

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
GELES PLASMÁTICOS CON
APLICACIONES EN BIO-MEDICINA
DERMATOLÓGICA”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

AIDA IBÁÑEZ ANTUÑA

JUNIO, 2013





Master en Biotecnología Alimentaria

Universidad de Oviedo

C/Julán Clavería s/n. 33071 Oviedo. España



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D^a Aida Ibañez Antuña ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7^a promoción curso 2012-2013.

Oviedo, 15 de Junio de 2013

D. Manuel Rendueles de la Vega

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

A Manuel Rendueles, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y por su colaboración, comprensión, ayuda y guía durante toda la realización de este proyecto.

A Amanda, porque sin ella no habría entendido tan bien la reología, y por darme su ayuda y consejo siempre que la he necesitado.

A Eva, sin la cual todo el trabajo realizado en el hospital no hubiera sido posible, y me hubiera encontrado mucho más pérdida durante la realización del proyecto.

A mis compañeros del laboratorio y del máster, por ayudarme en mi trabajo diario y apoyarme siempre que fue necesario.

A mi abuelo.

INDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	V
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES DEL TEMA	1
1.2 SITUACIÓN ACTUAL	2
1.3 OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	3
CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1 REOLOGÍA	5
2.1.1 <i>INTRODUCCIÓN.....</i>	5
2.1.2 <i>CLASIFICACIÓN DE FLUIDOS.....</i>	6
2.2 SANGRE HUMANA	11
2.2.1 <i>INTRODUCCIÓN.....</i>	11
2.2.2 <i>CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.....</i>	13
2.2.3 <i>RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA SANGRE.....</i>	13
2.3 PLASMA HUMANO.....	15
2.3.1 <i>INTRODUCCIÓN.....</i>	15
2.3.2 <i>COMPONENTES DEL PLASMA.....</i>	15
2.3.3 <i>PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....</i>	16
2.3.3.1 <i>Propiedades de las proteínas.....</i>	18
2.3.3.2 <i>Capacidad de gelificación: geles proteicos plasmáticos.....</i>	20
2.3.4 <i>APLICACIONES GELES PLASMÁTICOS.....</i>	21

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 PROCESADO DE LA SANGRE.....	28
3.1.1 <i>OBTENCIÓN</i>	28
3.1.2 <i>SEPARACIÓN.....</i>	30
3.2 PROCESADO DEL PLASMA.....	30
3.3 SINTESIS DE GELES A PARTIR DE PROTEINAS	
PLASMÁTICAS.....	31
3.3.1 <i>INCUBADOR.....</i>	31
3.3.2 <i>REÓMETRO.....</i>	32
3.4 DETERMINACIONES REOLÓGICAS.....	34
3.4.1 <i>BARRIDO DE TEMPERATURA.....</i>	34
3.4.2 <i>BARRIDO DE ESTRÉS.....</i>	35
3.4.3 <i>ENSAYOS DE FLUENCIA Y RECUPERACIÓN.....</i>	36
3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE	
AGUA.....	37
3.6 CRECIMIENTO DE CÉLULAS.....	38
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 SINTESIS DE GELES A PARTIR DE PROTEINAS	
PLASMÁTICAS	40
4.1.1 <i>INCUBADOR</i>	40
4.1.2 <i>REÓMETRO.....</i>	41
4.2 DETERMINACIONES REOLÓGICAS	45
4.2.1 <i>BARRIDO DE TEMPERATURA.....</i>	45
4.2.2 <i>BARRIDO DE ESTRÉS.....</i>	48
4.2.3 <i>ENSAYOS DE FLUENCIA Y RECUPERACIÓN.....</i>	51
4.3 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA.....	54
4.4 CRECIMIENTO DE CÉLULAS.....	55
CONCLUSIONES.....	59
NOMENCLATURA	62
BIBLIOGRAFÍA.....	65

FIGURAS	68
APENDICES	70
- APENDICE I: ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	70

RESUMEN

RESUMEN

Se calcula que cada año unos 120000 españoles son tratados por algún tipo de quemadura grave. Los tratamientos actuales siguen mostrando problemas de incompatibilidad y rechazo. El plasma, al ser un componente de nuestra sangre podría ser aprovechado en estos tratamientos gracias a la capacidad de gelificación de las proteínas que lo forman. El interés principal de investigar con geles plasmáticos es que, al tratarse de una sustancia perteneciente al propio paciente, el riesgo de rechazo se reduce considerablemente.

En este trabajo se han sintetizado geles plasmáticos (a partir de plasma humano tratado de 3 formas diferentes) aplicando un tratamiento térmico inducido y dos formas distintas de síntesis: utilizando un incubador y un reómetro rotacional. Una vez sintetizados, se han almacenado en agua destilada y en nevera a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, obteniendo diferencias en la estructura final del gel. Además, se han caracterizado reológicamente a través de ensayos como barridos de temperatura, barridos de esfuerzo y ensayos de fluencia y recuperación. Se ha comprobado que en función del tipo de plasma la estructura es más o menos débil y los geles muestran diferente manejabilidad. Se ha comparado la capacidad de retención de agua de los geles plasmáticos en función de cada tipo de plasma, de las dos formas de síntesis y de su almacenamiento a bajas temperaturas, concluyendo que éste último influye de forma importante. Por último, se han intentado cultivar células procedentes de la piel (fibroblastos) en los geles, pero tras 12 días de incubación no se ha llegado a su proliferación. Por tanto, aunque los geles plasmáticos han resultado en general tener buenas características reológicas, todavía se requiere más investigación y trabajo para modificarlos de forma que puedan ser útiles en el campo de la bio-medicina dermatológica.

ABSTRACT

ABSTRACT

About 120000 people suffer from several burns each year in Spain and therefore, the development of new biomaterials which skin hardly reject is one of the main aims of this research area. Human blood plasma both because it belongs to our body and it has excellent gelling properties should be considered with that purpose.

In this work blood plasma has been treated in 3 different ways, previously of the gel synthesis. The heat treatment was applied using an incubator and a rotational rheometer. Gels were stored using distilled water and under chill conditions ($4\pm 1^\circ\text{C}$), with the result of different gel structures. They were also characterized by rheological measurements such as temperature sweeps, stress sweeps and creep and recovery tests. It was proved that unlike plasma treatments gives differences in gel strength or elasticity. Water holding capacity was also determined, concluding that it is influenced by storing conditions. Finally, the attempt to incubate fibroblasts in plasma gels was not successfully because their proliferation was not achieved above the gels but underneath. There is still needed further optimization of plasma treatment and gel synthesis so this sort of gels could be useful in dermatology biomedicine.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Fig. 1. Clasificación de los fluidos en función de su comportamiento reológico.....	6
Fig. 2. Representación del esfuerzo de corte frente a la velocidad de corte para distintos fluidos.....	8
Fig. 3. Diferencias en el color de la sangre humana y el plasma.....	12
Fig. 4. Clasificación de las proteínas plasmáticas.....	17
Fig. 5. Proceso de formación de un gel proteico.....	21
Fig. 6. Imagen de las capas de la piel.....	25

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Fig. 7. Sangre humana centrifugada; diferencia de dos fases: fracción celular y plasma.....	28
Fig. 8. Esquema de obtención de la sangre.....	29
Fig. 9. pHmetro Crisol microph 2001.....	30
Fig. 10. Reómetro rotacional HAAKE MARS II.....	36

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fig. 11. Apariencia de geles plasmáticos sintetizados en el incubador.....	40
Fig. 12. Comparación visual de las dos formas distintas de almacenamiento de los geles del ensayo A.....	41
Fig. 13. Comparación visual de los geles del ensayo A y B sintetizados en el reómetro.....	42
Fig. 14. Gel del ensayo A almacenado durante 24 horas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sintetizado en el reómetro.....	43

LISTA DE FIGURAS

Fig. 15. Comparación del color de los geles del ensayo A y ensayo C tras su síntesis en el reómetro.....	43
Fig. 16. Comparación de los geles del ensayo A y C tras ser almacenados durante 24 horas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	44
Fig. 17. Barrido de temperatura para el ensayo A.....	45
Fig. 18. Barrido de temperatura para el ensayo B.....	46
Fig. 19. Barrido de temperatura para el ensayo C.....	46
Fig. 20. Barrido de estrés para el ensayo A.....	48
Fig. 21. Barrido de estrés para el ensayo B.....	49
Fig. 22. Barrido de estrés para el ensayo C.....	49
Fig. 23. Fluencia y recuperación para el ensayo A.....	51
Fig. 24. Fluencia y recuperación para el ensayo B.....	52
Fig. 25. Fluencia y recuperación para el ensayo C.....	52
Fig. 26. Proliferación de los fibroblastos en el soporte plástico.....	56
Fig. 27. Proliferación de los fibroblastos debajo del gel nº 7.....	56
Fig. 28. Proliferación de células sobre la superficie del gel nº 5.....	57
Fig. 29. No hay proliferación en el gel nº 5 pero sí hay proliferación de fibroblastos debajo del gel.....	58

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 1. Viscosidades típicas a 20°C.....	6
Tabla 2. Valores de las principales características físicas de la sangre.....	13
Tabla 3. Parámetros necesarios para la obtención de los distintos componentes sanguíneos por centrifugación.....	14
Tabla 4. Componentes del plasma sanguíneo.....	16
Tabla 5. Resumen de las propiedades funcionales de las proteínas.....	19

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Tablas 6 y 7. Resumen de los tipos de geles en los que se intentó el crecimiento de células.....	38
--	----

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 8. Temperaturas de gelificación correspondientes a los ensayos A, B y C.....	47
Tabla 9. Resumen del esfuerzo soportado por cada tipo de gel.....	50
Tabla 10. Valores de los parámetros del modelo de Burguer para los geles de los ensayos A, B y C.....	53
Tabla 11. Resumen de los porcentajes de pérdida de agua para cada tipo de gel.....	54

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES DEL TEMA

El plasma es uno de los elementos que forman la sangre. Está compuesto fundamentalmente por agua, acompañado de una mezcla de unas 100 proteínas, que se dividen en tres grandes grupos: albúminas, globulinas y fibrinógeno (1). Las proteínas plasmáticas poseen una serie de propiedades funcionales dependiendo de su interacción con el agua; estas propiedades pueden ser aprovechadas con distintos fines (2). Su capacidad gelificante ha sido de interés tanto en el campo agroalimentario como en el campo biomédico.

Se han llevado a cabo diversos trabajos de investigación en los cuales se realizó la síntesis de geles plasmáticos de distintas formas: con cambio en el pH, con adición de sales o con cambio en los tratamientos previos del plasma (1, 3, 4). Además se les caracterizó tanto física como estructuralmente a través de medidas reológicas (curvas de flujo, ensayos de fluencia/recuperación...) (1, 3, 5) o métodos SEM (Scanning Electron Microscopy) o DSC (Differential Scanning Calorimetry) para la visión de su estructura (3, 6). Así, se obtuvieron diferentes datos acerca de este tipo de geles, como por ejemplo la dureza, elasticidad o capacidad para su formación bajo distintas condiciones, lo que constituye un gran paso para poder definir sus posibles aplicaciones.

El aprovechamiento no sólo de la capacidad de gelificación de las proteínas plasmáticas sino de otras muchas propiedades funcionales de las mismas puede ser interesante en el campo agroalimentario, tanto para la síntesis de productos con distintas texturas como de productos más estables en el tiempo. La aplicación principal de los geles plasmáticos en el campo agroalimentario puede residir en la posibilidad de la creación de una capa externa al alimento, estable a distintos pH y que proteja al mismo de todos los procesos de manipulación o almacenamiento; esta capa, al estar formada por material plasmático (componente natural de la sangre) puede significar a su vez menor riesgo para la salud de las personas, en comparación con otro tipo de materiales sintéticos (1).

En el campo de la biomedicina las aplicaciones de los geles plasmáticos son muy amplias y diversas. Se debe sobre todo al hecho de que al tratarse de un componente presente en nuestra sangre, es totalmente bio-compatibile. Este hecho se ratifica aún más si el gel es sintetizado a partir del plasma del propio paciente a tratar (7). Además es

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

interesante tener en cuenta la facilidad del proceso de creación del propio gel. Se han realizado estudios para su aplicación en cirugías plásticas, como por ejemplo cirugías maxilofaciales reconstructivas, con resultados esperanzadores (8). Existen a su vez distintos trabajos en los que se pretende demostrar su aplicación como soporte para la creación de nuevas pieles bio-sintéticas que puedan ser utilizadas para el tratamiento de quemaduras o úlceras vasculares (7, 9). El Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo) trabaja en la actualidad persiguiendo estos objetivos. Una última aplicación que se le puede atribuir a los geles sintetizados a partir de proteínas plasmáticas es su uso como parte de la creación de córneas artificiales para su aplicación en trasplantes de córnea. Este es un campo en el que grupos oftalmológicos importantes en nuestro país como el Instituto Oftalmológico Fernández Vega están trabajando en la actualidad.

1.2 SITUACIÓN ACTUAL

El principal objetivo de este trabajo en cuanto a la posible aplicación de los geles plasmáticos sintetizados a partir de plasma humano consiste en utilizar los mismos para la creación de nuevos tejidos bio-sintéticos con vistas en su utilización en pieles dañadas. Por tanto, la situación actual está centrada en esa aplicación.

Las quemaduras son una causa importante de daño en las personas. No existen estadísticas concretas sobre la influencia de quemaduras/año a nivel español o europeo, aunque se estima que cada año en Europa 1.000.000 de personas son tratadas por quemaduras, entre los que se encuentran unos 120.000 españoles (10). Actualmente para el tratamiento de quemaduras existen distintos procedimientos; pueden aplicarse injertos temporales o permanentes y de orígenes muy variados (natural o sintético) (11). Los principales problemas asociados al uso de pieles de un origen distinto al propio paciente son el riesgo de incompatibilidad y rechazo (9), de ahí el interés por el desarrollo de nuevos materiales bio-sintéticos que superen este problema.

El plasma humano puede constituir una alternativa para el desarrollo de geles que puedan aplicarse como soporte para el desarrollo de nuevas pieles con aplicación en tejidos dañados. La principal característica que lo hace interesante es la posibilidad de sintetizar el gel a partir del plasma del propio paciente, lo cual hace prácticamente imposible el riesgo de rechazo. Otros aspectos a tener en cuenta son la facilidad de

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

síntesis de estos geles y la posibilidad del crecimiento de las células adecuadas para su buen funcionamiento.

La posibilidad de trabajar en conjunto con el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, los cuales previamente han realizado trabajos en este campo (7) ha motivado la realización de este trabajo.

1.3 OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo de este trabajo es conseguir sintetizar geles plasmáticos a partir de plasma humano, aplicando un tratamiento térmico inducido para formar dispersiones agregadas. Una vez sintetizados, se pretenden caracterizar reológicamente a través de ensayos como rampas de temperatura (para estimar la temperatura de gelificación de las muestras), barridos de esfuerzo (para conocer el rango viscoelástico) o ensayos de fluencia y recuperación (permitirán conocer la estructura interna de los geles, comprobando las diferencias estructurales existentes entre distintas muestras). Además, se realizará un análisis físico-químico para saber la capacidad que tienen los geles para retener agua.

