran obtenir les velocitats específiques, tant de consum de glucosa com de producció de làctic, mesurades en $\mu\text{mols} / (10^6 \text{ cèl·lules} \cdot \text{dia})$. A la figura 8.9 es poden observar les gràfiques de consum de glucosa (esquerra) i de producció de làctic (dreta) respecte la integral de cèl·lules viables per a un dels cultius analitzats al llarg del treball. Amb els pendents de les rectes obtingudes ja s'obté els valors de q_s i q_p de les equacions 8.9 i 8.10.

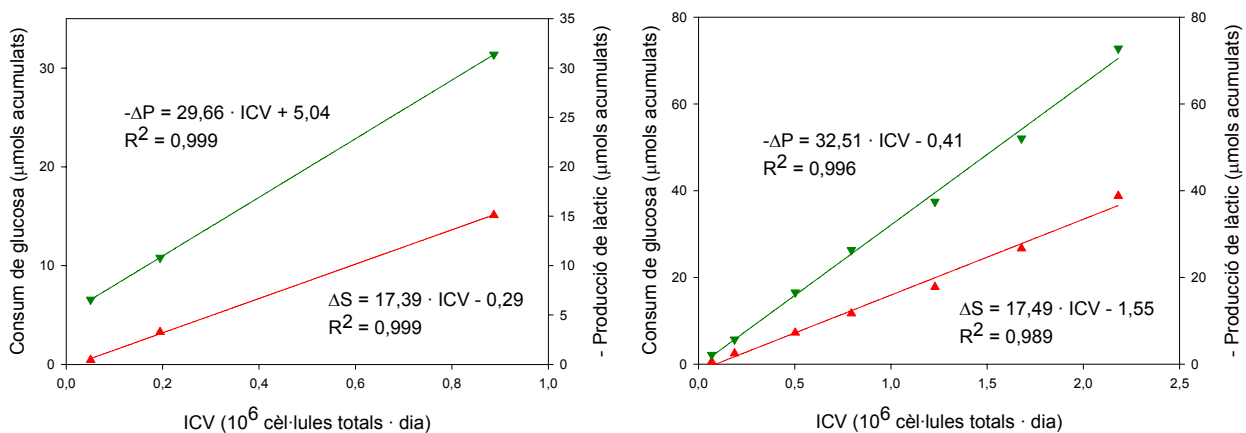


Figura 8.9 Velocitats específiques de consum i producció de metabolits per les hMSC en medi DMEM + 10 % sèrum AB. Esquerra vero dreta hMSC.

8.8.3 PROPIETATS MECÀNIQUES DELS POLÍMERS

Durant el capítol d'aplicacions dels sistemes de mesura en línia de la concentració cel·lular en teràpies tissulars, s'ha d'efectuar la tria del polímer idoni per a la regeneració, tant condrocitària (apartat 6.2.3) com cardíaca (apartat 6.3.3), a partir de la mesura del mòdul elàstic dels diferents candidats. Per tal de mesurar aquest mòdul elàstic, s'utilitza l'estimulador mecànic descrit a l'apartat 8.5.4, que permet l'obtenció dels diagrames de força aplicada per % de compressió obtinguda, necessaris pel seu càlcul. Per a obtenir els diagrames, s'han de passar les dades obtingudes de l'estimulador amb les equacions següents (equacions 8.12 i 8.13).

$$Força \left(\frac{g}{mm^2} \right) = Força (g) \times \frac{1}{Àrea (mm^2)} \quad [Eq. 8.12]$$

$$Compressió (\%) = Compressió (mm) \times \frac{1}{L (mm)} \quad [Eq. 8.13]$$

on

Força (g) és el valor de força aplicada al polímer que ens dona l'estimulador mecànic

Àrea (mm²) és el valor de l'àrea transversal del polímer (cara en la que s'aplica la força)

Compressió (mm) és el valor de compressió obtingut a l'aplicar la força i el dona l'estimulador mecànic

L (mm) és la longitud del polímer (la longitud perpendicular a l'àrea on s'aplica la força)

La Força (g/mm²) i Compressió (%) són els valors de força aplicada i % de compressió obtinguda a utilitzar en els diagrames per a la mesura del mòdul elàstic (exemple exposat al corresponent apartat, l'apartat 6.2.3, a la figura 6.23). Un cop es disposa d'aquest diagrama, pel càlcul del mòdul només s'ha de determinar el pendent de la zona lineal (que indica la zona i capacitat elàstica del polímer) i aplicar la fórmula següent (equació 8.14).

$$Pendent \left(\frac{g}{mm^2} \right) \times 9,81 \left(\frac{m}{s^2} \right) \times \frac{1kg}{1000g} = E \left(\frac{Kg \times m}{s^2 \times mm^2} \right) = E \left(\frac{N}{mm^2} \right) \quad [Eq. 8.14]$$

CAPÍTOL 9

BIBLIOGRAFIA

Abercrombie, M. i Ambrose, E. J. 1962. The surface properties of cancer cells: a review. *Cancer Res.* 22:525-548.

Abtech Scientific. <http://www.abtechsci.com>.

Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G. i Dequeker, J. 1998. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology.* 139:663-670.

Aguilar, J. S.; Held, K. S. i Wagner, E. K. 2007. Herpes simplex virus type 1 shows multiple interactions with sulfonated compounds at binding, penetration, and cell-to-cell passage. *Virus Genes.* 34:241-248.

Altamirano, C.; Cairo, J. J. i Gòdia, F. 2001a. Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control. *Biotechnology and Bioengineering.* 76:351-360.

Altamirano, C.; Illanes, A.; Casablanca, A.; Gàmez, X.; Cairo, J. J. i Gòdia, C. 2001b. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnology Progress.* 17:1032-1041.

Altamirano, C.; Paredes, C.; Cairo, J. J. i Gòdia, F. 2000. Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress.* 16:69-75.

Altman, G.; Horan, R.; Martin, I.; Farhadi, J.; Stark, P.; Volloch, V.; Vunjak-Novakovic, G; Richmond, J. i Kaplan, D. L. 2001. Cell differentiation by mechanical stress. *The FASEB Journal.* 16:270-272.

Amao, Y. 2003. Probes and Polymers for Optical Sensing of Oxygen. *Microchimica Acta.* 143:1-12.

Amao, Y.; Ishikawa, Y. i Okura, I. 2001a. Green luminescent iridium(III) complex immobilized in fluoropolymer film as optical oxygen-sensing material. *Analytica Chimica Acta.* 445:177-182.

Amao, Y.; Miyashita, T. i Okura, I. 2001b. Metalloporphyrins immobilized in styrene-trifluoroethyl-methacrylate copolymer film as an optical oxygen sensing probe. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines.* 5:433-438.

Amersham, Biosciences. 2005. Microcarrier cell culture: Principles and methods. GE Healthcare.