Finalmente, se comprobará la posible aplicación que pueden tener estos geles en el campo de la biomedicina, más concretamente para su aplicación como base en la creación de piel artificial con vistas a su uso en pacientes quemados. Actualmente, uno de los materiales con los que se trabaja para crear piel artificial es plasma gelificado. Sin embargo, debido a su poca manejabilidad y fácil rotura se hace necesario acoplar dicho plasma a otro soporte que le proporcione mayor estabilidad. En el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias se ha estado investigando sobre la posibilidad del uso de distintos materiales que puedan actuar como tal, sin obtener buenos resultados hasta el momento. Por tanto, se intentará comprobar si dicho soporte puede estar formado también por plasma gelificado. El primer paso para tener en cuenta este posible material, es conseguir el desarrollo de células procedentes de la piel en la superficie del mismo. En este caso, se intentarán cultivar fibroblastos en los geles sintetizados.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

A modo de resumen, se exponen a continuación los objetivos que se pretenden alcanzar con la realización de este trabajo:

- Síntesis de geles a partir de proteínas plasmáticas
- Caracterización reológica de los geles plasmáticos a través de la realización de barridos de temperatura, barridos de esfuerzo y ensayos de fluencia y recuperación.
- Análisis de la capacidad de retención de agua de los geles.
- Análisis de la posible aplicación de los geles plasmáticos en su uso como soporte para el desarrollo de nuevos tejidos que puedan utilizarse como piel artificial en pacientes quemados; para ello se realizará la siembra de células presentes en la piel (fibroblastos).

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 REOLOGIA

2.1.1 INTRODUCCIÓN

Se define la reología como la ciencia de la deformación y el flujo de la materia, pudiendo estar ésta en cualquiera de los tres estados fundamentales: sólido, líquido o gaseoso. Una definición más moderna considera a la reología como una parte de la física que estudia la relación que hay entre esfuerzo y deformación en los materiales que son capaces de fluir (1). El conocimiento de esta materia es sumamente importante en industrias que trabajan los plásticos, pinturas, detergentes, aceites y alimentos entre otras.

El término “reología” fue introducido por Eugen Cook Bingham en 1929, aunque su origen se encuentra en el siglo XVII, cuando científicos como Robert Hooke e Isaac Newton comenzaron a exponer ideas sobre sólidos elásticos y fluidos viscosos (12).

Se definen a continuación los parámetros clave en reología (13, 14):

- *Viscosidad (μ):* Es el término opuesto a la fluidez. Se trata de la oposición de un fluido a las deformaciones tangenciales, es decir, es la resistencia a fluir. Sólo se manifiesta en líquidos en movimiento y depende fuertemente de la temperatura.
- *Esfuerzo cortante aplicado (τ):* se define como la fuerza “ F ” aplicada tangencialmente a un área “ A ”, siendo éste la interfase entre el soporte y el líquido.
- *Velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$):* aparece como consecuencia del esfuerzo aplicado.

La ley de Newton de la viscosidad indica que si se somete un fluido a un esfuerzo cortante, éste es directamente proporcional a la deformación del fluido.

$$\tau = \mu (\dot{\gamma}) \quad (Eq. 1)$$

Algunas viscosidades típicas a 20 °C se muestran en la Tabla 1.

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 1. Viscosidades típicas a 20°C (15)

SUSTANCIA	VISCOSIDAD (mPa.s)
Agua	1.0
Aire	1.81×10^{-2}
Sangre (37°C)	3.015
Plasma sanguíneo (37°C)	1.81
Cristal	10^{23}

2.1.2 CLASIFICACIÓN DE FLUIDOS (13, 16, 17)

Según se muestra en el siguiente esquema, los fluidos pueden clasificarse en función de su comportamiento reológico:

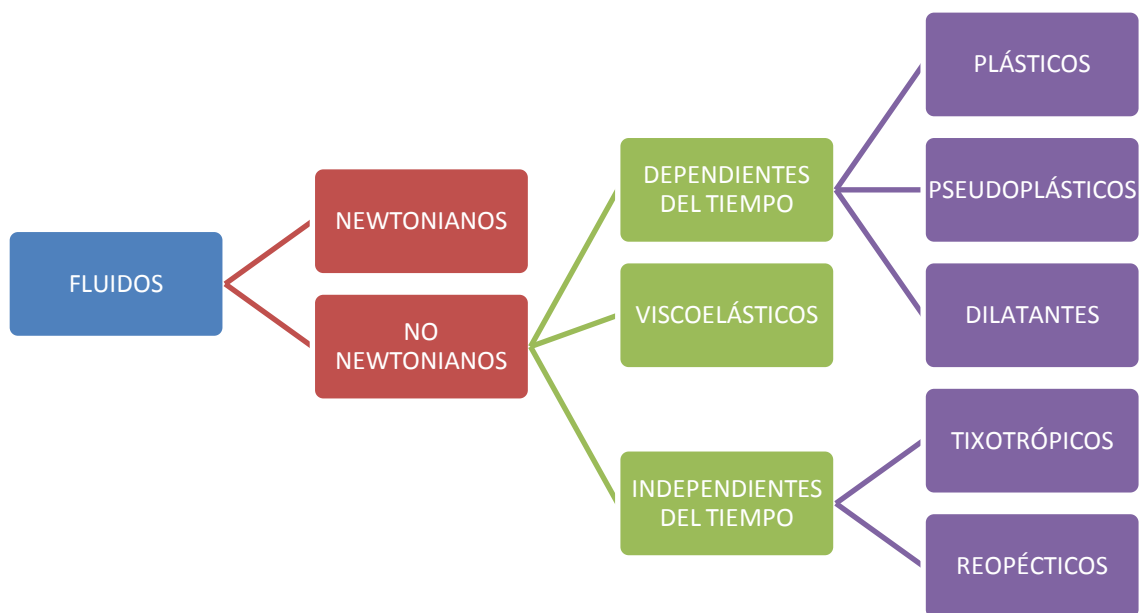


Fig. 1. Clasificación de los fluidos en función de su comportamiento reológico.

- **Fluidos newtonianos**

Son aquellos en los que su viscosidad es constante con el tiempo; no varía con la velocidad de cizalladura ni con el tiempo que se esté aplicando el esfuerzo. Siguen la ley de Newton de la viscosidad antes mencionada y no poseen propiedades elásticas. Se considera que el comportamiento newtoniano es un comportamiento ideal de los fluidos (1).

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- **Fluidos no newtonianos**

La viscosidad de este tipo de fluidos varía en función de la temperatura y el esfuerzo cortante que se les aplique. Su comportamiento también puede depender del tiempo de aplicación del esfuerzo (16). Se pueden clasificar en 3 categorías (16, 17):

- ***Dependientes del tiempo***

Se trata de aquellos fluidos en los que la viscosidad aparente depende del esfuerzo cortante al que se los somete, así como del tiempo durante el cual se está aplicando dicho esfuerzo. Para este tipo de fluidos se cumple:

$$\tau = f(\dot{\gamma}, t, \text{historia}) \quad (\text{Eq. 2})$$

Éstos se subdividen además en tixotrópicos y reopécticos:

- ❖ **TIXOTRÓPICOS:** La viscosidad aparente disminuye con el tiempo al aplicarles un esfuerzo cortante constante. Las pinturas, el yogurt y las arcillas muestran este comportamiento.
- ❖ **REOPÉCTICOS:** Son los fluidos inversos a los tixotrópicos: la viscosidad aparente aumenta con el tiempo al aplicarles un esfuerzo cortante constante. Un tipo de fluido reopéctico es el poliéster.

- ***Independientes del tiempo***

En estos fluidos la viscosidad depende del esfuerzo cortante aplicado pero no del tiempo de aplicación del mismo; la viscosidad también depende además de la temperatura y composición del fluido. En éstos se cumple la siguiente ecuación:

$$\tau = f(\dot{\gamma}) \quad (\text{Eq. 3})$$

Se subdividen en:

- ❖ **PSEUDOPLÁSTICOS:** La viscosidad es alta para bajas velocidades de deformación, es decir, disminuye al aumentar el esfuerzo cortante. Es el comportamiento general de los fluidos que no son newtonianos. Su comportamiento se describe por la ley de la potencia de Ostwald:

$$\tau = \kappa (\dot{\gamma}^n) \quad (\text{Eq. 4})$$

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

(Con "n" menor que 1; "k" y "n" son cte para un fluido particular)

- ❖ **DILATANTES:** Son mucho menos comunes que los pseudoplásticos. La viscosidad aumenta al aumentar el esfuerzo cortante. La manteca, las arenas movedizas o las suspensiones de almidón muestran este comportamiento, el cual puede describirse con la ley de Oswald (Eq. 4) siempre que "n" sea mayor que 1.
- ❖ **PLÁSTICOS:** Presentan un comportamiento sólido mientras el esfuerzo cortante no supere un valor límite denominado valor de fluencia (τ_0). Una vez que se supera este valor, pueden adoptar dos comportamientos distintos:
 - **Plástico de Bingham:** adopta comportamiento newtoniano. La mostaza, la mayonesa o la pasta dental son ejemplos de este tipo.

$$\tau = \tau_0 + \mu_p(\dot{\gamma}) \quad (\text{Eq. 5})$$

Siendo " μ_p " el coeficiente de viscosidad plástica.

- **Hershel-Bulkley:** siguen la ley de la potencia. El chocolate fundido o el dulce de leche siguen este comportamiento.

$$\tau = \tau_0 + \mu_p(\dot{\gamma}^n) \quad (\text{Eq. 6})$$

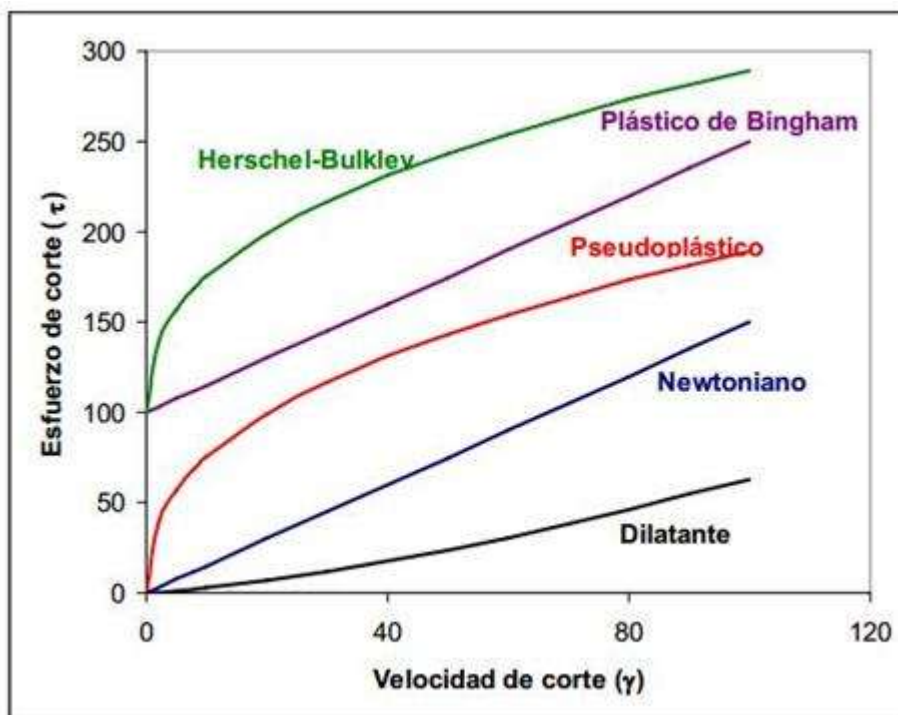


Fig. 2. Representación del esfuerzo de corte frente a la velocidad de corte para distintos fluidos (16)

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

▪ *Viscoelásticos (1, 18, 19)*

En la física clásica se considera que el comportamiento de los sólidos elásticos se rige por la ley de Hook: la deformación conseguida es directamente proporcional al esfuerzo aplicado. Según la ley de Newton, para los líquidos viscosos el esfuerzo aplicado es directamente proporcional a la velocidad de deformación, pero independiente de la propia deformación. En otras palabras, si se aplica un esfuerzo sobre un sólido elástico, la deformación vuelve a su estado inicial cuando se deja de aplicar la fuerza. Por otro lado, si el esfuerzo se aplica sobre un líquido viscoso, éste se deforma sin recuperarse tras parar de ejercer la fuerza. Sin embargo, hay materiales que poseen un comportamiento intermedio, parte viscoso y parte elástico, denominándose comportamiento viscoelástico. Los geles, objeto de nuestro estudio en este proyecto, presentan este tipo de comportamiento.

El comportamiento viscoso, elástico y viscoelástico puede estudiarse utilizando el número de Deborah:

$$De = \frac{\tau}{t} \quad (Eq.7)$$

Donde “ τ ” es el tiempo de relajación característico de una sustancia (infinito para un sólido de Hooke y cero para un fluido newtoniano) y “ t ” es el tiempo durante el cual se somete al material de estudio a un esfuerzo.

Se define por tanto la siguiente regla:

$$\left. \begin{array}{l} De < 1 \text{ Comportamiento viscoso.} \\ De > 1 \text{ Comportamiento elástico.} \\ De \approx 1 \text{ Comportamiento viscoelástico.} \end{array} \right\}$$

Existen una serie de experimentos que pueden realizarse para determinar la viscoelasticidad de los materiales:

- *Relajación de esfuerzos*: se aplica una velocidad de deformación para conseguir una determinada deformación del material y se estudia la variación del esfuerzo en función del tiempo. Se cumple la siguiente ecuación:

$$\sigma(t) = \gamma G(t) \quad (Eq.8)$$

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Siendo “ $\sigma(t)$ ” el esfuerzo aplicado y “ γ ” la deformación.

- *Ensayo de fluencia o creep*: se aplica un esfuerzo constante y se observa como varía la deformación del material con el tiempo. Un sólido elástico alcanza rápidamente una situación de equilibrio.
- *Ensayos de recuperación elástica*: Se aplica un esfuerzo constante y se observa la deformación del material. A continuación se retira el esfuerzo y se estudia la recuperación de la muestra con el tiempo. Los materiales elásticos se recuperan totalmente y los viscosos no se recuperan. Aquellos materiales viscoelásticos tendrán una recuperación parcial.
- *Experimentos dinámicos u oscilatorios*: Se aplica una deformación de modo sinusoidal en el material con una determinada frecuencia. Se cumple la siguiente ecuación en función del tiempo:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (\text{Eq. 9})$$

(Siendo “ γ ” la deformación, “ γ_0 ” la amplitud de la deformación, “ ω ” la frecuencia y “ t ” el tiempo)

Al aplicar la deformación, se generan dos componentes del esfuerzo (τ):

- G' = módulo de almacenamiento (componente elástico), en fase con la deformación
- G'' = módulo de pérdida (componente viscoso), en desfase con la deformación 90° .

Puede expresarse el esfuerzo en función de estos dos módulos, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\tau = \gamma_0(G' \sin(\omega t) + G'' \cos(\omega t)) \quad (\text{Eq. 10})$$

La variación sinusoidal del esfuerzo resultante se puede expresar como:

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (\text{Eq. 11})$$

Por tanto, se deduce que:

$$G' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \cos(\delta) \quad (\text{Eq. 12})$$

$$G'' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0}\right) \sin(\delta) \quad (\text{Eq. 13})$$

$$\tan(\delta) = \left(\frac{G'}{G''}\right) \quad (\text{Eq. 14})$$

Siendo δ el representante del desfase existente entre el esfuerzo y la deformación. G' indica la cantidad de energía que se almacena en el material y G'' indica la cantidad de energía que se disipa por cada ciclo de deformación

Se deduce entonces que un sólido elástico almacena toda la energía $G'' = 0$ y el esfuerzo y la deformación están en fase ($\delta = 0^\circ$). Por su parte, en un material viscoso toda la energía se disipa en forma de calor, $G' = 0$ y el esfuerzo y la deformación están en desfase ($\delta = 90^\circ$). Un material viscoelástico tendrá valores de δ entre 0 y 90° .

G' y G'' están influenciadas por variables como la temperatura, la frecuencia y la deformación. Por tanto, utilizando la reología se puede obtener información sobre la estructura interna de ciertos materiales y ver cómo se comportan si se les aplica un determinado esfuerzo o temperatura. Ensayos como barridos de temperatura, barridos de estrés o ensayos de fluencia y recuperación se realizarán en este trabajo para caracterizar geles sintetizados a partir de proteínas plasmáticas.