- Anderson, J. M. i Shive, M. S. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 28:5-24.
- Antonitsis, P.; Ioannidou-Papagiannaki, E.; Kaidoglou, A.; Charokopos, N.; Kalogeridis, A.; Kouzi-Koliakou, K.; Kyriakopoulou, I.; Klonizakis, I. i Papakonstantinou, C. 2008. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Thoracic and Cardiovascular Surgeon*. 56:77-82.
- Antonitsis, P.; Ioannidou-Papagiannaki, E.; Kaidoglou, A. i Papakonstantinou, C. 2007. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. 6:593-597.
- Arain, S.; John, G. T.; Krause, C.; Gerlach, J.; Wolfbeis, O. S. i Klimant, I. 2006. Characterization of microtiterplates with integrated optical sensors for oxygen and pH, and their applications to enzyme activity screening, respirometry, and toxicological assays. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 113:639-648.
- Arthritis Care. 2007. The impact of Arthritis (statistics). *Arthritis Care Factsheet*.
- Asami, K.; Gheorghiu, E. i Yonezawa, T. 1999. Real-time monitoring of yeast cell division by dielectric spectroscopy. *Biophysical Journal*. 76:3345-3348.
- Asami, K.; Hanai, T. i Koizumi, N. 1977. Dielectric properties of yeast cells: effect of some ionic detergents on the plasma membranes. *Journal of Membrane Biology*. 34:145-156.
- Asami, K. i Yonezawa, T. 1995. Dielectric analysis of yeast cell growth. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1245:99-105.
- Ausoni, S.; De Nardi, C.; Moretti, P.; Gorza, L. i Schiaffino, S. 1991. Developmental expression of rat cardiac troponin I mRNA. *Development*. 112:1041-1051.
- Austin, G. D.; Watson, R. W. J. i D'Amore, T. 1994. Studies of on-line viable yeast biomass with capacitance biomass monitor. *Biotechnology and Bioengineering*. 43:337-341.
- Bacon, J. R. i Demas, J. N. 1987. Determination of oxygen concentrations by luminescence quenching of a polymer-immobilized transition-metal complex. *Anal. Chem.* ; Vol/Issue: 59:23:Pages: 2780-2785.
- Bains, W.; Ponte, P.; Blau, H. i Kedes, L. 1984. Cardiac actin is the major actin gene product in skeletal muscle cell differentiation in vitro. *Molecular and Cellular Biology*. 4:1449-1453.
- Bambot, S. B.; Holavanahali, R.; Lakowicz, J. R.; Carter, G. M. i Rao, G. 1994. Phase fluorometric sterilizable optical oxygen sensor. *Biotechnology and Bioengineering*. 43:1139-1145.
- Barnes, D. i Sato, G. 1980. Methods for growth of cultured cells in serum free medium. *Analytical Biochemistry*. 102:255-270.
- Barry, F.; Boynton, R.E.; Liu, B. i Murphy, J.M. 2001. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental Cell Research*. 268:189-200.
- Bastiaansen-Jenniskens, Y. M.; Koevoet, W.; de Bart, A. C. W.; van der Linden, J. C.; Zuurmond, A. M.; Weinans, H.; Verhaar, J. A. N.; van Osch, G. J. V. M. i DeGroot, J. 2008. Contribution of collagen network features to functional properties of engineered cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 16:359-366.
- Beck, K. i Brodsky, B. 1998. Supercoiled protein motifs: The collagen triple-helix and the $\pm$ - helical coiled coil. *Journal of Structural Biology*. 122:17-29.

- Behrendt, U.; Koch, S.; Gooch, D. D.; Steegmans, U. i Comer, M. J. 1994. Mass spectrometry: A tool for on-line monitoring of animal cell cultures. *Cytotechnology*. 14:157-165.
- Bentley, G.; Biant, L. C.; Carrington, R. W. J.; Akmal, M.; Goldberg, A.; Williams, A. M.; Skinner, J. A. i Pringle, J. 2003. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*. 85:223-230.
- Berger, H. J.; Prasad, S. K.; Davidoff, A. J.; Pimental, D.; Ellingsen, O.; Marsh, J. D.; Smith, T. W. i Kelly, R. A. 1994. Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 266.
- Berman, P. W. i Lasky, L. A. 1985. Engineering glycoproteins for use as pharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*. 3:51-53.
- Berndt, K. W. i Lakowicz, J. R. 1992. Electroluminescent lamp-based phase fluorometer and oxygen sensor. *Analytical Biochemistry*. 201:319-325.
- Berry, J. M.; Barnabe, N.; Coombs, K. M. i Butler, M. 1999. Production of reovirus type-1 and type-3 from vero cells grown on solid and macroporous microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*. 62:12-19.
- Bertola, L. D.; Ott, E. B.; Griepsma, S.; Vonk, F. J. i Bagowski, C. P. 2008. Developmental expression of the alpha-skeletal actin gene. *BMC Evolutionary Biology*. 8.
- Bing, R. J.; Binder, T.; Pataricza, J.; Kibira, S. i Shankar Narayan, K. 1991. The use of microcarrier beads in the production of endothelium-derived relaxing factor by freshly harvested endothelial cells. *Tissue and Cell*. 23:151-159.
- Bittner, C.; Wehnert, G. i Scheper, T. 1998. In situ microscopy for on-line determination of biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 60:24-35.
- Blanc, A.; Tran-Khanh, N.; Fillion, D. i Buschmann, M. D. 2005. Optimal processing method to obtain four-color confocal fluorescent images of the cytoskeleton and nucleus in three-dimensional chondrocyte cultures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 53:1171-1175.
- Blute, T.; Gilles, T. i Dale, B. 1988. Cell density measurements in hollow fiber bioreactors. *Biotechnology Progress*. 4:202-209.
- Bone, A. J. i Swenne, I. 1982. Microcarriers: A new approach to pancreatic islet cell culture. *In Vitro*. 18:141-148.
- Borkholder, D. A. 1998. Impedance based sensors. Cell based biosensors using microelectrodes, cap. 7. Tesi Doctoral. Stanford University.
- Borst, H. G.; Haverich, A.; Walterbusch, G. i Maatz, W. 1982. Fibrin adhesive: An important hemostatic adjunct in cardiovascular operations. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 84:548-553.
- Bosnakovski, D.; Mizuno, M.; Kim, G.; Ishiguro, T.; Okumura, M.; Iwanaga, T.; Kadosawa, T. i Fujinaga, T. 2004. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Experimental Hematology*. 32:502-509.
- Bourne, J.R.; Morucci, J. P.; Valentinuzzi, M. E.; Rigaud, B.; Felice, C. J.; Chauveau, N. i Marsili, P.M. 1996. Bioelectrical Impedance Techniques in Medicine. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. 24.
- Bousse, Luc. 1995. Whole cell biosensors. In: Proceedings of the 1995 8th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators and Eurosensors IX. Part 1 (of 2);IEEE. Stockholm, Sweden. 483-486.

- Bragós, R. 1997. Contribució a la caracterització de teixits i sistemes biològics mitjançant tècniques d'espectroscòpia d'impedància elèctrica. Tesis Doctoral. UPC.
- Bragós, R.; Gàmez, X.; Cairo, J.; Riu, P. J. i Gòdia, F. 1999. Biomass monitoring using impedance spectroscopy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 299-305.
- Brands, R.; van Scharrenburg, G. J. M.; Palache, A. M. i Influvac, A. 1997. Safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture based influenza vaccine. *Animal Cell Technology*:165-167.
- Breckenridge, L. J.; Wilson, R. J. A.; Connolly, P.; Curtis, A. S. G.; Dow, J. A. T.; Blackshaw, S. E. i Wilkinson, C. D. W. 1995. Advantages of using microfabricated extracellular electrodes for in vitro neuronal recording. *Journal of Neuroscience Research*. 42:266-276.
- British Heart Foundation Statistics Website. 2008. <http://www.heartstats.org/topic.asp?id=753>.
- Broday, L.; Lee, Y. W. i Costa, M. 1999. 5-azacytidine induces transgene silencing by DNA methylation in Chinese hamster cells. *Molecular and Cellular Biology*. 19:3198-3204.
- Burgeson, R. E. i Hollister, D. W. 1979. Collagen heterogeneity in human cartilage: Identification of several new collagen chains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 87:1124-1131.
- Bursac, N.; Papadeki, M.; Cohen, R. J.; Schoen, F. J.; Eisenberg, S. R.; Carrier, R.; Vunjak-Novakovic, G i Freed, L. E. 1999. Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *The American Physiological Society*. 277:433-444.
- Butler, M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68:283-291.
- Caminal, M. 2006. Estudi d'optimització de la font cel·lular i el suport per a la regeneració de cartilag hialí. Master-Tesis.
- Camplejohn, K. L. i Allard, S. A. 1988. Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry and Cell Biology*. 89:185-188.
- Campmajó, C.; Cairo, J. J.; Sanfeliu, A.; Martinez, E.; Alegret, S. i Gòdia, F. 1994. Determination of ammonium and L-glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis. *Cytotechnology*. 14:177-182.
- Cannizzaro, C.; Tandon, N.; Figallo, E.; Park, H.; Gerecht, S.; Radisic, M.; Elvassore, N. i Vunjak-Novakovic, G. 2007. Practical aspects of cardiac tissue engineering with electrical stimulation. *Methods in molecular medicine*. 140:291-307.
- Caplan, A.I. 1994. The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery*. 21: 429-435.
- Carraway, E. R.; Demas, J. N.; DeGraff, B. A. i Bacon, J. R. 1991. Photophysics and photochemistry of oxygen sensors based on luminescent transition-metal complexes. *Analytical Chemistry*. 63:337-342.
- Casas, O.; Bragós, R.; Riu, P. J.; Rosell, J.; Tresánchez, M.; Warren, M.; Rodriguez-Sinovas, A.; Carreño, A. i Cinca, J. 1999. In vivo and in situ ischemic tissue characterization using electrical impedance spectroscopy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51-58.
- Casas, O.; Rosell, J.; Bragós, R.; Lozano, A. i Riu, P. J. 1996. A parallel broadband real-time system for electrical impedance tomography. *Physiological Measurement*. 17.
- Cervera, L. 2008. Anàlisi de la regeneració de miocardi a partir de cèl·lules mare mesenquimals. Master-Tesis.