2.2 SANGRE HUMANA

2.2.1 INTRODUCCIÓN

Este trabajo se centra en la síntesis, caracterización y posibles aplicaciones biomédicas atribuibles a geles sintetizados a partir de plasma humano. Éste, es uno de los componentes de la sangre humana, por lo que se describen a continuación las características más importantes de la misma.

La sangre es un líquido viscoso de color rojizo (a causa de la hemoglobina que contiene) formada por células en suspensión (leucocitos, hematíes y plaquetas) presentes en una solución acuosa (plasma) (20). Constituye aproximadamente el 8% del peso corporal del hombre y tiene varias funciones fundamentales para el organismo, entre las que se pueden destacar (21):

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- *Transporte*: la sangre transporta gases como el O₂ y CO₂, así como metabolitos de desecho al pulmón, hígado y riñones para su excreción al exterior. Es una parte fundamental en el intercambio de sustancias entre los órganos.
- *Homeostasis*: es la responsable de la correcta distribución del agua entre el sistema circulatorio, la parte extracelular y la parte intracelular. Tiene asimismo un papel de reguladora (tanto del equilibrio ácido-base como de la temperatura corporal). Debido al fenómeno de la homeostasis, el plasma sanguíneo presenta caracteres físico-químicos prácticamente constantes.
- *Defensa*: Además del sistema inmune, ciertas proteínas plasmáticas realizan labores de defensa contra agentes patógenos en nuestro organismo.
- *Autoprotección*: La sangre posee un sistema para evitar pérdidas sanguíneas secundarias y para la coagulación sanguínea.

Se considera que la sangre está compuesta por plasma/suero (50-55%) y células sanguíneas, que son los glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos). Los glóbulos rojos o hematíes constituyen la mayor parte de las células sanguíneas y contienen en su interior la hemoglobina, encargada del transporte de oxígeno para su uso en la respiración (22). La hemoglobina constituye 2/3 de la masa total de las proteínas de la sangre, mientras que el tercio restante lo forman las proteínas plasmáticas. Los leucocitos se relacionan con las funciones del sistema inmunológico de defensa, mientras que las plaquetas son restos celulares derivados de grandes células producidas en la médula ósea. Las proteínas tanto de los leucocitos como de las plaquetas representan cantidades insignificantes del total de las proteínas sanguíneas. (22).



Fig. 3. Diferencias en el color de la sangre humana (izquierda) y el plasma (derecha)

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El plasma, debido a que es el componente de la sangre utilizado para la realización de este proyecto, se explicará con detalle en esta memoria.

2.2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS (23, 24)

La sangre tiene una serie de características físicas que la definen. Se resumen las principales en la siguiente tabla.

Tabla 2. Valores de las principales características físicas de la sangre (23, 24)

CARACTERÍSTICA	VALOR
Densidad	1.05 kg/L
Viscosidad	Entre 3.5 y 4.5 cP (de 3 a 4 veces superior a la del agua)
pH	Entre 7.3 y 7.5 a temperatura ambiente
Sólidos	19 a 23g/100 ml
Punto de congelación	Alrededor de -0.55 °C
Tensión superficial	0.058 N/m
Temperatura	38°C en el interior del cuerpo
Volumen medio humanos	5-6L en el hombre y 4-5L en la mujer

Cabe destacar que cada componente de la sangre tiene su densidad característica; para el plasma nos encontramos valores entre 1.02-1.03 kg/L y para las células entre 1.08 y 1.09 kg/L. Esta propiedad nos permite separar dichos componentes por centrifugación. Además, se ha demostrado que la anemia disminuye la densidad total de la sangre. También es importante mencionar que la viscosidad de la sangre aumenta si aumentamos la cantidad de glóbulos rojos y solutos presentes.

2.2.3 RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA SANGRE

Se puede considerar que la sangre es un subproducto de la industria ganadera, ya que cuando se procede al sacrificio de un animal para el aprovechamiento de su carne, una parte de la sangre es fácilmente recuperable (alrededor del 50%) y puede destinarse a varios fines, entre ellos la investigación (1). Sin embargo, debido a los objetivos que se pretenden alcanzar con la realización de este proyecto, era absolutamente necesario el

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

uso de sangre humana y no animal. Por tanto, el proceso de obtención de la misma es claramente distinto: donación voluntaria del paciente en los Bancos de Sangre.

El proceso comienza por tanto en las cabinas habilitadas para la donación de la sangre, donde directamente desde su salida del cuerpo humano, la sangre se mezcla con un anticoagulante de forma automática (25). Dicha recolección se realiza en bolsas de plástico especiales. Una vez que las muestras llegan al banco de sangre, se realizan centrifugaciones en centrifugas refrigeradas de forma que, modificando parámetros como el tiempo de centrifugación o la fuerza centrífuga relativa, se obtienen los distintos componentes de la sangre, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Parámetros necesarios para la obtención de los distintos componentes sanguíneos por centrifugación (26)

COMPONENTE	FUERZA CENTRÍFUGA RELATIVA (g)	MINUTOS
Concentrado de eritrocitos (paquete globular)	5000	5
Plasma libre de células (para congelación)	5000	7
Plasma rico en plaquetas	2000	3
Concentrado plaquetario (obtenido del anterior)	5000	7

En función de las necesidades del banco de sangre, a las distintas fracciones se les añaden soluciones aditivas y se conservan aplicando distintas temperaturas y periodos de tiempo. De esta forma, la sangre íntegra y la fracción de glóbulos rojos deben conservarse entre 4 y 6°C entre 21 y 42 días en función del anticoagulante utilizado. Por su parte el plasma libre de células puede congelarse a -30°C durante un año.

2.3 PLASMA HUMANO

2.3.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado con anterioridad, el plasma es la materia prima principal que se utilizará en este trabajo. Se pretenden sintetizar geles plasmáticos y caracterizarlos reológicamente, así como comprobar las posibles aplicaciones de éstos en el mundo de la biomedicina. Por tanto, se expondrá con más detalle el plasma, sus componentes y características principales.

El plasma es un líquido amarillento que forma parte de la sangre. Está formado por agua, electrolitos, metabolitos, nutrientes, proteínas y hormonas. Debe diferenciarse el plasma del suero sanguíneo; el suero es la fase líquida que permanece una vez que se produce la coagulación de la sangre, pero que carece de factores de coagulación en sí mismo (1). Por otro lado el plasma se obtiene cuando a la sangre recién obtenida se le añaden sustancias anticoagulantes, que impiden la formación de redes de fibrina y separación de las células durante los procesos de centrifugación. Realmente la única diferencia entre suero y plasma sanguíneo es la presencia de la proteína fibrinógeno en el plasma y la ausencia de la misma en el suero (1). Una vez añadida la sustancia anticoagulante, se procede a someter a la sangre a un proceso de centrifugación pudiendo separar así el plasma de las células.

2.3.2 COMPONENTES DEL PLASMA

El plasma sanguíneo está formado por un 90% de agua y un 10% de solutos de los cuales gran parte (entre el 90-95%) son proteínas. Contiene en menor proporción sales inorgánicas y compuestos orgánicos no proteicos. En la siguiente tabla se resumen algunos de estos componentes:

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 4. Componentes del plasma sanguíneo (27, 28)

		VALOR MEDIO mg/dl (mg en 100 ml)
CATIONES	Sodio (Na^+)	327
	Potasio (K^+)	20
	Calcio (Ca^{2+})	10
	Magnesio (Mg^{2+})	2
ANIONES	Cloruros (Cl^-)	362
	Bicarbonato (HCO_3^-)	165
	Fosfatos (PO_4^{2-})	10
	Sulfato (SO_4^{2-})	5
COMPUESTOS NO PROTEICOS	Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)	7-18
	Bilirrubina total ($\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$)	0,2-1
	Ácido Úrico ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$)	3-7

2.3.3 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Las proteínas plasmáticas son de gran importancia en este proyecto, puesto que gracias a su capacidad de gelificación se puede realizar la síntesis de geles plasmáticos (uno de los principales objetivos de este trabajo).

Las proteínas son sustancias orgánicas de estructura muy compleja que tienen un papel fundamental tanto en las células animales como vegetales. Existen por tanto proteínas de origen animal, tales como proteínas globulares, proteínas fibrosas, protaminas e histonas, y proteínas de origen vegetal como son las glutelinas y prolaminas (29). En el organismo cumplen funciones muy variadas, entre las que se puede destacar:

- Participación en la movilidad celular
- Función enzimática
- Función reguladora y transportadora
- Función hormonal e inmunológica

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Como se ha comentado con anterioridad, gran parte de las sustancias disueltas en el plasma sanguíneo son proteínas plasmáticas que son sintetizadas fundamentalmente en el hígado. Las proteínas plasmáticas constituyen una mezcla de unas 100 proteínas. La separación electroforética de ellas genera 5 fracciones, aunque globalmente y teniendo en cuenta el fibrinógeno, pueden clasificarse en tres grandes grupos:

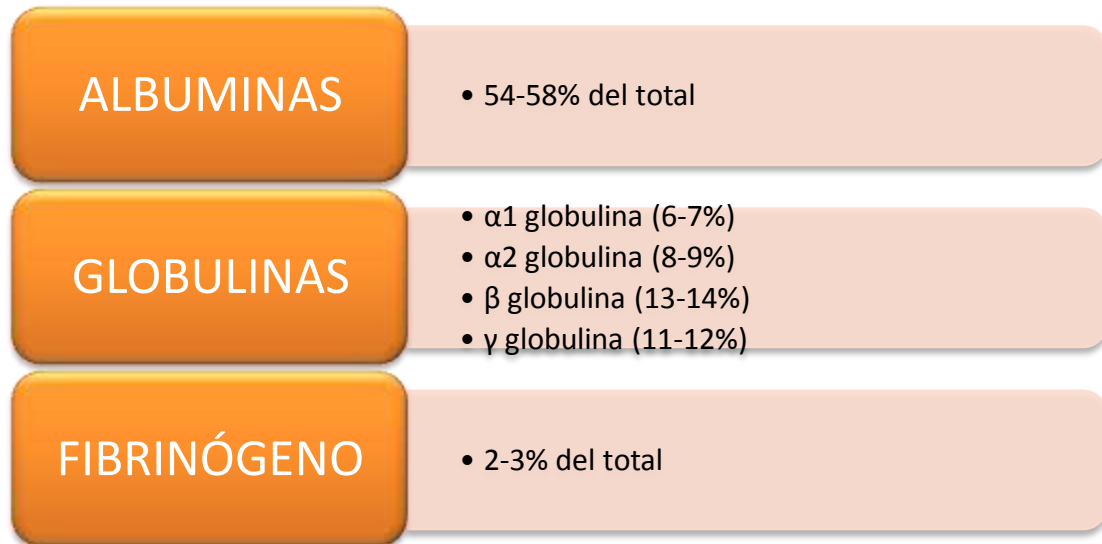


Fig. 4. Clasificación de las proteínas plasmáticas (29)

Cada proteína plasmática, al igual que cualquier otra proteína, tiene una función específica, aunque pueden señalarse brevemente las siguientes funciones compartidas por todas ellas (30):

- Mantenimiento de la presión oncótica de la sangre
- Transporte de macromoléculas biológicas
- Contribución al equilibrio electrolítico
- Tomar parte en el sistema de taponamiento de la sangre
- Intervenir en el recambio de proteínas tisulares

Se comentara a continuación cada proteína brevemente. La estructura de todas ellas se encuentra en el *Apéndice I*.

▪ **Albúmina**

Es la proteína más abundante del plasma, hecho que le hace contribuir esencialmente a la conservación de la presión osmótica de la sangre, además de constituir una de las reservas corporales más importantes de aminoácidos (21). Transporta numerosas

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

sustancias como ácidos grasos, drogas, sustancias tóxicas, enzimas... (29). Se considera de carácter ácido y muy soluble y está formada por una única cadena polipeptídica de 582 aminoácidos (30). Junto con la fracción de la albúmina se encuentra la prealbúmina, la cual transporta la hormona tiroidea tiroxina y sus metabolitos junto con otras proteínas. La albúmina es la única proteína plasmática que no es una glucoproteína (21).

▪ **Globulinas**

Las α y β globulinas participan en el transporte de los lípidos, hormonas, vitaminas e iones metálicos. Constituyen los factores de la coagulación y son los inhibidores de las proteasas (21). Por su parte, las γ -globulinas son glicoproteínas que contienen a la mayor parte de las sustancias de defensa (como por ejemplo, los anticuerpos). Este tipo de globulinas son comúnmente conocidas como inmunoglobulinas (Ig) (27).

▪ **Fibrinógeno**

La concentración media del fibrinógeno en el plasma es de 3g/L. En la separación electroforética utilizada para la separación de las proteínas plasmáticas antes mencionada, el fibrinógeno migra entre las β y las γ globulinas (27). Se trata de un dímero formado por tres cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro (30). Esta proteína se forma en el hígado y es insoluble tanto en agua como en disoluciones salinas débiles. El fibrinógeno constituye la parte disuelta de la fibrina, sustancia presente en el proceso de coagulación de la sangre (27). Esta proteína presente en el plasma, se encuentra ausente en el suero sanguíneo.

2.3.3.1 Propiedades de las proteínas

El plasma sanguíneo, debido a su contenido en proteínas, puede ser aprovechado para diversos fines debido a las propiedades funcionales de éstas. En función de la interacción que las proteínas tengan con el agua, podemos tener distintos tipos de propiedades, con una serie de factores asociados que pueden ser de nuestro interés (2). La siguiente tabla resumen permite tener una visión más clara de esta parte.

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 5. Resumen de las propiedades funcionales de las proteínas (2)

INTERACCIÓN	PROPIEDAD	FACTORES ASOCIADOS	CONCEPTOS RELACIONADOS
PROTEÍNA-AGUA	Solubilidad y retención de agua (hidratación)	<ul style="list-style-type: none"> - Estructura - pH - Temperatura - Fuerza iónica 	<ul style="list-style-type: none"> - Hinchado - Hidratación - Adhesión - Viscosidad
	Gelificación	<ul style="list-style-type: none"> - Estructura - Disociación/agregación - Coagulación - Temperatura - pH 	<ul style="list-style-type: none"> - Fuerza - Elasticidad - Firmeza - Estabilidad
PROTEÍNA-PROTEÍNA	Texturización (formación de matriz compleja)	<ul style="list-style-type: none"> - Coagulación/formación de películas - Precipitación 	
PROPIEDADES SUPERFICIALES	Emulgentes	<ul style="list-style-type: none"> - Hidrofobicidad - Viscosidad - Solubilidad - Temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacidad - Sedimentación
	Espumantes	<ul style="list-style-type: none"> - Viscosidad - Tipos de biopelículas - Desnaturalización 	<ul style="list-style-type: none"> - Poder espumante - Estabilidad

La mayor parte de estas propiedades tienen su interés de aplicación en el campo agroalimentario, de forma que su adición a alimentos puede contribuir a cambios en las propiedades físico-químicas de los mismos, como por ejemplo sus características organolépticas (1). Sin embargo, el interés de este trabajo reside en la capacidad de gelificación de dichas proteínas, de forma que la síntesis de geles pueda aprovecharse en la biomedicina.

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.3.3.2 *Capacidad de gelificación: geles proteicos plasmáticos*

Un gel es un sistema semisólido, formado por una suspensión de partículas inorgánicas pequeñas o moléculas orgánicas grandes inter-penetradas en un líquido (31). Se encuentra por tanto entre las disoluciones (en las que las fuerzas predominantes entre moléculas son débiles) y los precipitados (tienen interacciones intermoleculares fuertes). Poseen muchas propiedades de los líquidos ya que su mayor componente suele ser uno de ellos (la mayor parte del plasma es agua); sin embargo, mantienen su forma sólida debido a que sus moléculas se encuentran entrecruzadas formando una red (32). Se puede considerar que durante la gelificación se produce una macromolécula macroscópica que se caracteriza por tener un peso molecular promedio y una viscosidad macroscópica infinitos.