- Chalmers, J. J. 1994. Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnology*. 15:311-320.
- Charlesworth, J. M. i Gan, T. H. 1996. Kinetics of quenching of ketone phosphorescence by oxygen in a glassy matrix. *Journal of Physical Chemistry*. 100:14922-14927.
- Charlesworth, John M. 1994. Optical sensing of oxygen using phosphorescence quenching. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 22:1-5.
- Chen, X.; Aledia, A.S.; Ghajar, C.M.; Griffith, C.K.; Putnam, A.J.; Hughes, C.C.W. i George, S.C. 2008. Prevascularization of a fibrin-based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature. *Tissue engineering. Part A*. 14:1-9.
- Chicurel, M. E.; Chen, C. S. i Ingber, D. E. 1998. Cellular control lies in the balance of forces. *Current Opinion in Cell Biology*. 10:232-239.
- Choi, M. M. F. i Xiao, D. 2000. Single standard calibration for an optical oxygen sensor based on luminescence quenching of a ruthenium complex. *Analytica Chimica Acta*. 403:57-65.
- Clar, C.; Cummins, E.; McIntyre, L.; Thomas, S.; Lamb, J.; Bain, L.; Jobanputra, P. i Waugh, N. 2005. Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: Systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*. 9.
- Clark, J. M. i Hirtenstein, M. D. 1981. High yield culture of human fibroblasts on microcarriers: a first step in production of fibroblast-derived interferon (human beta interferon). *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 1:391-400.
- Clark, L.C.; 1959. US Patent n° 2,913,386.
- Cole, K. S. i Cole, R.H. 1941. Dispersion and absorption in dielèctrics. *Journal of Chemical Physics*. 9:341-351.
- Cooper, T.A. i Ordahl, C.P. 1984. A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science*. 226:979-982.
- Currie, L. J.; Sharpe, J. R. i Martin, R. 2001. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: A review. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 108:1713-1726.
- Davey, C. L.; Davey, H. M. i Kell, D. B. 1992. On the dielectric properties of cell suspensions at high volume fractions. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 28:319-340.
- De Blasio, B. F.; Laane, M.; Walmann, T. i Giaever, I. 2004. Combining optical and electrical impedance techniques for quantitative measurement of confluence in MDCK-I cell cultures. *BioTechniques*. 36:650-662.
- De Tremblay, M.; Perrier, M.; Chavarie, C. i Archambault, J. 1993. Fed-batch culture of hybridoma cells: Comparison of optimal control approach and closed loop strategies. *Bioprocess Engineering*. 9:13-21.
- Di Lullo, G. A.; Sweeney, S. M.; Korkko, J.; Ala-Kokko, L. i San Antonio, J. D. 2002. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*. 277:4223-4231.
- Dorresteyn, R. C.; Harbrink, K. N.; Gooljer, C. D.; Tramper, J. i Beuvery, E. C. 1996. On-line estimation of the biomass activity during animal-cell cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*. 50:206-214.
- Douglas, P. i Eaton, K. 2002. Response characteristics of thin film oxygen sensors, Pt and Pd octaethylporphyrins in polymer films. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 82:200-208.

- Drago, G. P.; Marchesi, M. i Ridella, S. 1984. The frequency dependence of an analytical model of an electrically stimulated biological structure. *Bioelectromagnetics*. 5:47-62.
- Eaton, K.; Douglas, B. i Douglas, P. 2004. Luminescent oxygen sensors: Time-resolved studies and modelling of heterogeneous oxygen quenching of luminescence emission from Pt and Pd octaethylporphyrins in thin polymer films. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 97:2-12.
- Ebashi, S. i Endo, M. 1968. Calcium ion and muscle contraction. *Progrgrams on Biophysics and Molecular Biology*. 18:123-183.
- Eschenhagen, T; Fink, C.; Remmers, U.; Scholz, H.; Wattchow, J.; Weil, J.; Zimmermann, W. H.; Dohmen, H. H.; Schäfer, H.; Bishopric, N. *i altres*. 1997. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *The FASEB Journal*. 11:683-694.
- EULAR. 2004. PARE Manifesto Steering Group. The European League Against Rheumatism.
- Eyer, K. i Heinzle, E. 1996. On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:277-283.
- Eyrich, D.; Wiese, H.; Maier, G; Skodacek, D.; Appel, B.; Sarhan, H.; Tessmar, J.; Staudenmaier, R.; Wenzel, M. M.; Goeferich, A. *i altres*. 2007. In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Engineering*. 13:2207-2218.
- Farré, J. 2005. Identificació, caracterització i inducció cardiomiogènica de cèl·lules mare mesenquimals humanes: un llinatge cel·lular amb potencialitat per a la regeneració cardíaca. Master-Tesis.
- Farré, J. 2008. Cèl·lules mare mesenquimals humanes: aïllament, caracterització i potencialitat per a la regeneració cardíaca. Tesi Doctoral. UAB.
- Fehrenbach, R.; Comerbach, M. i Pêtre, J. O. 1992. On-line biomass monitoring by capacitance measurement. *Journal of Biotechnology*. 23:303-314.
- Fischkoff, S. i Vanderkooi, J. M. 1975. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene. *Journal of General Physiology*. 65:663-676.
- Fisher, L. W.; Termine, J. D. i Young, M. F. 1989. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *Journal of Biological Chemistry*. 264:4571-4576.
- Fleishaker, R.J. i Sinskey, A.J. 1981. Oxygen demand and supply in cell culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 12:193-197.
- Frazzati-Gallina, N. M.; Paoli, R. L.; Mourafo-Fuches, R. M.; Jorge, S. A. C. i Pereira, C. A. 2001. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *Journal of Biotechnology*. 92:67-72.
- Freed, L. E.; Marquis, J. C.; Nohria, A.; Emmanuel, J.; Mikos, A. G. i Langer, R. 1993. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 27:11-23.
- Frenz, D. A.; Galinovic-Schwartz, V.; Liu, W.; Flanders, K. C. i Van de Water, T. R. 1992. Transforming growth factor β 1 is an epithelial-derived signal peptide that influences otic capsule formation. *Developmental Biology*. 153:324-336.
- Freshney, R. I. 1985. Animal cell culture: a practical approach. IRL Press. Oxford, Washington DC.

- Freshney, R. I. 1994. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Wiley-Liss, Inc. New York.
- Fricke, H. 1932. The theory of electrolytic polarization. *Philosophical Magazine*:310-318.
- Fukuda, K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs*. 25:187-193.
- Gálvez, J. 2006. Desenvolupament d'un sistema per al seguiment de la concentració i l'activitat cel·lulars en cultius de cèl·lules animals no adherents en minibioreactor. Master-Tesis.
- Gámez, X. 2000. Estudi d'estratègies de cultiu per a cèl·lules animals, basades en eines d'instrumentació i control. Tesi Doctoral. UAB.
- Gao, Y.; Liu, W.; Gao, H.; Qi, X.; Lin, H.; Wang, X. i Shen, R. 2008. Effective inhibition of infectious bursal disease virus replication in vitro by DNA vector-based RNA interference. *Antiviral Research*. 79:87-94.
- Geddes, L. A. 1996. Who introduced the tetrapolar method for measuring resistance and impedance?. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*. 15:133-134.
- Genovese, J.; Cortes-Morichetti, M.; Chachques, E.; Frati, G.; Patel, A. i Chachques, J. C. 2007. Cell based approaches for myocardial regeneration and artificial myocardium. *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2:121-127.
- Gjaever, I. i Keese, C. R. 1986. Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behavior in tissue culture. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 33:242-247.
- Giard, D. J.; Loeb, D. H. i Thilly, W. G. 1979. Human interferon production with diploid fibroblast cells grown on microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*. 21:433-442.
- Glassy, MC; Tharakan, JP i Chau, PC. 1988. Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*. 32:1015-1028.
- Goessler, U. R.; Bugert, P.; Bieback, K.; Sadick, H.; Verse, T.; Baisch, A.; Hörmann, K. i Riedel, F. 2005. In vitro analysis of matrix proteins and growth factors in dedifferentiating human chondrocytes for tissue-engineered cartilage. *Acta Oto-Laryngologica*. 125:647-653.
- Graf, H. i Schugerl, K. 1991. Some aspects of hybridoma cell cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35:165-175.
- Griffiths, Bryan i Thornton, Barry. 1981. Use of Microcarrier Culture for the Production of Herpes Simplex Virus (type 2) in MRC-5 Cells. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 32:324-329.
- Grigolo, B.; Roseti, L.; De Franceschi, L.; Piacentini, A.; Cattini, L.; Manfredini, M.; Faccini, R. i Facchini, A. 2005. Molecular and immunohistological characterization of human cartilage two years following autologous cell transplantation. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. 87:46-57.
- Grimnes, S. i Martinsen, O.G. 2000. Bioimpedance & bioelectricity basics. Academic Press.
- Guan, Y.; Evans, P. M. i Kemp, R. B. 1998. Specific heat flow rate: An on-line monitor and potential control variable of specific metabolic rate in animal cell culture that combines microcalorimetry with dielectric spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*. 58:464-477.
- Guo, X.; Wang, C.; Zhang, Y.; Xia, R.; Hu, M.; Duan, C.; Zhao, Q.; Dong, J.; Lu, J. i Song, Y.Q. 2004. repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into β -Tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Engineering*. 10:1818-1829.

- Hanson, M. A.; Ge, X.; Kostov, Y.; Brorson, K. A.; Moreira, A. R. i Rao, G. 2007. Comparisons of optical pH and dissolved oxygen sensors with traditional electrochemical probes during mammalian cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 97:833-841.
- Harris, C. M. i Kell, D. B. 1983. The radio-frequency dielectric properties of yeast cells measured with a rapid, automated, frequency-domain dielectric spectrometer. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 11:15-28.
- Harris, C. M.; Todd, R. W.; Bungard, S. J.; Lovitt, R. W; Morris, J. G. i Kell, D. B. 1987. Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimation of microbial biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 9:181-186.
- Hasted, J.B. 1973. *Aqueous Dielectrics*. Chapman and Hall. London.
- Hayward, L. J. i Schwartz, R. J. 1986. Sequential expression of chicken actin genes during myogenesis. *Journal of Cell Biology*. 102:1485-1493.
- Healy, G. M. i C., Parker R. 1961. *Methods of Tissue Culture*. In: P B., editor. 3a ed. New york: Hoeber, Inc.
- Hellman, K. B. i Nerem, R. M. 2007. Advancing Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Engineering*. 13:2823-2824.
- Heng, B. C.; Haider, H. Kh; Sim, E. K. W.; Cao, T. i Ng, S. C. 2004. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovascular Research*. 62:34-42.
- Herrmann, J. B.; Kelly, R. J. i Higgins, G. A. 1970. Polyglycolic acid sutures. Laboratory and clinical evaluation of a new absorbable suture material. *Archives of Surgery*. 100:486-490.
- Higareda, A. E.; Possani, L. D. i Ramírez, O. T. 1997. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 56:555-563.
- Holland, S. J.; Tighe, B. J. i Gould, P. L. 1986. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *Journal of Controlled Release*. 4:155-180.
- Hu, W. S. i Dodge, T. C. 1985. Cultivation of mammalian cells in bioreactors. *Biotechnology Progress*. 1:209-215.
- Hu, W. S.; Meier, J. i Wang, D. I. C. 1985. A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*. 27:585-595.
- Huang, X.; Nguyen, D.; Greve, D. W. i Domach, M. M. 2004. Simulation of microelectrode impedance changes due to cell growth. *IEEE Sensors Journal*. 4:576-583.
- Hunziker, E. B. 2002. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 10:432-463.
- IHC world. http://www.ihcworld.com/_protocols/antibody_protocols/collagen_type_II_chemicon.htm.
- Ingersoll, C. M. i Bright, F. V. 1997. Using sol-gel-based platforms for chemical sensors. *CHEMTECH*. 27:26-31.
- Instituto Nacional de Estadística. 2008. <http://www.ine.es/prensa/np490.pdf>.
- Jain, R. A. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 21:2475-2490.
- Janssen, P. M. L.; Lehnart, S. E.; Prestle, J. U. i Hasenfuss, G. 1999. Preservation of contractile characteristics of human myocardium in multi-day cell culture. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 31:1419-1427.

- Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L.; Schwartz, R. E.; Keene, C. D.; Ortiz-Gonzalez, X. R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M. i *altres*. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418:41-49.
- Johnson, F. A.; Craig, D. Q. M. i Mercer, A. D. 1997. Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 49:639-643.
- Johnson, P. C.; Mikos, A. G.; Fisher, J. P. i Jansen, J. A. 2007. Strategic Directions in Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. 13:2827-2837.
- Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M. i Yoo, J. U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research*. 238:265-272.
- Jorgensen, E.B.; Casablanco, A.; González, G. i Gòdia, F. 1997. On-line monitoring of glutamine and ammonium in mammalian-cell cultures. *Animal Cell technology: From Vaccines to Generic Medicine*. Netherlands 429-434.
- Kadiyala, S.; Young, R. G.; Thiede, M. A. i Bruder, S. P. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplantation*. 6:125-134.
- Kallos, M.S. i Behie, L.A. 1999. Inoculation and growth conditions for high-cell-density expansion of mammalian neural stem cells in suspension bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 63:473-483.
- Kang, S. W.; Jeon, O. i Kim, B. S. 2005. Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold, for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*. 11:438-447.
- Kang, S. W.; Yoon, J. R.; Lee, J. S.; Kim, H. J.; Lim, H. W.; Lim, H. C.; Park, J. H. i Kim, B. S. 2006. The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 17:925-939.
- Kannan, R. Y.; Salacinski, H. J.; Sales, K.; Butler, P. i Seifalian, A. M. 2005. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: A review. *Biomaterials*. 26:1857-1875.
- Karageorgiou, V. i Kaplan, D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 26:5474-5491.
- Karube, I. i Sode, K. 1991. Bioinstrumentation and Biosensors. In: D L Wise, editor. New York: Marcel Dekker 1-18.
- Kato, S.; Ivester, C. T.; Cooper Iv, G.; Zile, M. R. i McDermott, P. J. 1995. Growth effects of electrically stimulated contraction on adult feline cardiocytes in primary culture. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 268.
- Keith, B. D. 2008. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer*. 8.
- Kell, D. B.; Markx, G. H.; Davey, C. L. i Todd, R. W. 1990. Real-time monitoring of cellular biomass: Methods and applications. *Trends in Analytical Chemistry*. 9:190-194.
- Kijlstra, J.; Wegh, R.A. i Vanleeuwen, H.P. 1994. Impedance spectroscopy of colloids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 366:37-42.
- Kilburn, D. G.; Fitzpatrick, P.; Blake-Coleman, B. C.; Clarke, D. J. i Griffiths, J. 1989. On-line monitoring of cell mass in mamalian cell cultures by acoustic densitometry. *Biotechnology and Bioengineering*. 33:1379-1384.