En función de cómo se llega a la formación del gel, se diferencian dos tipos:

- **Redes poliméricas**

Son redes tridimensionales formadas por la agregación de moléculas fibrilares desorganizadas a estructuras ordenadas. Para ello, se requiere la adición de un agente reticulante, como por ejemplo el glicerol o la agarosa (1). Las uniones de este tipo de geles no son completamente estables a ciertos cambios físicos como la temperatura, por lo que pueden formarse por enfriamiento y romperse al calentar. Las interacciones presentes en estos geles son del tipo enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals (32).

- **Dispersiones agregadas**

Este es el tipo de gel sintetizado en este trabajo. Se forman a partir de un proceso en 2 etapas mediado por acción del calor (33).

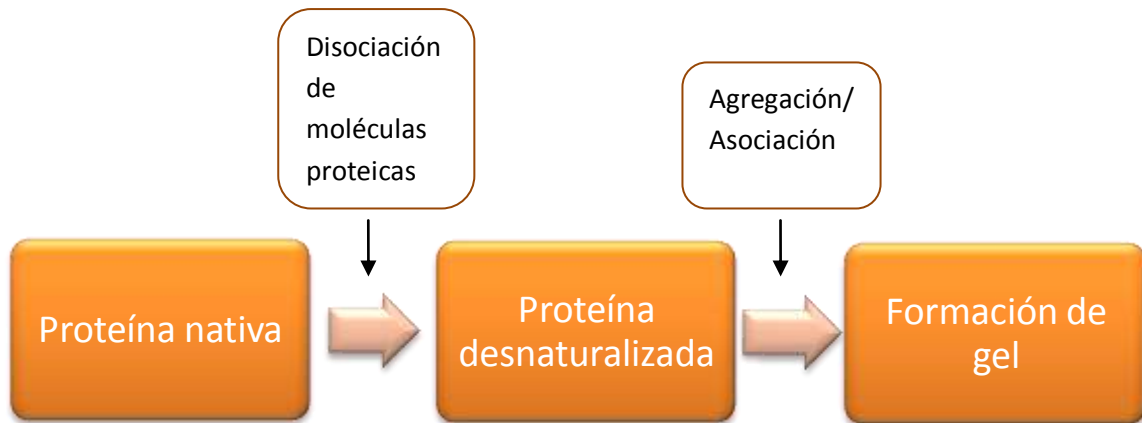


Fig. 5. Proceso de formación de un gel proteico (33)

Para que el gel resultante posea una estructura completamente ordenada, es necesario que el proceso de agregación suceda a una velocidad menor que el proceso de disociación (33). Además también es necesario tener concentraciones de proteína relativamente altas. Cabe destacar asimismo que el grado de desnaturalización necesario para que comience la agregación que conllevará la formación del gel depende de la propia proteína (1).

2.3.4 APLICACIONES GELES PLASMÁTICOS

La capacidad gelificante de las sustancias es una de las características más estudiadas en el campo de la biotecnología. Como se ha comentado con anterioridad, ésta es una de las propiedades que poseen las proteínas sanguíneas y plasmáticas (1). Esa capacidad gelificante se pone de manifiesto con la temperatura y depende entre otras cosas del pH o la concentración de proteína (5). Debido a la importancia de estas variables en los sistemas fisiológicos, biológicos y químicos, existen numerosos trabajos de investigación en los que se analiza como ocurre la gelificación del plasma bajo cambios en dichos parámetros.

Una vez conseguido el gel de plasma, éste puede tener distintas características, en cuanto a grosor, transparencia o comportamiento reológico, en función de la forma en la que se ha llevado a cabo su síntesis: adición de agentes coagulantes, combinación temperatura-tiempo, adición de agentes decolorantes... La caracterización de los geles

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

en la mayoría de las ocasiones se lleva a cabo a través de medidas reológicas como barridos de temperatura, curvas de flujo o ensayos de fluencia y recuperación (1, 3, 5). También son comunes otros tipos de métodos como el DSC (Differential Scanning Calorimetry), SDS-PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis), SEM (Scanning Electron Microscopy), o Fractal and Lacunarity Analysis también se usan habitualmente (1, 3, 4, 5, 6)

Entre los campos de aplicación más importantes para el uso de este tipo de geles se encuentran el agroalimentario y el de la medicina, siendo este último en el que ha habido más avances en los últimos años.

- **Alimentos**

El plasma porcino es uno de los sub-productos de la industria alimentaria que puede ser aprovechado por la misma, gracias a su capacidad gelificante. Dicha capacidad para la gelificación se la proporcionan las proteínas que en su mayoría lo forman; por tanto, puede resultar interesante el aprovechamiento de las propiedades funcionales de las proteínas (físico-químicas) para contribuir a las características deseadas en un alimento (1). Entre estas propiedades se encuentran la capacidad de emulsificación y absorción/retención de agua (interesante para productos como salsas o productos cárnicos (5), lácteos o productos de panadería) o la viscosidad (importante en la textura de las bebidas). Su capacidad propia de gelificación puede resultar interesante para la creación de biopelículas que protejan a los alimentos de posibles golpes (durante el transporte y tratamiento en los establecimientos) o incluso de su degradamiento prematuro (protección contra la oxidación al aire).

Este tipo de aplicaciones resultan interesantes sobre todo desde dos puntos de vista; el primero es que al utilizar un producto natural, se hace factible su uso en alimentación, ya que se evita la introducción de sustancias sintéticas en el organismo a través de los alimentos que puedan provocar efectos perjudiciales para la salud. Por otro lado, si el plasma que se utiliza es porcino (la sangre porcina es un subproducto de la industria alimentaria) se reduciría en gran parte la producción de este tipo de residuo que, por otro lado y debido a su carga contaminante ($DQO > 200000$ mg/L), ha de tratarse correctamente (34).

▪ **Aplicaciones biomédicas**

Las aplicaciones potenciales de los geles de plasma en el campo de la biomedicina son amplias, englobando a los campos de la oftalmología, cirugía plástica o cirugías dermatológicas. Se han realizado estudios en los que se ha comprobado por ejemplo, que si el plasma es rico en plaquetas, estimula la angiogenesis o la proliferación de fibroblastos (7). Así mismo en otros trabajos los geles plasmáticos han sido aplicados con éxito en cirugía reconstructiva maxilofacial (8).

A continuación sólo se hablará de dos de sus posibles aplicaciones biomédicas (trasplantes de córnea e injertos de piel) ya que actualmente dos centros del Principado de Asturias investigan sobre ello (Instituto Oftalmológico Fernández-Vega y Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias).

▪ **Trasplante de córnea**

La córnea es un elemento primario refractario del ojo, formada por tres capas (estroma, epitelio, endotelio) que se caracteriza por ser transparente, elástica y relativamente gruesa. Su función principal es absorber la radiación ultravioleta y actuar como una barrera física entre el ambiente externo y el resto de elementos oculares internos (35). Entre las afecciones que puede sufrir la córnea se encuentran por ejemplo, alergias y úlceras, distrofias, infecciones por virus, queratitis o la opacidad corneal, producida por infección, lesión o inflamación del ojo (36). Las enfermedades más graves son aquellas que producen opacidad, pues deben terminar en un trasplante de córnea (37).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las enfermedades de la córnea son la segunda causa de ceguera a nivel mundial, precedida sólo por las cataratas. El trasplante de córnea o queratoplastia es el método más utilizado para combatir estas enfermedades, con un porcentaje de éxito entorno al 80% (35). Sin embargo, transcurridos 4-5 años después de la intervención, las posibilidades de rechazo se sitúan en un 25%, porcentaje que continua aumentando con la vida del paciente (38). Durante el trasplante, se toman células del estroma, que se dejan crecer en un soporte (como por ejemplo, agarosa) y células madre del limbo. Partiendo de ambas, se formaran dos capas superpuestas, que será la cornea artificial. A continuación se coloca sobre el ojo y una vez que se regenera la zona dañada, el paciente recupera la vista (39).

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Se considera que el primer trasplante de córnea con larga duración de la transparencia fue realizado por Eduarm Konrad Zirm, a principios del siglo XX (40, 41). En el trasplante de córnea se sustituye la córnea enferma u opaca por otra transparente, parcial o totalmente (42). Esta nueva córnea puede provenir de otro ser humano, en cuyo caso la buena correspondencia inmunológica es esencial para evitar el rechazo, por lo que se hace necesario un registro adecuado de las características de donantes y receptores (42). Sin embargo, debido a la falta de donantes de tejido sumado al riesgo de transmisión de una infección, muchas veces se opta por el uso de tejidos sintetizados artificialmente (35). Dicha síntesis puede realizarse tanto a partir de materiales artificiales como biosintéticos. Para los primeros, se ha encontrado una alta tasa de rechazo (38), mientras que el uso de materiales basados en macromoléculas naturales ha demostrado mejorar la biocompatibilidad (43). Lo interesante reside en el desarrollo de un material que además de ser totalmente biocompatible, promueva la regeneración de las células corneales y nervios (43).

En la actualidad el campo de investigación de biomateriales compatibles con el cuerpo humano es bastante extenso. En cuanto a los posibles biomateriales que puedan utilizarse para un trasplante de córnea, se encuentran por ejemplo, aquellos basados en biopelículas de seda (38) o el colágeno, siendo este último una de las sustancias más estudiadas (35, 37, 43, 44, 45, 46). El colágeno, es la proteína más abundante del cuerpo, así como del tejido extracelular corneal (35). Entre las ventajas del uso del colágeno para la síntesis de biomateriales se encuentran, por ejemplo, buena biocompatibilidad, baja toxicidad y características físicas, químicas o inmunológicas muy estudiadas y conocidas (35). Corneas artificiales basadas en una matriz de colágeno a partir tanto de células humanas como de animales se han conseguido sintetizar y probarse en ratones o cerdos, con resultados esperanzadores (37, 43).

A pesar de los buenos resultados del colágeno en este campo, sigue existiendo el interés por el desarrollo de nuevos biomateriales. El plasma, al tratarse de una parte de la sangre y gracias a su capacidad para la gelificación, también podría ser utilizado para el desarrollo de materiales aplicables en los trasplantes de córnea. La posibilidad de utilizar plasma del propio paciente anula las posibilidades de rechazo por bioincompatibilidad; esto, junto con su mínimo coste lo hacen aún más interesante para su aplicación en este campo. Existe algún estudio en el que se utilizó plasma rico en plaquetas buscando este tipo de aplicación, aunque en lugar de utilizar gel plasmático,

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

utilizaban plasma más un soporte de membrana amniótica (47). Como ya se ha comentado, centros oftalmológicos importantes en nuestro país como el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega se encuentran en la actualidad investigando con la posibilidad del uso de geles de plasma en operaciones corneales.

▪ Injertos de piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano (con una superficie entre 1.5-2 m² constituye el 15% del peso corporal); es la encargada de regular la temperatura corporal y proteger al cuerpo de daños por fricciones, agentes químicos, radiaciones o microorganismos (11, 48). Está constituida por 3 capas: la dermis, la hipodermis y la epidermis.

- ❖ **Epidermis:** es la capa superior; es translúcida y consigue oxígeno y nutrientes para las capas más internas. En esta capa hay una membrana fina, llamada lámina basal, formada principalmente por colágeno. Las principales células de la epidermis son los queratinocitos (48)
- ❖ **Dermis:** Se trata de la segunda capa de la piel. Está formada principalmente por fibroblastos. En ella se encuentran por ejemplo las glándulas del sudor o las raíces del pelo (11)
- ❖ **Hipodermis:** Es la capa más interna de la piel. Se trata de una capa de grasa unida a la dermis mediante fibras colágenas (11)

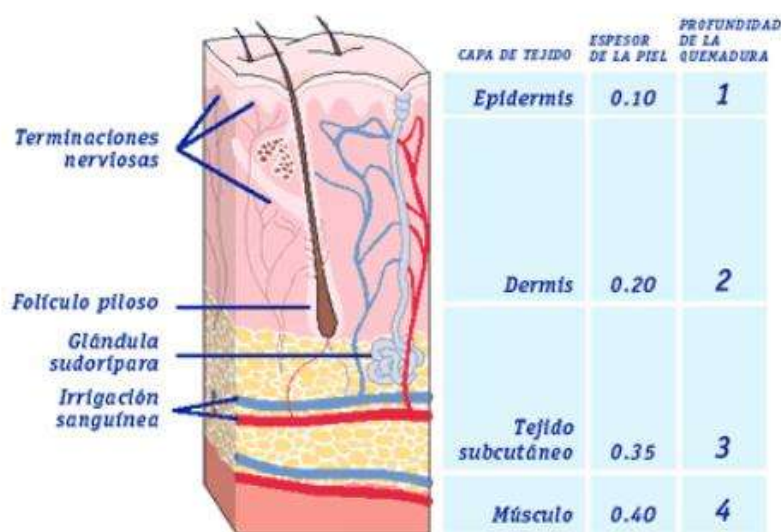


Fig. 6. Imagen de las capas de la piel

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Debido a que la piel está en contacto con el ambiente, es también uno de los órganos más susceptible a dañarse gravemente, principalmente por heridas (superficiales o profundas), úlceras de piel (diabéticos) o quemaduras (de primer, segundo y tercer grado) (11).

El cuerpo humano y en especial la piel, se caracterizan por su pobre capacidad para la auto-regeneración (49), de ahí la importancia del desarrollo e investigación de la bioingeniería para la construcción de piel artificial. Los sustitutos biosintéticos de la piel han de cumplir una serie de características, entre las que destacan: (11)

- Adhesión rápida y sostenida en la herida
- Prevención de la proliferación de la flora en la superficie de la herida
- Estructura que permita la proliferación y crecimiento de células y nuevo tejido
- Tejido compatible
- Bajo coste y biodegradabilidad

Los injertos de piel pueden ser temporales o permanentes, siendo éstos últimos los más importantes. En la actualidad, se puede utilizar tanto piel artificial de origen natural como piel artificial sintética. Las pieles de origen natural son muy variadas, destacando por ejemplo, la piel de origen porcino (xenograf), la sintetizada a partir de la membrana amniótica humana o la procedente de cadáver humano. Entre los materiales utilizados para la síntesis de pieles sintéticas se encuentran, combinados junto con otras sustancias, silicona, colágeno, nylon o poliuretano. (11)

En la actualidad la ingeniería de tejidos realiza avances en la síntesis de nuevos materiales de origen natural que puedan ser utilizados para la realización de injertos de piel. Cultivos in vitro de queratinocitos o fibroblastos han resultado ser una buena opción en este campo, aunque debido a que presentan ciertos problemas todavía se requiere más investigación (50).

La realización de injertos de piel de un donador a un receptor conlleva el problema del posible rechazo del paciente, así como la posibilidad de una grave infección. Por tanto lo ideal cuando se ha perdido una zona extensa de la dermis es realizar injertos de piel de otras zonas del cuerpo del propio paciente, ya que la posibilidad de rechazo es nula, (el uso de su propio tejido hace que éste esté inmunizado al rechazo). Debido a que en

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

muchos casos esto no es una opción pues puede no haber suficiente piel disponible o el paciente puede estar muy débil, el uso de pieles sintetizadas a partir de una sustancia proveniente del organismo del paciente parece ser una de las mejores salidas (en el caso del presente trabajo, su plasma). Uno de los motivos para la investigación con plasma humano es, además de sus propiedades gelificantes previamente mencionadas que pueden ayudar a la síntesis de piel, son sus propiedades para la estimulación de la angiogenesis o la proliferación de los fibroblastos (9). Desde hace años se viene investigando en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias con el prototipo de una piel artificial basada en plasma y fibroblastos, como base de la dermis artificial, para minimizar el riesgo de enfermedades transmisibles y mejora de la capacidad de integración. En este centro, han conseguido resultados esperanzadores en el tratamiento de úlceras vasculares crónicas. Este trabajo del año 2003 fue el primero de este tipo realizado en España (7).