- Kinouchi, Y.; Iritani, T.; Morimoto, T. i Ohyama, S. 1997. Fast in vivo measurements of local tissue impedances using needle electrodes. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 35:486-492.
- Kistner, O.; Barrett, P. N.; Mundt, W.; Reiter, M.; Schober-Bendixen, S. i Dorner, F. 1998. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine*. 16:960-968.
- Kistner, O.; Howard, M. K.; Spruth, M.; Wodal, W.; Brühl, P.; Gerencer, M.; Crowe, B. A.; Savidis-Dacho, H.; Livey, I.; Reiter, M. i altres. 2007. Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses. *Vaccine*. 25:6028-6036.
- Klimant, I. i Wolfbeis, O. S. 1995. Oxygen-sensitive luminescent materials based on silicone-soluble ruthenium diimine complexes. *Analytical Chemistry*. 67:3160-3166.
- Kofidis, T.; Akhayari, P.; Boublik, J.; Theodoru, P.; Martin, U.; Ruhparwar, A.; Fischer, S.; Eschenhagen, T.; Kubis, H. P.; Kraft, T. i altres. 2002. In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 124:63-69.
- Kon, E.; Muraglia, A.; Corsi, A.; Bianco, P.; Marcacci, M.; Martin, I.; Boyde, A.; Ruspantini, I.; Chistolini, P.; Rocca, M. i altres. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of Biomedical Materials Research*. 49:328-337.
- Konstantinov, K.; Chuppa, S.; Sajan, E.; Tsai, Y.; Yoon, S. i Golini, F. 1994. Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures. *Trends in Biotechnology*. 12:324-333.
- Konstantinov, K.; Pambayun, R.; Matanguihan, R.; Yoshida, T.; Perusich, C. i Hu, W-S. 1992. On-line monitoring of hybridoma cell growth using a laser turbidity sensor. *Biotechnology and Bioengineering*. 40:1337-1342.
- Kostov, Y. i Rao, G. 2003. Ratio measurements in oxygen determinations: Wavelength ratiometry, lifetime discrimination, and polarization detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 90:139-142.
- Kowolenko, M.; Keese, C. R.; Lawrence, D. A. i Giaever, I. 1990. Measurement of macrophage adherence and spreading with weak electric fields. *Journal of Immunological Methods*. 127:71-77.
- Kuettner, K. E.; Aydelotte, M. B. i Thonar, E. J. M. A. 1991. Articular cartilage matrix and structure: A minireview. *Journal of Rheumatology*. 18:46-48.
- Kuncova, G. i Fialova, M. 1995. Optical oxygen sensor based on metallo-organic compound immobilized by sol-gel technique. *Biotechnology Techniques*. 9:175-178.
- Kurokawa, H.; Park, Y. S.; Iijima, S. i Kobayashi, T. 1994. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:95-103.
- Lakowicz, J. R. 1983. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum, editor. New York.
- Langer, R. i Vacanti, J. P. 1993. *Tissue Engineering*. Science. 260:920-926.
- Lanza, R.; Langer, R. i Vacanti, J. 2000. *Principles of tissue engineering*.
- Lark, M. W.; Bayne, E. K.; Flanagan, J.; Harper, C. F.; Hoerrner, L. A.; Hutchinson, N. I.; Singer, I. I.; Donatelli, S. A.; Weidner, J. R.; Williams, H. R. i altres. 1997. Aggrecan degradation in human cartilage: Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *Journal of Clinical Investigation*. 100:93-106.
- Lawrence, S. 2005. Biotech drug market steadily expands. *Nature Biotechnology*. 23:1466.

- Lecina, M.; de Gràcia, J.; Soley, A.; Vela, C.; Espunya, E.; Cairo, J. J. i Gòdia, F. 2004. On-line OUR measurements to monitor insect cell concentration activity and viral infection progress in bioreactors: time of action (TOA). Cell culture engineering abstract book.
- Leddy, H. A.; Awad, H. A. i Guilak, F. 2004. Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: Effects of scaffold material, time, and culture conditions. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 70:397-406.
- Lee, J. W.; Kim, Y. H.; Kim, S. H.; Han, S. H. i Hahn, S. B. 2004. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Medical Journal*. 45:41-47.
- Lee, S. K. i Okura, I. 1998. Photoluminescent determination of oxygen using metalloporphyrin-polymer sensing systems. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 54:91-100.
- Leonard, C. M.; Fuld, H. M.; Frenz, D. A.; Downie, S. A.; Massague, J. i Newman, S. A. 1991. Role of transforming growth factor- β in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: Stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- β and evidence for endogenous TGF- β -like activity. *Developmental Biology*. 145:99-109.
- Levin, Michael. 2002. Pharmaceutical Process Scale-up. I H Care, editor.
- Levine, D. W.; Wang, D. I. C. i Thilly, W. G. 1979. Optimization of growth surface parameters in microcarrier cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 21:821-845.
- Levine, D. W.; Wong, J. S.; Wang, D. I. C. i Thilly, W. G. 1977. Microcarrier cell culture: new methods for research scale application. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 3:149-155.
- Li, H.; Choudhary, S.K.; Milner, D.J.; Munir, M.I.; Kuisk, I.R. i Capetanaki, Y. 1994. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *Journal of Cell Biology*. 124:827-841.
- Li, H. P.; Liu, C. R. i Zhang, Y. L. 2007. Research and application of bone marrow mesenchymal stem cells in medicine. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*. 11:5622-5625.
- Li, Q.; Muragaki, Y.; Ueno, H. i Ooshima, A. 1997. Stretch-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells and a possible involvement of local renin-angiotensin system and platelet-derived growth factor (PDGF). *Hypertension Research*. 20:217-223.
- Li, S.; Guan, J. L. i Chien, S. 2005. Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annual Review of Biomedical Engineering* 105-150.
- Li, X. M.; Ruan, F. C. i Wong, K. Y. 1993. Optical characteristics of a ruthenium(II) complex immobilized in a silicone rubber film for oxygen measurement. *The Analyst*. 118:289-292.
- Liga Bundesverband. 2001a. Rheuma bracht einse starke Stimmer. *Deutsche Rheuma*.
- Liga Bundesverband. 2001b. Zahlen und Fakten zu Rheuma. *Deutsche Rheuma*.
- Lin, J.; Takagi, M.; Qu, Y. i Yoshida, T. 2002. Possible strategy for on-line monitoring and control of hybridoma cell culture. *Biochemical Engineering Journal*. 11:205-209.
- Linnes, M. P.; Ratner, B. D. i Giachelli, C. M. 2007. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 28:5298-5306.

Liu, Y.; Chen, F.; Liu, W.; Cui, L.; Shang, Q.; Xia, W.; Wang, J.; Cui, Y.; Yang, G.; Liu, D. *i altres*. 2002. Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Engineering*. 8:709-721.

Lo, C. M.; Keese, C. R. i Giaever, I. 1995. Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophysical Journal*. 69:2800-2807.

Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P. i Darnell, J. 1995. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. New York.

Lysaght, M. J. i Hazlehurst, A. L. 2004. Tissue Engineering: The End of the Beginning. *Tissue Engineering*. 10:309-320.

M.A.T.E.S. 2007. Advancing Tissue Science and Engineering. Multi-Agency Tissue Engineering Science (MATES) Interagency Working Group (IWG).

Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Chichester, C. O. i Pittenger, M. F. 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Engineering*. 4:415-428.

MacMichel, G.; Armiger, W. B.; Lee, J. F. i Mutharasan, R. 1987. On-line measurement of hybridoma growth by culture fluorescence. *Biotechnology Techniques*. 1:213-218.

Mahdavi, V.; Cambers, A.P. i Nadal-Ginard, B. 1984. Cardiac α - and β - myosin heavy chain genes are organized in tandem. *Biochemistry*. 81:2626-2630.

Mahdavi, V.; Periasamy, M. i Nadal-Ginard, B. 1982. Molecular characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart. *Nature*. 297:659-664.

Maitra, B.; Dennis, J. E.; Nihai, M.; Laughlin, M. J.; Haynesworth, S. E. i Koc, O. N. 2000. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) contain highly proliferative small cells with tri-lineage mesenchymal differentiation potential. *Blood*. 98.

Makino, S.; Fukuda, K.; Miyoshi, S.; Konishi, F.; Kodama, H.; Pan, J.; Sano, M.; Takahashi, T.; Hori, S.; Abe, H. *i altres*. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 103:697-705.

Mallein-Gerin, F.; Garrone, R. i Van der Rest, M. 1991. Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes. *European Journal of Cell Biology*. 56:364-373.

Mallik, A; Pinkus, G. S. i Sheffer, S. 2002. Biopharma's capacity crunch. *The McKinsey Quarterly*: McKinsey & Company, Inc.