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PROCESADO DE LA SANGRE

La sangre humana es una sustancia formada por un gran número de compuestos, que pueden deteriorarla fácilmente. Por tanto, para asegurar que se encuentra en las mejores condiciones para su uso, todas las muestras se recogieron el día de su obtención, y fueron congeladas debidamente hasta su uso.

3.1.1 OBTENCION

La sangre utilizada en este trabajo fue sangre humana, procedente de donadores anónimos a través del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo). Una vez extraída la sangre de los donadores sanos, ésta se recogió en sistemas de plástico debidamente cerrados para evitar posibles contaminaciones bacterianas. En las propias bolsas la sangre se mezcló con citrato-fosfato-dextrosa (anticoagulante), que cumple una doble función: aportar nutrientes a las células durante el tiempo que dura el almacenamiento y evitar que se produzca la coagulación de la sangre. Posteriormente se almacenó entre 1-5°C hasta su posterior fraccionamiento.

El fraccionamiento de la sangre se realizó mediante centrifugación para obtener así el plasma, hematíes y plaquetas. En general en este tipo de centros una vez que cada componente se encuentra en una bolsa independiente separado del resto, se somete a varios pasos de filtrado. Sin embargo, para la realización de este trabajo la sangre recibida estaba centrifugada aunque no separada, como puede verse en la figura 7.



Fig. 7. Sangre humana centrifugada; diferencia de dos fases: fracción celular y plasma

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Cabe destacar que antes de recibir la sangre, en el centro se realizaron una serie de análisis para comprobar el buen estado de la misma: determinación del grupo sanguíneo, detección de hepatitis B y C, detección del VIH, test de sífilis y por último recuento de los hematíes. Se muestra a continuación un esquema del proceso completo de obtención de la sangre.

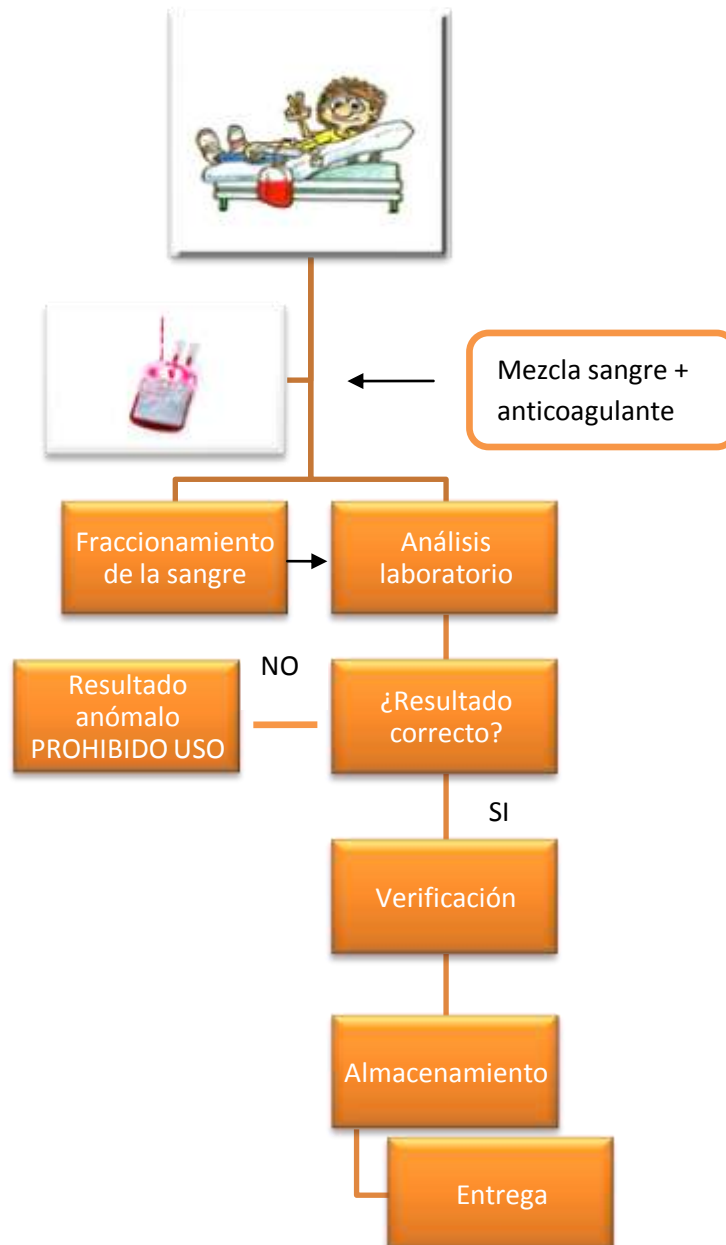


Fig. 8. Esquema de obtención de la sangre

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.2 SEPARACIÓN

Una vez centrifugada la sangre, hay dos partes claramente diferenciadas: la fracción celular y el plasma. La obtención final del plasma se realizó mediante separación por decantación. Posteriormente, el plasma se mantuvo bajo condiciones de congelación ($-18\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta su uso final, para evitar la pérdida de sus propiedades.

3.2 PROCESADO DEL PLASMA

Para la realización de este trabajo se procesó el plasma de tres formas diferentes. De aquí en adelante en esta memoria se les considerará como los experimentos A, B y C:

A- Plasma humano pH =7

En este primer experimento no se llevó a cabo tratamiento alguno del plasma. Éste se dejó a temperatura ambiente ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta su descongelación total (45 ± 5 minutos). A continuación se ajustó el pH a condiciones de neutralidad ($\text{pH}=7$), para evitar considerar pHs demasiado ácidos o básicos, utilizando HCl 0.5M. La medida del pH se realizó utilizando un *pHmetro Crisol micropH 2001*

B- Dilución proteínas plasmáticas pH=7

El plasma se dejó a temperatura ambiente ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta su descongelación total (45 ± 5 minutos). Se añadió a continuación a la muestra de plasma un 10% (v/v) de agua destilada, para realizar una pequeña dilución de las proteínas plasmáticas. Se ajustó el pH hasta obtener condiciones de neutralidad ($\text{pH}=7$), utilizando HCl 0.5M. Para la medida del pH se utilizó un *pHmetro Crisol micropH 2001*



Fig. 9. pHmetro Crisol micropH 2001

C- Decoloración del plasma utilizando el sistema H₂O₂/Catalasa

El plasma se dejó a temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta su descongelación total (45 ± 5 minutos). Se ajustó el pH hasta condiciones de neutralidad ($\text{pH}=7$) con HCl 0.5M, al igual que en el resto de experimentos. A continuación se introdujeron 10 ml de muestra en un vaso de precipitados, añadiendo seguidamente 3.4 ml de H₂O₂ como agente decolorante (proporción 3:1 v/v plasma: H₂O₂). Se dejó actuar agitando constantemente durante 30 minutos. Para eliminar el exceso de H₂O₂, se añadió el enzima catalasa (*Catalase from Micrococcus Lysodeikticus*) hasta obtener una concentración final del precipitado de 0,25% w/w. La catalasa actuó durante 1 hora. La muestra se almacenó durante 24 horas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3 SINTESIS DE GELES A PARTIR DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Los geles preparados a partir de las proteínas plasmáticas sintetizados en este trabajo formaron dispersiones agregadas, es decir, al plasma se le aplicó un tratamiento térmico inducido para provocar su gelificación. Se sintetizaron geles para cada tipo de muestra (A: Plasma humano $\text{pH}=7$, B: Dilución proteínas plasmáticas $\text{pH}=7$, C: Decoloración del plasma utilizando el sistema H₂O₂/catalasa). Para ello, una vez tratado el plasma como se indicó en el apartado anterior, se utilizaron dos formas distintas de aplicación del calor:

3.3.1 INCUBADOR

El incubador utilizado fue un *J.P.Selecta 2000209*. Este método fue utilizado tanto para el ensayo A como para el B, pero no para el C. En ambos ensayos se procedió de la misma forma. La muestra se colocó en placas de cristal de 40 mm de diámetro (*TSD Pierron*), añadiendo unos 3 g en cada una. A continuación, se introdujeron en el incubador para calentarse a $85 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Una vez se comprobó que la gelificación se había producido, se dejaron enfriar a temperatura ambiente $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Posteriormente se almacenaron de la siguiente forma:

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

- **Ensayo C**

- 1) CD-1 $f=1.000\text{Hz}$ Rampa temperatura: 20-90°C
Tiempo: 600s (aumento de temperatura de 7°C/min, 0.12°C/s)
- 2) CD-1 $f=1.000\text{Hz}$ Rampa temperatura:90-100°C
Tiempo: 600s (aumento de temperatura de 1°C/min, 0.017°C/s)
- 3) CS 0.000 Pa Conseguir 20±1°C
Tiempo < 900s

Las placas utilizadas para llevar a cabo la síntesis de los geles plasmáticos fueron la placa “*Measplate cover MP C35/S*” como placa inferior y “*Rotor C35/2 Cone with d=35mm angle 2 DEG*” como placa superior. Cabe destacar que previa introducción de la muestra es imprescindible ajustar la distancia entre los platos del sensor a cero. Una vez realizada esta operación, se situó la muestra en el plato inferior, de forma que cubriera toda la superficie del sensor y no se saliera fuera. El grosor de la misma fue de 1mm. Finalmente se emplearon cubiertas de cristal y aceite de silicona para evitar la desecación de las muestras.

Una vez sintetizado el gel en el reómetro, se despegó de la superficie con mucho cuidado, evitando su rotura al máximo posible, y se almacenaron de la misma forma que en el caso del incubador:

- **Ensayo A: para este ensayo se utilizaron dos formas distintas de almacenaje**

- GEL N° 4 : Introducción en agua destilada a temperatura ambiente hasta su análisis
- GEL N° 5: Geles almacenados a 4±1°C hasta su análisis (al menos 24 horas)

- **Ensayo B: para este ensayo se utilizó sólo una forma de almacenaje**

- GEL N°6: Introducción en agua destilada a temperatura ambiente hasta su análisis

- **Ensayo C: para este ensayo se utilizó sólo una forma de almacenaje**

- GEL N°7: Geles almacenados a 4±1°C hasta su análisis (al menos durante 24 horas)

3.4 DETERMINACIONES REOLÓGICAS

Las medidas reológicas se llevaron a cabo utilizando un reómetro rotacional (*HAAKE MARS II*) con un sistema para control de la temperatura (*UNIVERSAL TEMPERATURE CONTROLLER*), perteneciente a la unidad de Tecnología Alimentaria de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Se decidió llevar a cabo para cada tipo de muestra (A, B y C) tres ensayos distintos: rampa de temperatura, barrido de estrés y ensayos de fluencia y recuperación. Se describen a continuación cada uno de ellos.

3.4.1 BARRIDO DE TEMPERATURA

Antes de comenzar con el experimento, se debe asegurar que cada parte del equipo está correctamente encendida y preparada para el mismo (aire comprimido, controlador de temperatura, software...). Los barridos de temperatura (realizados en el rango de viscoelasticidad lineal), indican a qué temperatura la sustancia a analizar experimenta la transición de líquido a gel. Para ello, se llevaron a cabo rampas de temperatura de calentamiento y enfriamiento. Los programas utilizados fueron los siguientes:

- **Ensayos A y B**

- 1) CS 0.000 Pa Temperatura= 20°C
 Tiempo: 900s
- 2) CD-1 f=1.000Hz Rampa temperatura: 20-90°C
 Tiempo: 600s (aumento de temperatura de 7°C/min, 0.12°C/s)
- 3) CS 0.000 Pa Rampa temperatura: 90-20°C
 Tiempo: 900s (disminución de temperatura de 4.7°C/min, 0.08°C/s)

- **Ensayo C**

- 1) CS 0.000 Pa Temperatura= 20°C
 Tiempo: 900s
- 2) CD-1 f=1.000Hz Rampa temperatura: 20-90°C
 Tiempo: 600s (aumento de temperatura de 7°C/min, 0.12°C/s)
- 3) CD-1 f=1.000Hz Rampa temperatura: 90-100°C
 Tiempo: 600s (aumento de temperatura de 1°C/min, 0.017°C/s)
- 4) CS 0.000 Pa Conseguir 20±1°C
 Tiempo < 900s

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Cabe destacar que el motivo de realizar un paso de estabilización de las muestras antes de cada experimento es contrarrestar el estrés inducido durante la carga de las mismas (51). Al igual que en el caso de la síntesis de geles utilizando el reómetro, antes de comenzar estas medidas se debe ajustar la distancia de las placas a cero, cubrir toda la superficie del sensor con la muestra evitando que se salga fuera (con un grosor de la misma de 1mm) y usar aceite de silicona y cubiertas de cristal para evitar la desecación de las muestras. Las placas utilizadas en este caso fueron placas serradas (placa pequeña “Rotor PP35/S $D=35mm$ ” y placa grande “Measplate cover MPC35/S”). Las muestras se han analizado por duplicado.

3.4.2 BARRIDO DE ESTRÉS

Los barridos de estrés permiten conocer el rango viscoelástico en el que se mueven las muestras. Al igual que en el caso de los barridos de temperatura, asegurarse de que todas las partes del equipo están preparadas correctamente es primordial. En este caso, el procedimiento de operación no es exactamente igual que en el caso anterior, puesto que en lugar de partir de la muestra de plasma líquida, se parte de la muestra de plasma gelificada. Por tanto, previa realización del barrido de estrés se produce la gelificación en el propio reómetro, tal y como se indica en el apartado 3.3.2 de este trabajo, para cada tipo de ensayo como corresponde. Las placas utilizadas (tanto la inferior como la superior) fueron una vez más las serradas indicadas con anterioridad. El programa utilizado fue el siguiente:

- **Ensayos A,B y C**

- | | | | |
|-------|----------------|------------------|-----------|
| 1) CS | 0.000 Pa | Temperatura= 5°C | |
| | Tiempo 600s | | |
| 2) CS | 0,0100Pa-500Pa | Temperatura= 5°C | f=1,000Hz |
| | 40 pasos | | |

Cada tipo de muestra se ha analizado por duplicado.



Fig. 10. Reómetro rotacional HAAKE MARS II

3.4.3 ENSAYOS DE FLUENCIA Y RECUPERACIÓN

Los ensayos de fluencia y recuperación permiten conocer la estructura interna de los geles así como comprobar posibles cambios estructurales al variar su composición. Para la realización de los ensayos de fluencia y recuperación se debe partir de la muestra gelificada, por lo que al igual que sucedía con los barridos de estrés este paso previo se realiza en el propio reómetro (apartado 3.3.2) con el programa correspondiente para cada tipo de muestra. Las placas utilizadas en este ensayo fueron las placas serradas: placa pequeña “Rotor PP35/S $D=35mm$ ” y placa grande “Measplate cover MPC35/S”. Las muestras se han analizado por duplicado.

El programa utilizado se muestra a continuación:

- **Ensayos A, B y C**

- | | | |
|-------|--------------|------------------|
| 1) CS | 0.000Pa | Temperatura= 5°C |
| | Tiempo= 600s | |
| 2) CS | 10.00 Pa | Temperatura= 5°C |
| | Tiempo=180s | |
| 3) CS | 0.000Pa | Temperatura= 5°C |
| | Tiempo= 300s | |

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de la deformación del sistema, se utilizará el modelo de Burguer de cuatro componentes. Este modelo, representa la asociación del comportamiento puramente elástico o viscoso tanto en serie (modelo de Maxwell) como en paralelo (modelo de Kelvi-Voigt). La siguiente ecuación describe el sistema de deformación (18)

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - e^{\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right)} \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (Eq 15)$$

Donde J_0 es la complianza instantánea y J_1 es la complianza retardada. La suma de ambas proporciona la complianza en estado estacionario (J_e). La viscosidad newtoniana del amortiguador libre es μ_0 , mientras que λ_{ret} es el tiempo de retardo (el tiempo para alcanzar la máxima deformación); además representa el cociente $\frac{\mu_0}{G}$ donde G es el módulo instantáneo elástico de la unidad Maxwell.