Mancuso, A.; Fernandez, E. J.; Blanch, H. W. i Clarck, D. S. 1990. A nuclear magnetic resonance technique for determining hybridoma cell concentration in hollow fiber bioreactors. *Bio/Technology*. 8:1282-1285.

Marcacci, M.; Zaffagnini, S.; Kon, E.; Visani, A.; Iacono, F. i Loreti, I. 2002. Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: Technical note. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 10:154-159.

Markx, G. H.; Davey, C. L. i Kell, D. B. 1991. The permittistat: a novel type of turbidostat. *Journal of General Microbiology*. 137:735-743.

Maruhashi, F.; Murakami, S. i Baba, K. 1994. Automated monitoring of cell concentration and viability using an image analysis system. *Cytotechnology*. 15:281-294.

Masters, John R. W. 2000. *Animal cell culture: a practical approach*. O U Press, editor.

- Matanguihan, R. M.; Konstantinov, K. B. i Yoshida, T. 1994. Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells. *Bioprocess Engineering*. 11:213-222.
- Maurer. 1986. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. A Freshney, editor. IRL Press. Oxford.
- McAdams, E. T. i Jossinet, J. 1995. Tissue impedance: a historical overview. *Physiological Measurement*. 16:A1-A13.
- Medawar, P. B. 1948. The Cultivation of Adult Mammalian Skin Epithelium in vitro. *Journal of Microscopic Science*:187-196.
- Mendoça, R.Z. i Pereira, C.A. 1998. Cell metabolism and medium perfusion in VERO cell cultures on microcarriers in a bioreactor. *Bioprocess Engineering*. 18:213-218.
- Mendoça, R.Z.; Prado, J.C.M. i Pereira, C.A. 1999. Attachment, spreading and growth of VERO cells on microcarriers for the optimization of large scale cultures. *Bioprocess Engineering*. 20:565-571.
- Miller, E. J. i Mathews, M. B. 1974. Characterization of notochord collagen as a cartilage type collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 60:424-430.
- Ministerio. 2004. Datos del Consejo de Europa. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Mishima, K.; Mimura, A. i Takahara, Y. 1991a. On-line monitoring of cell concentrations during yeast cultivation by dielectric measurements. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72:296-299.
- Mishima, K.; Mimura, A.; Takahara, Y.; Asami, K. i Hanai, T. 1991b. On-line monitoring of cell concentrations by dielectric measurements. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72:296-299.
- Mitra, P.; Keese, C. R. i Giaever, I. 1991. Electric measurements can be used to monitor the attachment and spreading of cells in tissue culture. *BioTechniques*. 11:504-510.
- Miyashita, T.; Chen, J.; Yuasa, M. i Mitsuishi, M. 1999. Fabrication of polymer organized thin films containing ruthenium complexes. *Polymer Journal*. 31:1121-1126.
- Montagnon, B. J. 1985. Inactivated polio vaccine: industrial production from micro-carrier Vero cells culture. *Tropical and Geographical Medicine*. 37.
- Nahapetian, A.T.; Thomas, J.N. i Thilly, W.G. 1986. Optimization of environment for high density vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites. *Journal of Cell Science*. 81:65-103.
- Neame, P. J. i Sandy, J. D. 1994. Cartilage aggrecan. Biosynthesis, degradation and osteoarthritis. *Journal of the Florida Medical Association*. 81:191-193.
- Nicholls, J.G.; Martin, A.R.; Wallace, B.G. i Fuchs, P.A. 2001. From neuron to brain. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- Nielsen, O.; Smith, G.; Weingartl, H.; Lair, S. i Measures, L. 2008. Use of a slam transfected vero cell line to isolate and characterize marine mammal morbilliviruses using an experimental ferret model. *Journal of Wildlife Diseases*. 44:600-611.

Nilsson, K.; Birnbaum, S.; Flygare, S.; Linse, L.; Schröder, U.; Jeppsson, U.; Larsson, P. O.; Mosbach, K. i Brodelius, P. 1983. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 17:319-326.

Nilsson, K.; Birnbaum, S. i Mosback, K. 1988. Microcarrier culture of recombinant Chinese hamster ovary cells for production of human immune interferon and human tissue-type plasminogen activator. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 27:366-371.

Norrgren, G.; Ebendal, T.; Gebb, C. i Wikström, D. 1983. The use of Cytodex 3 microcarriers and reduced-serum media for the production of nerve growth promoters from chicken heart cells. *Developments in Biological Standardization*. 55:43-51.

OCATT. 2006. Organització Catalana de Transplantaments.
http://www10.gencat.net/catsalut/ocatt/pdfs/Informe_donacio_2006_ca.pdf.

Ocean Optics. www.oceanoptics.com.

Odorico, J. S.; Kaufman, D. S. i Thomson, J. A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 19:193-204.

Oh, H.; Bradfute, S.B.; Gallardo, T.D.; Nakamura, T.; Gaussin, V.; Mishinag, Y.; Pocius, J.; Michael, L.I. H.; Behringer, R.R.; Garry, D.J. i altres. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of National Academic Science, USA*. 100:12313-12318.

Olsson, L. i Nielsen, J. 1997. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends in Biotechnology*. 15:517-522.

Ozturk, S. S.; Blackie, J. D.; Wu, P.; Taticek, R.; Konstantinov, K. B.; Matanguihan, C.; Tsai, Y.; Yoon, S.; Thrift, J. C. i Naveh, D. 1997a. On-line monitoring for consistent and optimal production of biologicals from mammalian cell cultures. In: M J T Carrondo, Griffiths, B. and Moreira, J. L. P., editor. *Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine*. Dordrecht, Netherlands 205-214.

Ozturk, S. S. i Palsson, B. O. 1990. Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. *Journal of Biotechnology*. 16:259-278.

Ozturk, S. S.; Thrift, J. C.; Blackie, J. D. i Naveh, D. 1997b. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 53:372-378.

Pallas-Areny, R. i Webster, J. G. 1993. AC instrumentation amplifier for bioimpedance measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 40:830-833.

Panyam, J. i Labhasetwar, V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55:329-347.

Papkovsky, Dmitri B. 1995. New oxygen sensors and their application to biosensing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. B29:213-218.

Papoutsakis, ET. 1991. Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. *Trends in Biotechnology*. 9:316-324.

Paredes, C.; Prats, E.; Cairo, J. J.; Azorín, F.; Cornudella, LI i Gòdia, F. 1999. Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology*. 30:85-93.

Pavlou, A i Reichert, J. 2004. Recombinant protein therapeutics - success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*. 22:1513-1519.

- Peris, D. 2007. Caracterització de cèl·lules mare adutes en cultius en monocapa i matrius tridimensionals. Master-Tesis.
- Peterson, J. I.; Fitzgerald, R. V. i Buckhold, D. K. 1984. Fiber-optic probe for in vivo measurement of oxygen partial pressure. *Analytical Chemistry*. 56:62-67.
- PhRMA. 2006. Survey: New medicines in development. Biotechnology. Pharmaceutical research and Manufacturers of America. <http://www.phrma.org/files/Biotech%202006.pdf>.
- Pittenger, M. F. i Martin, B. J. 2004. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circulation Research*. 95:9-20.
- Preininger, C.; Kilmant, I. i Wolfbels, O. S. 1994. Optical fiber sensor for biological oxygen demand. *Analytical Chemistry*. 66:1841-1846.
- Presens. <http://www.presens.com>.
- Prokop, A. 1981. Bioreactor design fundamentals: hydrodynamics, mass transfer, heat exchange, control and scale-up. *Acta Biotechnologica* 1. 3:269-278.
- Rabotyagova, O. S.; Cebe, P. i Kaplan, D. L. 2008. Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation. *Materials Science and Engineering C*. 28:1420-1429.
- Radisic, M.; Park, H.; Shing, H.; Consi, T.; Schoen, F. J.; Langer, R.; Freed, L. E. i Vunjak-Novakovic, G. 2004. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:18129-18134.
- Radke, S. M. i Alocilja, E. C. 2004. Design and fabrication of a microimpedance biosensor for bacterial detection. *IEEE Sensors Journal*. 4:434-440.
- Ramasamy, S.M. i Hurtubise, R.J. 1983. A study of the interactions of benzo[f]quinoline, quinoline and phenanthrene by infrared and reflectance spectroscopy and the relationship to room-temperature phosphorescence. *Analytica chimica acta*. 152:83-93.
- Reuveny, S.; Silberstein, L. i Shahar, A. 1982. DE-52 and DE-53 cellulose microcarriers. I. Growth of primary and established anchorage-dependent cells. *In Vitro*. 18:92-98.
- Reyes, M.; Lund, T.; Lenvik, T.; Aguiar, D.; Koodie, L. i Verfaillie, C. M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 98:2615-2625.
- Riha, G. M.; Lin, P. H.; Lumsden, A. B.; Yao, Q. i Chen, C. 2005. Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Annals of Biomedical Engineering*. 33:772-779.
- Roberts, A. B.; Anzano, M. A. i Wakefield, L. M. 1985. Type β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:119-123.
- Roberts, C. R. i Pare, P. D. 1991. Composition changes in human tracheal cartilage in growth and aging, including changes in proteoglycan structure. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 261.
- Rosell, J.; Viscasillas, J.; Riu, P.J.; Pallàs, R.; Murphy, D. i Rolfe, P. 1988. Tomografía de impedancia eléctrica. *Mundo electrónico*:132-187.
- Rosenberg, L. 1971. Chemical basis for the histological use of Safranin O in the study of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 53:69-82.