Utilizando los valores de J_e , λ_{ret} , G y μ_0 , podremos comparar la estructura de los geles, pues proporciona un modelo mecánico responsable de la deformación.

3.5 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (WHC)

Se realizaron medidas sobre la capacidad de retención de agua de los geles plasmáticos, de acuerdo con los métodos basados en la centrifugación (52). Esta medida se realizó para todos aquellos geles del apartado 3.3, es decir:

- **Geles de los ensayos A y B:** sintetizados en el incubador y en el reómetro
- **Geles del ensayo C:** sintetizados en el reómetro

Una vez sintetizados los geles, se decidió analizar su capacidad de retención de agua en dos momentos concretos: tras finalizar su síntesis y después de dejarlos almacenados 24 horas a 4 ± 1 °C. Para ello, 1g de muestra se centrifugó a temperatura ambiente (20 ± 1 °C) a 20000xg durante 5 minutos, con una centrifuga *Eppendorf 5415R* y se volvió a pesar al finalizar el proceso. La capacidad de retención de agua se expresa de acuerdo al porcentaje de pérdida de agua, según la siguiente ecuación (53):

$$\% \text{ perdida agua} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (Eq. 16)$$

Siendo m_i la masa inicial de la muestra y m_f la masa después de la centrifugación

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.6 CRECIMIENTO DE CÉLULAS

Este apartado se realizó en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo). Se analizaron distintas muestras en dos bloques, tal y como se indica en las tablas 6 y 7:

Tablas 6 y 7. Resumen de los tipos de geles en los que se intentó el crecimiento de células

BLOQUE I

NÚMERO DE GEL	TIPO DE GEL	TIPO DE SINTESIS	TIPO DE ALMACENAMIENTO
1	Plasma pH=7 (ensayo A)	Horno	Agua destilada T. Ambiente
3	Plasma agua (ensayo B)	Horno	Agua destilada T. Ambiente
4	Plasma pH=7 (ensayo A)	Reómetro	Agua destilada T. Ambiente
6	Plasma agua (ensayo B)	Reómetro	Agua destilada T. ambiente

BLOQUE II

NÚMERO DE GEL	TIPO DE GEL	TIPO DE SINTESIS	TIPO DE ALMACENAMIENTO
2	Plasma pH=7 (ensayo A)	Horno	Nevera 4±1°C
5	Plasma pH=7 (ensayo A)	Reómetro	Nevera 4±1°C
7	Plasma H ₂ O ₂ (ensayo C)	Reómetro	Nevera 4±1°C

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

La forma de operar fue la misma para los dos bloques y para todos los tipos de geles. El tipo de células que se cultivaron en los geles son los fibroblastos (células presentes en la piel). Éstos, se cultivan unos días antes en un envase de plástico (75 cm²) con un medio de cultivo óptimo para su proliferación (medio líquido) a 37°C. Una vez cultivados, los fibroblastos deben extraerse del soporte, para lo cual se usa el enzima tripsina que romperá los enlaces entre las células y el soporte. La tripsina se introduce de forma líquida y se deja actuar entre 5-10 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo es necesario comprobar al microscopio que las células están sueltas. A continuación se centrifuga 10 minutos a 1400 rpm para continuar con la extracción. Terminada la centrifugación, el pellet situado al fondo estará formado por las células que una vez disueltas en el medio adecuado, se incubaran en los geles de plasma.

El primer paso en el tratamiento de los geles consistió en la introducción de los mismos en etanol 70° durante 30 minutos para su esterilización. Transcurrido ese tiempo se eliminó el etanol (pues es tóxico para las células) lavando con salino por duplicado. A partir de este momento todo el tratamiento de los geles se lleva a cabo bajo condiciones de esterilidad. Se introduce el gel en la placa de cultivo final. Finalmente se sitúan las células sobre los geles, de forma que éstas queden concentradas en el centro, favoreciendo su crecimiento en el gel y no en el soporte de plástico por el cual también tienen afinidad. Para ello, previamente deben contarse el número de fibroblastos por ml que hay en cada ocasión. En los experimentos del bloque I, se introducen 2 ml de medio con fibroblastos (estimación de 120.000 células) mientras que en los experimentos del bloque II se introducen 2 ml de medio con fibroblastos (estimación de 170.000 células). Finalmente se deja incubando a 37°C, siendo necesario el cambio de medio a los 4 días. Pasados 4 y 12 días, se comprueba la proliferación de los fibroblastos en el gel utilizando el *microscopio Olympus IX71*.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SINTESIS DE GELES A PARTIR DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

4.1.1 INCUBADOR

La síntesis de geles plasmáticos se llevo a cabo utilizando el *incubador J.P.Selecta 2000209*, en el caso de los ensayos A y B. Para los dos tipos de muestra se consiguió alcanzar la gelificación, sin embargo, ésta no fue uniforme. La tendencia general de los geles sintetizados en el incubador fue de secarse más por el centro de la placa circular que por los extremos, de forma que nunca se consiguió obtener un gel uniforme y sin fisuras. Además, en todos ellos fue difícil despegarlos de su soporte. En cuanto a los dos tipos de muestra utilizados en esta parte (ensayo A: plasma pH=7 y ensayo B: dilución de las proteínas plasmáticas con agua destilada) no se encontraron diferencias ni en el tiempo de gelificación ni en su apariencia o dificultad del manejo posterior (Fig. 11). El largo tiempo necesario para la síntesis de los geles así como su poca homogeneidad pudieron deberse a la dificultad para controlar en muchas ocasiones la temperatura del horno. Además, puede considerarse que la distribución del calor del incubador sobre la muestra no fue demasiado homogénea y se produjeron muchas pérdidas de calor.



Fig. 11. Apariencia de geles plasmáticos sintetizados en el incubador. A la izquierda el gel del ensayo A y a la derecha el gel del ensayo B

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La introducción de los geles en agua destilada a temperatura ambiente para su almacenaje (geles n° 1 y 3) implicó que pudieran conservarse correctamente. Sin embargo, con el paso de los días se volvieron cada vez más débiles estructuralmente, rompiéndose con facilidad cada vez que se intentaban manipular. Debido a estas razones se utilizó el otro modo de almacenamiento (gel n°2: $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ al menos 24 horas). Sólo se realizó para los geles del ensayo A debido a que no existían prácticamente diferencias respecto a los geles del ensayo B. En este caso, los geles quedaban más secos y por tanto mucho más fuertes estructuralmente y más fácilmente manejables (Fig. 12).



Fig. 12. Comparación visual de las dos formas distintas de almacenamiento de los geles del ensayo A. En la izquierda, después de estar 24 horas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ y en la derecha después de introducirlos en agua destilada

4.1.2 REÓMETRO

La síntesis de geles en este apartado se llevó a cabo utilizando un reómetro rotacional *HAAKE MARS II*. Se sintetizaron geles para los ensayos A, B y C. Se decidió utilizar el reómetro para la síntesis de geles debido a los resultados observados con el incubador: largo tiempo para alcanzar la gelificación, imposibilidad de sintetizar un gel homogéneo, estructura débil de los geles, poca manejabilidad... Con el reómetro se puede controlar muy bien la temperatura y el tiempo de aplicación de la misma. Además, el uso de placas metálicas que proporcionan directamente el calor sobre la muestra hace que éste se pueda distribuir más uniformemente sobre ella.

Al igual que en el caso anterior, no se encontraron diferencias entre los geles sintetizados en los ensayos A y B. Por otro lado, si había diferencias visuales respecto a los geles decolorados del ensayo C.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los geles de los ensayos A y B, tal y como se había predicho, resultaron completamente homogéneos y pudieron despegarse de las placas del reómetro íntegros. El tiempo de síntesis se redujo enormemente (tan sólo fueron necesarios 10 minutos) y su consistencia era mucho mejor, por lo que eran por tanto mucho más manejables.

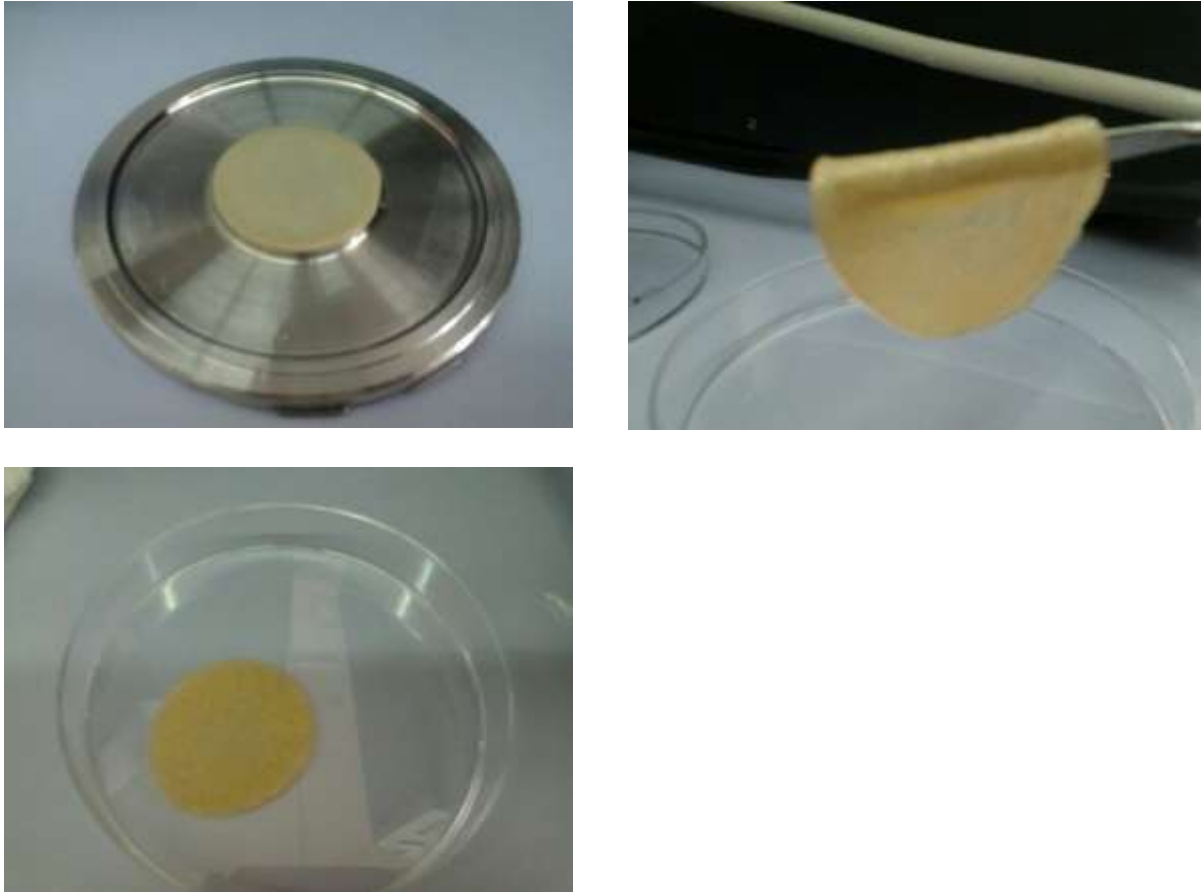


Fig. 13. Comparación visual de los geles del ensayo A (arriba) y ensayo B (abajo) sintetizados en el reómetro.

La introducción de los geles en agua destilada para su almacenaje (geles nº 4 y 6) implicó que pudieran conservarse correctamente, sin embargo y al igual que sucedió en el caso anterior, esto implicó que se debilitaran estructuralmente y fuera mucho más difícil manejarlos ya que se rompían con facilidad. Por tanto, los geles del ensayo A se almacenaron a $4\pm 1^\circ\text{C}$ al menos durante 24 horas (gel nº 5). En este caso, los geles al secarse se volvían mucho más flexibles y manejables, al mismo tiempo que con la pérdida de agua reducían su tamaño y se plegaban espontáneamente (Fig. 14).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Fig. 14. Gel del ensayo A almacenado durante 24 horas a $4\pm 1^\circ\text{C}$ sintetizado con el reómetro (gel nº5)

Por su parte los geles del ensayo C (plasma decolorado utilizando el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Catalasa}$) tal y como se pretendía resultaron ser más transparentes que los de los otros dos ensayos.



Fig. 15 Comparación del color de los geles del ensayo A (izquierda) y ensayo C (derecha) tras su síntesis en el reómetro

Sin embargo, la modificación del plasma en este sentido implicó que los geles se sintetizaran mucho peor, por lo que en el reómetro se les aplicó un tratamiento térmico

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

diferente (apartado 3.3.2). Este también fue el motivo de que no se intentara su síntesis en el incubador.

Una vez sintetizados los geles del ensayo C, se comprobó que eran más débiles estructuralmente que los de los otros dos ensayos, de forma que no era fácil manejarlos sin que se rompieran. Por tanto, sólo se utilizó un sistema de almacenaje (gel nº 7: $4\pm 1^\circ\text{C}$ durante al menos 24 horas). De esta forma, los geles se volvieron más flexibles y fuertes, aunque nunca tanto como sucedía con aquellos del ensayo A (gel nº 5).



Fig. 16. Comparación de geles del ensayo C (arriba) y ensayo A (abajo) tras ser almacenados a $4\pm 1^\circ\text{C}$ durante al menos 24 horas

4.2 DETERMINACIONES REOLÓGICAS

4.2.1 BARRIDO DE TEMPERATURA

Se aplicó un tratamiento térmico a las muestras de plasma para producir su transición de líquido a gel, de forma que éstas formaran dispersiones agregadas. Conocer la temperatura de gelificación es importante ya que ésta puede estar directamente relacionada con el pretratamiento sufrido por el plasma. En estos ensayos, se realiza un aumento de la temperatura a una velocidad constante. Las rampas de temperatura obtenidas se muestran en las figuras 17, 18 y 19. En ellas se representa el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') frente a la temperatura, a una frecuencia fija de 1.000Hz. La detección del punto de gelificación experimentalmente no es sencilla; sin embargo, se considera que ésta ocurre cuando G' y G'' se cruzan a una frecuencia dada o si esto no ocurre claramente, cuando ambas experimentan un incremento considerable (54).