- Rosenberg, L. C.; Choi, H. U. i Tang, L. H. 1985. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *Journal of Biological Chemistry*. 260:6304-6313.
- Rosenzweig, Z. i Kopelman, R. 1995. Development of a submicrometer optical fiber oxygen sensor. *Analytical Chemistry*. 67:2650-2654.
- Rourou, S.; van der Ark, A.; van der Velden, T. i Kallel, H. 2007. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. *Vaccine*. 25:3879-3889.
- Russo, L. M.; Brown, D. i Lin, H. Y. 2009. The soluble transforming growth factor- β receptor: Advantages and applications. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 41:472-476.
- Ryan, U. S.; Mortara, M. i Whitaker, C. 1980. Methods for microcarrier culture of bovine pulmonary artery endothelial cells avoiding the use of enzymes. *Tissue and Cell*. 12:619-635.
- Sand, T.; Condie, R. i Rosenberg, A. 1977. Metabolic crowding effect in suspension of cultured lymphocytes. *Blood*. 50:337-346.
- Sanfeliu, A. 1995. Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars. *Tesi Doctoral*. UAB.
- Sanfeliu, A.; Paredes, C.; Cairo, J. J. i Gòdia, F. 1997. Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 21:421-428.
- Sassoon, D. A.; Garner, I. i Buckingham, M. 1988. Transcripts of α -cardiac and α -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development*. 104:155-164.
- Sauer, H.; Rahimi, G.; Hescheler, J. i Wartenberg, M. 1999. Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 75:710-723.
- Scharfetter H. 1999. Structural modeling for impedance-based non-invasive diagnostic methods. *Tesi Doctoral*. Technical University Graz.
- Schönherr, E.; Witsch-Prehm, P.; Harrach, B.; Robenek, H.; Rauterberg, J. i Kresse, H. 1995. Interaction of biglycan with type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*. 270:2776-2783.
- Schoof, H.; Apel, J.; Heschel, I. i Rau, G. 2001. Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. *Journal of Biomedical Materials Research*. 58:352-357.
- Schwan, H.P. 1957. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Advances in biological and medical physics*. 5:147-209.
- Schwartz, K.; Lecarpentier, Y.; Martin, J.L.; Lompre, A.M.; Mercadier, J.J. i Swynghedauw, B. 1981. Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. 13:1071-1075.
- Schwarz, G. 1962. A theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution. *Journal of Physical Chemistry*. 66:2636-2642.
- Scott, J. E. i Haigh, M. 1985. Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. *Bioscience Reports*. 5:71-81.

- Sekiya, I.; Larson, B. L.; Smith, J. R.; Pochampally, R.; Cui, J. G. i Prockop, D. J. 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 20:530-541.
- Senabra, M. 2004. Desenvolupament de sondes miniaturitzades d'oxigen tipus Clark. Master-Tesis.
- Seyedin, S. M.; Thomas, T. C. i Thompson, A. Y. 1985. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:2267-2271.
- Shacter, E. 1989. Serum-free media for bulk culture of hibridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies. *Trends in Biotechnology*. 7:248-253.
- Shahar, A.; Reuveny, S.; David, Y.; Budu, C. i Shainberg, A. 1994. Cerebral neurons, skeletal myoblasts, and cardiac muscle cells cultured on macroporous beads. *Biotechnology and Bioengineering*. 43:826-831.
- Shahriari, Mahmoud R.; Ding, Jack Y.; Tong, J. i Sigel Jr, George H. 1994. Sol-gel coating-based fiber O₂/DO sensors. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*. 2068:224-240.
- Shao, M.; Jiang, L.; Cong, W. i Ouyang, F. 2002. Analysis of Vero cell growth behavior on microcarrier by means of environmental scanning electron microscopy. *Science in China, Series C: Life Sciences*. 45:149-158.
- Shim, W. S. N.; Jiang, S.; Wong, P.; Tan, J.; Chua, Y. L.; Seng Tan, Y.; Sin, Y. K.; Lim, C. H.; Chua, T.; Teh, M. i altres. 2004. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 324:481-488.
- Siano, A. i Mutharasan, R. 1991. NADH fluorescence and oxygen uptake responses of hybridoma cultures to substrate pulse and step changes. *biotechnology and Bioengineering*. 37:141-159.
- Slater, J. D. H.; Heffron, P. F.; Vernet, A. i Nabarro, J. D. N. 1959. Clinical and metabolic effects of Dexamethasone. *The Lancet*. 273:173-177.
- Smidsrød, O. 1974. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discussions of the Chemical Society*. 57:263-274.
- Smidsrød, O. i Haug, A. 1972. Dependence upon the gel-sol state of the ion-exchange properties of alginates. *Acta chemica Scandinavica*. 26:2063-2074.
- Smidsrød, O. i Skjåk-Bræk, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 8:71-78.
- Sociedad española de reumatología. 2009.
http://www.ser.es/investigacion/Informes_Estadisticos.php?lugar=10&enfermedad=2&buscar=Ver+informe. Informes estadísticos.
- Soley, A. 2010 (estimació). Tesi Doctoral en preparació. UAB.
- Soley, A.; Lecina, M.; Gámez, X.; Cairo, J. J.; Riu, P.; Rosell, J.; Bragós, R. i Gòdia, F. 2005. On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy. *Journal of Biotechnology*. 118:398-405.
- Spier, R. E. i Fowler, M. W. 1985. *Animal and Plant Cell Cultures*. Pergamon Press.
- Stoltz, J. F.; Bensoussan, D.; Decot, V.; Netter, P.; Ciree, A. i Gillet, P. 2006. Cell and tissue engineering and clinical applications: An overview. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 16:3-18.
- Stute, N.; Holtz, K.; Bubenheim, M.; Lange, C.; Blake, F. i Zander, A. R. 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental Hematology*. 32:1212-1225.