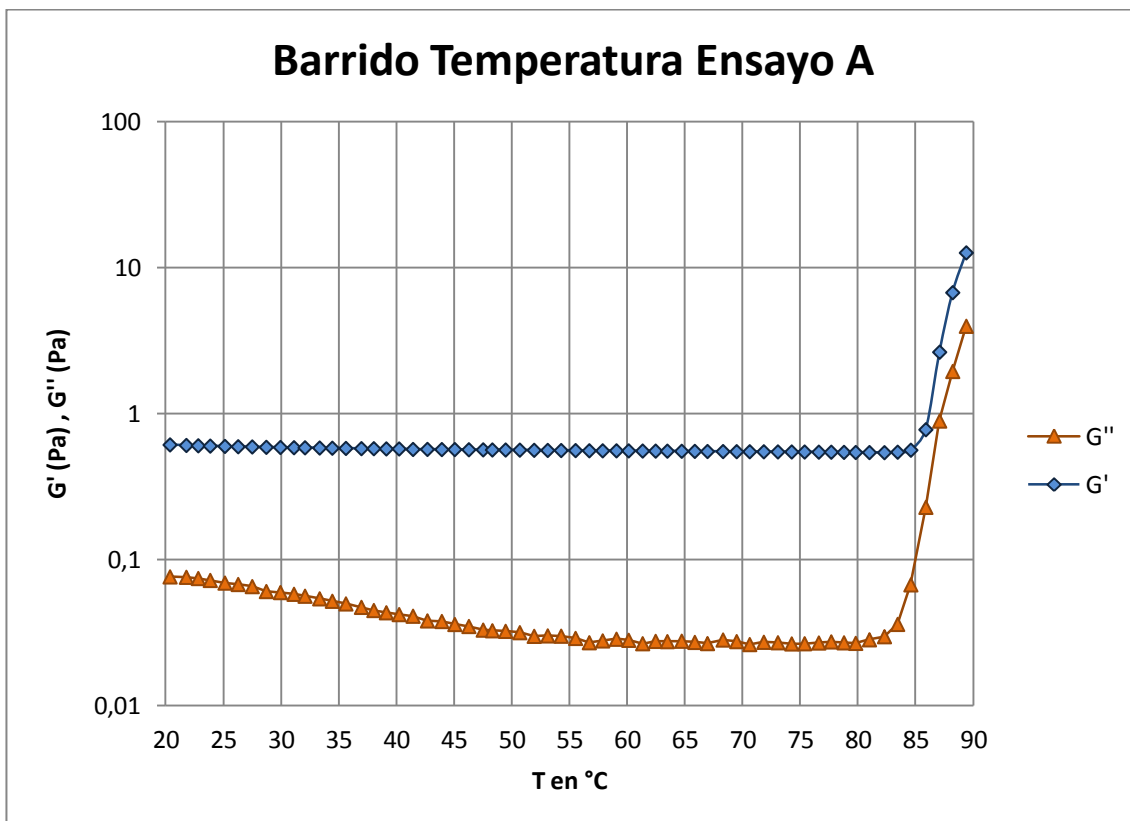


Fig. 17. Barrido de temperatura para el ensayo A

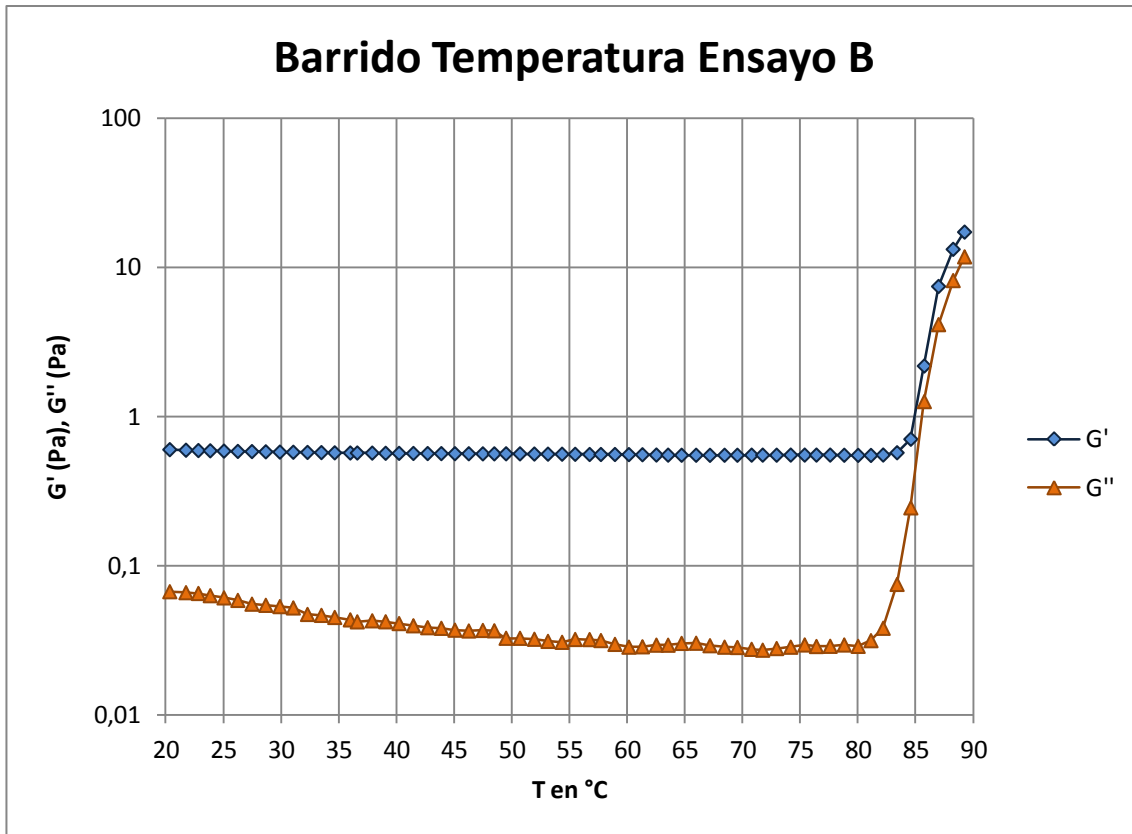


Fig. 18. Barrido de temperatura para el ensayo B

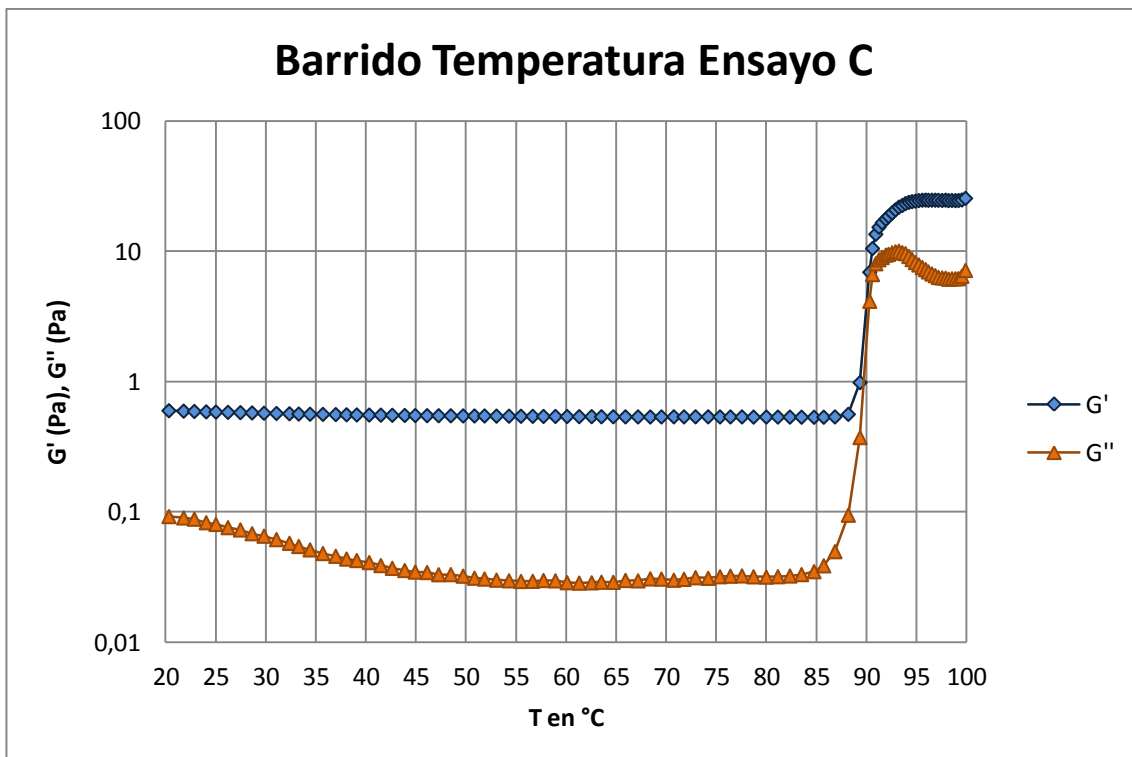


Fig. 19. Barrido de temperatura del ensayo C

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 8. Temperaturas de gelificación correspondientes a los ensayos A, B y C

TIPO DE GEL	TEMPERATURA DE GELIFICACIÓN (°C)
Ensayo A (Plasma a pH=7)	$86 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Ensayo B (Dilución proteínas plasmáticas pH=7)	$85 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Ensayo C (Plasma decolorado con el sistema H_2O_2 /Catalasa)	$90 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

En los tres casos estudiados los valores de G' y G'' son bastante parecidos. En ambos casos el módulo elástico fue mayor que el viscoso. En cuanto a la temperatura de gelificación, para los ensayos A y B ésta es prácticamente la misma, lo cual es coherente con los resultados obtenidos en la síntesis de geles en los que no había diferencia entre los dos ensayos. Por otro lado, para el ensayo C la temperatura de gelificación es 5°C mayor que en el resto, con lo cual se comprueba que a este tipo de muestra le cuesta más alcanzar la transición de líquido a gel: necesita una temperatura ligeramente superior para que esto suceda.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.2 BARRIDO DE ESTRÉS

Los barridos de estrés se llevaron a cabo sobre las muestras ya gelificadas para conocer el rango viscoelástico lineal de las mismas. Además, estos ensayos permitirán conocer el aguante de las muestras ante un esfuerzo determinado, comprobando si se rompen con mayor o menor facilidad. Para ello, a una temperatura y frecuencia fijas se aplica un esfuerzo inicial que se va aumentando hasta un esfuerzo final, y se comprueba que sucede con la muestra. Los barridos de esfuerzo obtenidos para cada tipo de ensayo se muestran en las figuras 20, 21 y 22. En ellos se representan los módulos elástico y viscoso (G' y G'' respectivamente) frente al esfuerzo de cizalla aplicado (τ) a una frecuencia de 1.000Hz. En el momento en que los valores de G' y G'' caigan considerablemente, es cuando se considera que el gel se ha roto y no soporta un esfuerzo mayor.

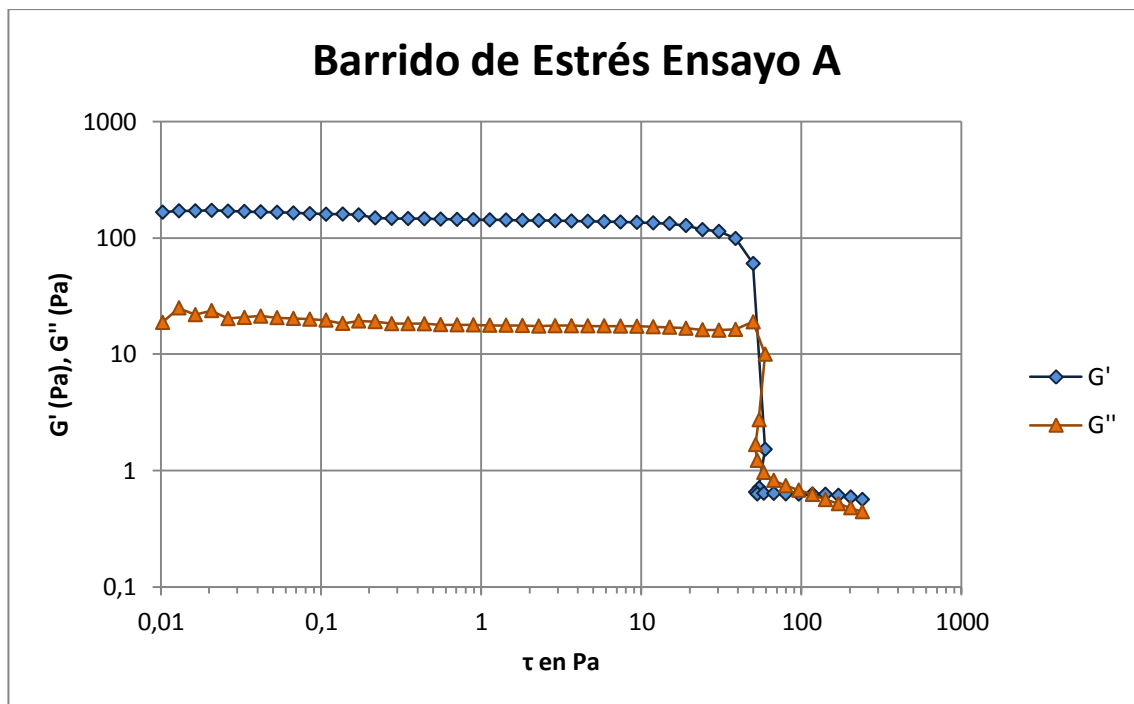


Fig. 20. Barrido de estrés para el ensayo A

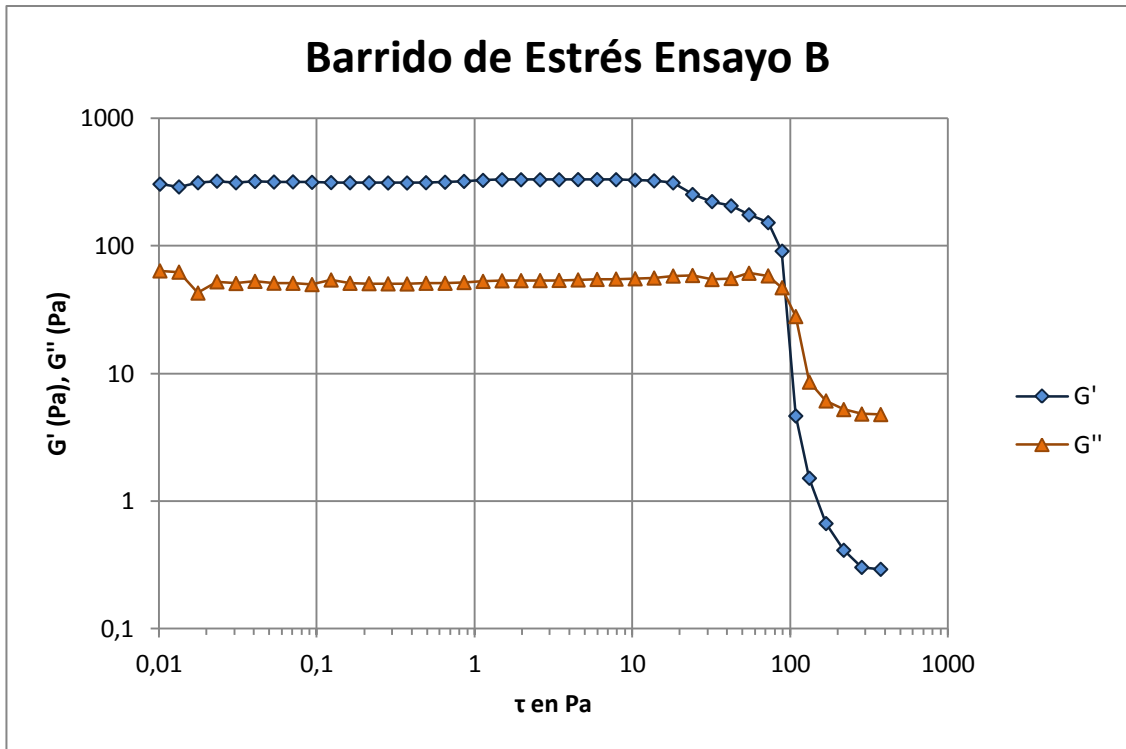


Fig. 21. Barrido de estrés para el ensayo B

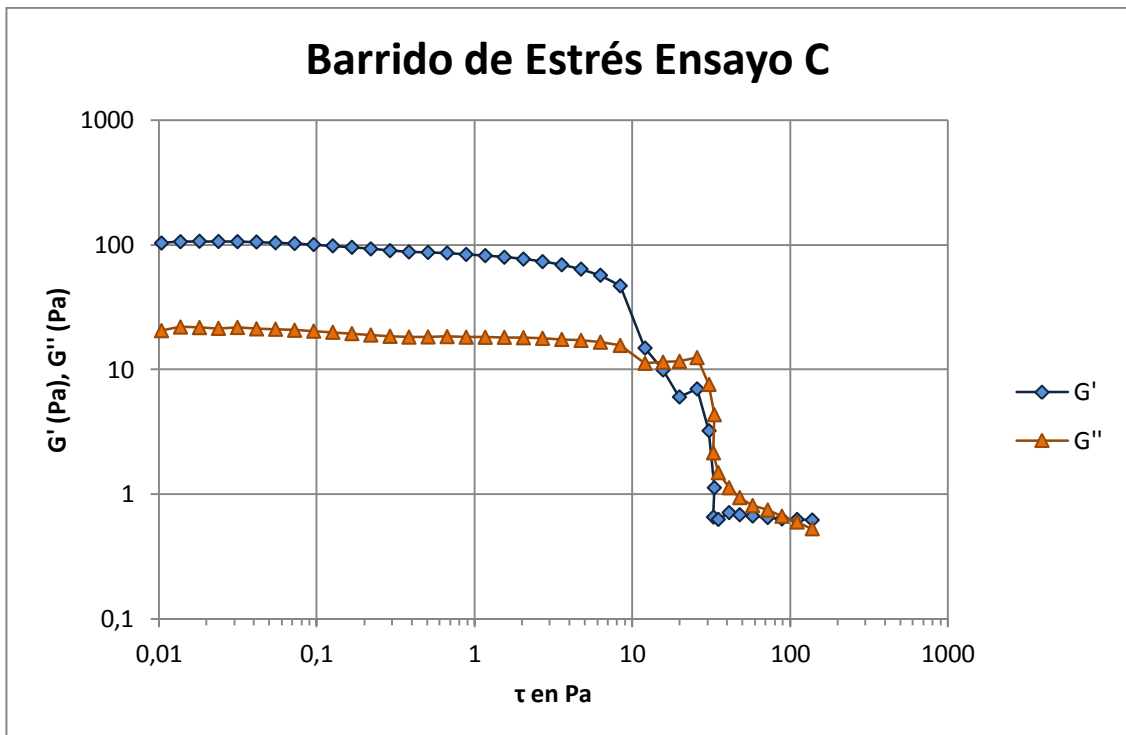


Fig. 22. Barridos de estrés correspondientes al ensayo C

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9. Resumen del esfuerzo soportado por cada tipo de gel