- Talbot, P. J.; Lapierre, J.; Daniel, C.; Dugre, R. i Trepanier, P. 1989. Growth of a murine coronavirus in a microcarrier cell culture system. *Journal of Virological Methods*. 25:63-70.
- Tanabe, S.; Sato, Y.; Suzuki, K.; Nagao, T. i Yamaguchi, T. 2008. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *The Japanese Biochemical Society*. 144:399-408.
- Tartour, E.; Mehtali, M.; Sastre-Garau, X.; Joyeux, I.; Mathiot, C.; Pleau, J. M.; Squiban, P.; Rochlitz, C.; Courtney, M.; Jantschkeff, P. i altres. 2000. Phase I clinical trial with IL-2-transfected xenogeneic cells administered in subcutaneous metastatic tumours: Clinical and immunological findings. *British Journal of Cancer*. 83:1454-1461.
- Tatard, V. M.; Venier-Julienne, M. C.; Saulnier, P.; Prechter, E.; Benoit, J. P.; Menei, P. i Montero-Menei, C. N. 2005. Pharmacologically active microcarriers: A tool for cell therapy. *Biomaterials*. 26:3727-3737.
- Thomson, J. A. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145-1147.
- Tins, B. J.; McCall, I. W.; Takahashi, T.; Cassar-Pullicino, V.; Roberts, S.; Ashton, B. i Richardson, J. 2005. Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up. *Radiology*. 234:501-508.
- Todaro, G. J.; Fryling, C. i De Larco, J. E. 1980. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77:5258-5262.
- TransScan_Medical. 2002. <http://www.transscan.co.il/>. TransScan Medical.
- Traub, P. 1985. *Intermediate Filaments: a Review*. Springer-Verlag, editor. Berlin.
- Treilleux, I.; Mallein-Gerin, F.; Le Guellec, D. i Herbage, D. 1992. Localization of the expression of Type I, II, III collagen, and aggrecan core protein genes in developing human articular cartilage. *Matrix*. 12:221-232.
- TuftsCenter. 2001. <http://csdd.tufts.edu/NewsEvents/RecentNews.asp?newsid=6>.
- Uematsu, K.; Hattori, K.; Ishimoto, Y.; Yamauchi, J.; Habata, T.; Takakura, Y.; Ohgushi, H.; Fukuchi, T. i Sato, M. 2005. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*. 26:4273-4279.
- Vacanti, C. A.; Cima, L. G.; Rodkowski, D. i Upton, J. 1992. Tissue-inducing Biomaterials pp. 323-330.
- Vacanti, M. P.; Roy, A.; Cortiella, J.; Bonassar, L. i Vacanti, C. A. 2000. Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. *Journal of Cellular Biochemistry*. 80:455-460.
- van Wezel, A. L. 1967. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature*. 216:64-65.
- van Wezel, A. L. 1972. New trends in the preparation of cell substrates for the production of virus vaccines. *Progress in immunobiological standardization*. 5:187-192.
- van Wezel, A. L.; van Herwaarden, J. A. i van de Heuvel-de Rijk, E. W. 1979. Large-scale concentration and purification of virus suspension from microcarrier culture for the preparation of inactivated virus vaccines. *Developments in Biological Standardization*. 42:65-69.

- van Wezel, A. L.; van Steenis, G.; Hannik Ch, A. i Cohen, H. 1978. New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines. *Developments in Biological Standardization*. VOL. 41:159-168.
- Vandekerckhove, J. i Weber, K. 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *Journal of Molecular Biology*. 126:783-802.
- Varani, J.; Hasday, J. D. i Sitrin, R. G. 1986. Proteolytic enzymes and arachidonic acid metabolites produced by MRC-5 cells on various microcarrier substrates. *In Vitro*. 22:575-582.
- Voigt, A. i Zintl, F. 1999. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *Journal of Biotechnology*. 68:213-226.
- Vunjak-Novakovic, G i Kaplan, D. L. 2006. Tissue Engineering: The Next Generation. *Tissue Engineering*. 12:3261-3263.
- Walker, D.C.; Brown, B.H.; Hose, D.R. i Smallwood, R.H. 2000. Modelling the electrical impedivity of normal and premalignant cervical tissue. *Electronics Letters*. 36:1603-1604.
- Walsh, G. 2003. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 55:3-10.
- Walsh, G. 2006. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotechnology*. 24:769-776.
- Walsh, G. 2007. Engineering biopharmaceuticals. *BioPharm International*. 20:64-68.
- Wang, J.; Honda, H.; Lenas, P.; Watanabe, H. i Kobayashi, T. 1995. Effective tPA production by BHK cells in nutrients-controlled culture using an on-line HPLC measuring system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80:107-110.
- Wang, K.; McCarter, R.; Wright, J.; Jennate, B. i Ramirez-Mitchell, R. 1993. Viscoelasticity of sarcomere matrix of skeletal muscles: the titin myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophysical Journal*. 64:1161-1177.
- Weitzer, G.; Milner, D.; Kim, J.; Bradley, A. i Capetanaki, Y. 1995. Cytoskeletal control of myogenesis: a desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation. *Developments in Biological Standardization*. 172:422-439.
- Werner, R.G. 1993. Successful products and future business prospects. *Animal Cell Technology: Products of Today, Prospects for Tomorrow*. Oxford, United Kingdom: Butterworth-Heinemann 573-579.
- Werner, R.G. i Noe, W. 1993. Mammalian cell cultures. Part I: Characterization, morphology and metabolism. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. 43:1134-1139.
- White, L. A. i Ades, E. W. 1990. Growth of Vero E-6 cells on microcarriers in a cell bioreactor. *Journal of Clinical Microbiology*. 28:283-286.
- WHO. 1987a. World Health Organization: Acceptability of cells substrates for production of biologicals. *WHO Technical Report Series*. 747:5-24.
- WHO. 1987b. World Health organization: Requirements for continuous cell lines used for biological substances. *WHO Technical Report Series*. 745:99-115.
- Widell, A.; Hansson, B. G. i Nordenfelt, E. 1984. A microcarrier cell culture system for large scale production of hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods*. 8:63-71.

- Wise, D. L. i Wingard, L. B. 1991. *Biosensors With Fiberoptics*. H Press, editor.
- Wobus, A. M. i Boheler, K. R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological Reviews*. 85: 635-678.
- Wolf, B.; Brischwein, M.; Baumann, W.; Ehret, R. i Kraus, M. 1998. Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The physiocontrol-microsystem (PCM®). *Biosensors and Bioelectronics*. 13:501-509.
- Wolfbeis, O. S. 1991. *Fiber optic chemical sensors and biosensors*. Londres.
- Wolfbeis, O. S.; Leiner, M. J. P. i Posch, H. E. 1987. A new sensing material for optical oxygen measurement, with the indicator embedded in an aqueous phase. *Mikrochimica Acta*. 90:359-366.
- Worster, A. A.; Nixon, A. J.; Brower-Toland, B. D. i Williams, J. 2000. Effect of transforming growth factor β 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*. 61:1003-1010.
- Wu, P.; Ozturk, S. S.; Blackie, J. D.; Thrift, J. C.; Figueroa, C. i Naveh, D. 1995. Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 45:495-502.
- Wu, S. C.; Huang, G. Y. L. i Liu, J. H. 2002. Production of retrovirus and adenovirus vectors for gene therapy: A comparative study using microcarrier and stationary cell culture. *Biotechnology Progress*. 18:617-622.
- Xia, Y.; Buja, L. M.; Scarpulla, R. C. i McMillin, J. B. 1997. Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:11399-11404.
- Xu, W.; Kneas, K. A.; Demas, J. N. i DeGraff, B. A. 1996. Oxygen sensors based on luminescence quenching of metal complexes: Osmium complexes suitable for laser diode excitation. *Analytical Chemistry*. 68:2605-2609.
- Xu, W.; Schmidt, R.; Whaley, M.; Demas, J. N.; DeGraff, B. A.; Karikari, E. K. i Farmer, B. L. 1995. Oxygen sensors based on luminescence quenching: Interactions of pyrene with the polymer supports. *Analytical Chemistry*. 67:3172-3180.
- Xu, W.; Zhang, X.; Qian, H.; Zhu, W.; Sun, X.; Hu, J.; Zhou, H. i Chen, Y. 2004. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental Biology and Medicine*. 229:623-631.
- Yasumura, Y. i Kawakita, M. 1963. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho*. 21:1201-1219.
- Yokomizo, A. Y.; Antoniazzi, M. M.; Galdino, P. L.; Jr., N. Azambuja; Jorge, S. A. C. i Pereira, C. A. 2003. Rabies virus production in high vero cell density cultures on macroporous microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*. 85:506-515.
- Zhou, W. i Hu, W. S. 1994. On-line characterization of a hybridoma cell culture process. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:170-177.
- Zimmermann, W. H.; Schneiderbanger, K.; Schubert, P.; Didié, M.; Münzel, F.; Heubach, J. F.; Kostin, S.; Neuhuber, W. L. i Eschenhagen, T. 2002. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circulation Research*. 90:223-230.

pàgina deixada expressament en blanc