TIPO DE GEL	ESFUERZO SOPORTADO (τ) en Pa
Ensayo A (Plasma a pH=7)	50-70
Ensayo B (Dilución proteínas plasmáticas pH=7)	~ 100
Ensayo C (Plasma decolorado con el sistema H ₂ O ₂ /Catalasa)	10-30

En el ensayo A y C se obtienen valores de G' y G'' bastante parecidos, mientras que para el ensayo B los valores en general son un poco mayores. El rango viscoelástico lineal de las muestras está entre 0 y 100 Pa. Se comprueba que el gel del ensayo B (plasma diluido con agua destilada) es aquel que logra soportar un esfuerzo mayor antes de romperse (entorno a 100 Pa). El gel del ensayo A es el siguiente más resistente, soportando un esfuerzo entre 50 y 70 Pa. Ésta es la primera diferencia encontrada entre estos dos geles, puesto que en el resto de pruebas resultaron ser bastante similares. El gel del ensayo C por su parte es bastante débil, soportando únicamente un esfuerzo entre 10-30 Pa. Tal y como se descubrió con las rampas de temperatura, al plasma decolorado le resultaba más difícil alcanzar la transición de líquido a gel y en este caso le cuesta más soportar el esfuerzo de cizalla, rompiéndose al aplicarle un esfuerzo mucho menor que en los otros dos ensayos.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.3 ENSAYOS DE FLUENCIA Y RECUPERACIÓN

Los ensayos de fluencia y recuperación ayudan a entender la estructura interna de los geles, de forma que se puede comprobar qué posibles cambios estructurales suceden si se varía la composición de los mismos. En este tipo de ensayos, se aplica un esfuerzo durante un tiempo determinado (10 Pa durante 180 s en nuestro caso), de tal manera que la muestra se deforma. Una vez transcurrido ese tiempo, se deja de aplicar el esfuerzo y se observa el grado de recuperación de la muestra. Los materiales elásticos se recuperan totalmente, los viscosos no se recuperan y los viscoelásticos se recuperan parcialmente. Para los geles plasmáticos éste último es el tipo de comportamiento esperado. Los ensayos de fluencia y recuperación obtenidos para cada ensayo se muestran en las figuras 23, 24 y 25. En ellos se representa la deformación alcanzada (γ en %) frente al tiempo.

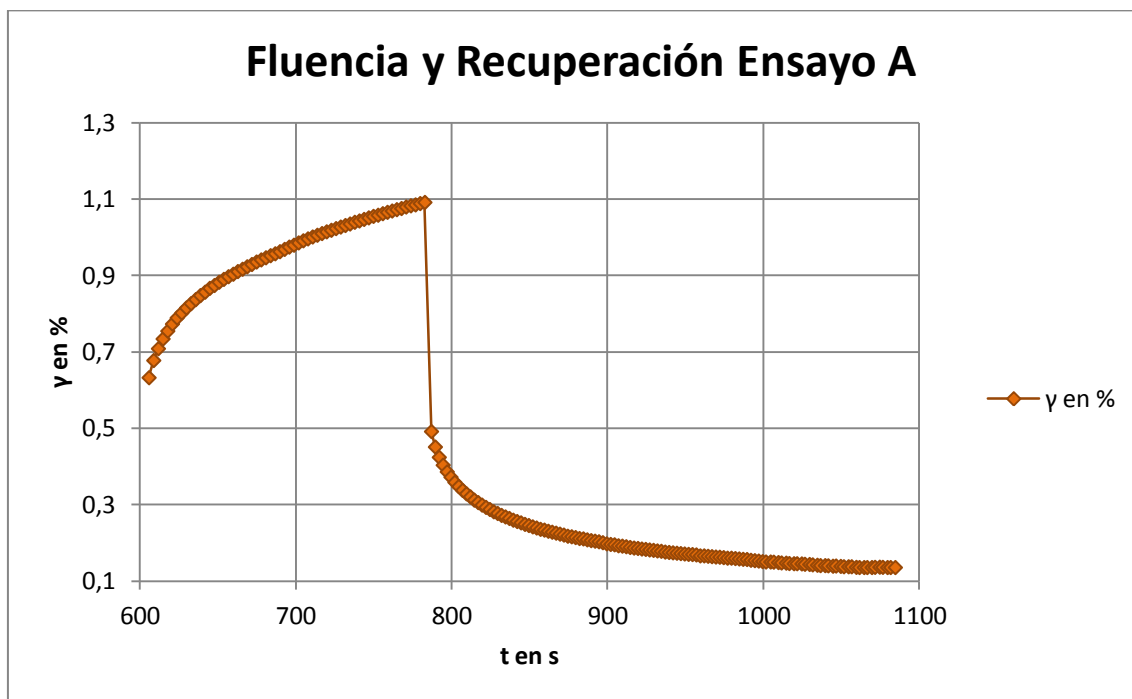


Fig. 23. Fluencia y recuperación para el ensayo A

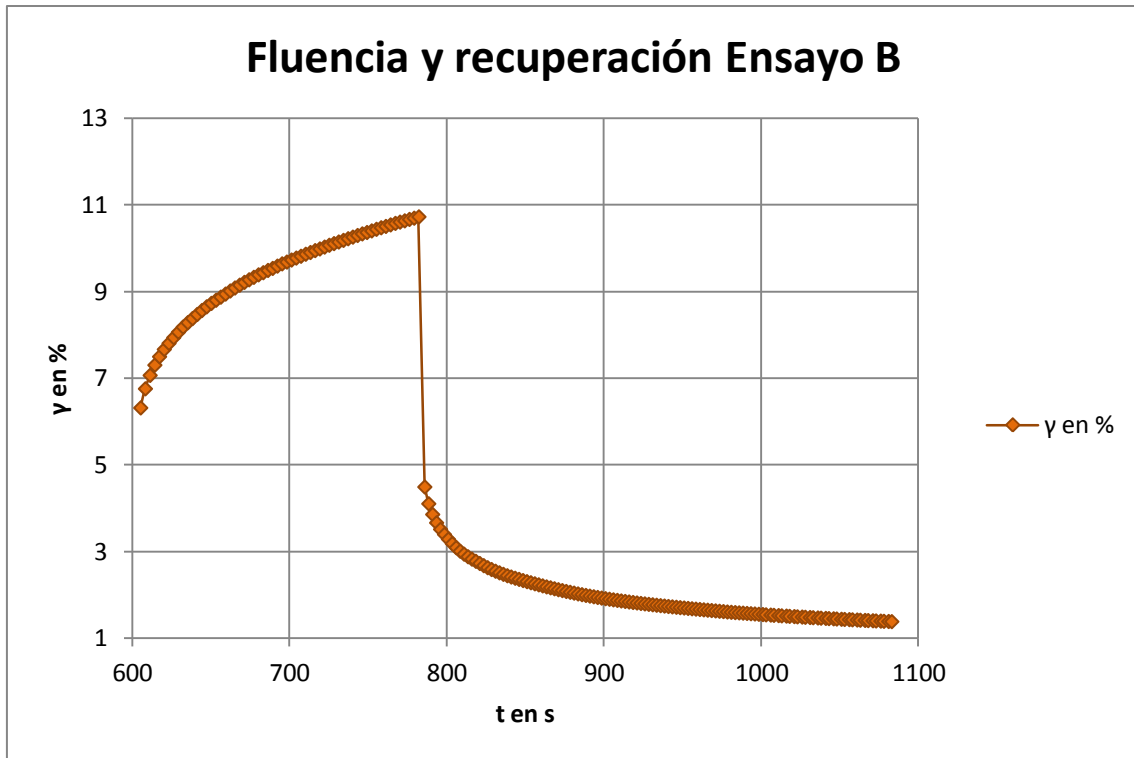


Fig. 24. Fluencia y recuperación para el ensayo B

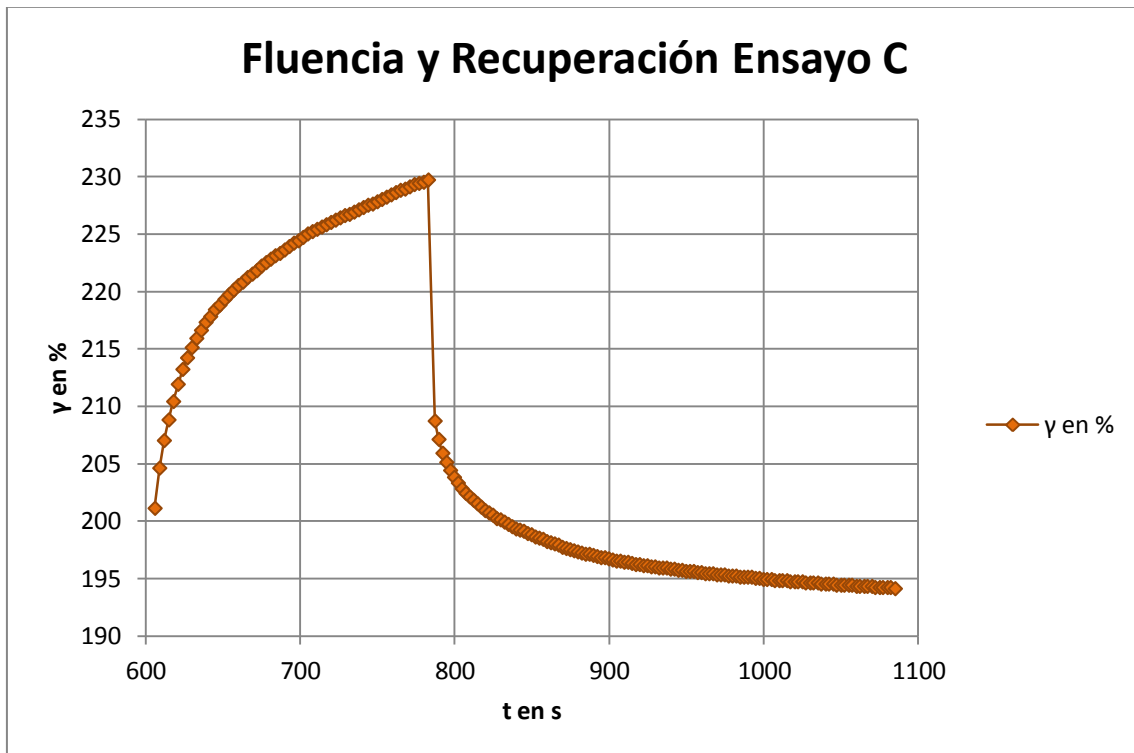


Fig. 25. Fluencia y recuperación para el ensayo C

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aplicando la ecuación 15 (punto 3.4.3) se obtienen los siguientes valores de J , λ_{ret} , G y μ_0 , así como los valores del porcentaje de recuperación para cada tipo de muestra, de forma que se puede comparar la estructura de los geles.

Tabla 10. Valores de los parámetros del modelo de Burguer para los geles de los ensayos A, B y C

TIPO DE GEL	μ_0 (Pa)	J_e (1/Pa)	G (Pa)	λ_{ret} (s)	% recuperación elástico
Ensayo A (Plasma a pH=7)	9.80E+05	9.06E-04	1.11E+03	880.0	87.4
Ensayo B (Dilución proteínas plasmáticas pH=7)	9.87E+04	8.89E-03	1.13E+02	870.3	87.2
Ensayo C (Plasma decolorado con el sistema H ₂ O ₂ /Catalasa)	1.93E+04	0.2204	4.537	4258	15.5

Respecto a las gráficas, se comprueba que tras la aplicación del mismo esfuerzo (10 Pa) el gel que más se deforma y por tanto el más débil es el perteneciente al ensayo C y el que menos se deforma (el más “fuerte”) corresponde al ensayo A. Estos resultados concuerdan con todos aquellos obtenidos durante todo el trabajo. Los valores de todas las variables para los ensayos A y B son bastante parecidos, lo cual es de esperar si tenemos en cuenta que excepto en el caso de los barridos de esfuerzo, se han comportado más o menos igual durante todo el proceso. Ambos geles experimentan un porcentaje de recuperación similar tras dejar de aplicar el esfuerzo sobre ellos (87.4 y 87.2 % respectivamente). Ese alto porcentaje sugiere que estos dos geles presentan un comportamiento más elástico que viscoso. Tal y como se había comprobado con los barridos de esfuerzo, son bastante resistentes a cualquier deformación que se les aplique. Además, el gel del ensayo A resultó ser aquel que presentó mayor oposición a la deformación, ya que muestra valores de μ_0 y G mayores. El gel del ensayo C mostró un porcentaje de recuperación bastante pobre (15.5 %), por tanto su comportamiento es mayormente viscoso. Esto explica a su vez porque en los ensayos de barridos de esfuerzo éste era más débil que el resto.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA

La capacidad de retención de agua se midió en función del porcentaje de pérdida de la misma, a través de métodos de centrifugación y utilizando la ecuación 16 (punto 3.5). Se pretendía analizar si existían diferencias en cuanto a éste parámetro tanto de los geles sintetizados en el incubador como en el reómetro. Además se comprobó como afectaba a su capacidad para retener agua su almacenaje durante 24 horas a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 11. Resumen de los porcentajes de pérdida de agua para cada tipo de gel

TIPO DE GEL	TIPO DE SÍNTESIS	% pérdida de agua a tiempo 0	% pérdida de agua tras almacenaje 24horas $4\pm 1^\circ\text{C}$
Ensayo A (Plasma a pH=7)	Incubador	12.51	1.61
	Reómetro	13.38	1.78
Ensayo B (Dilución proteínas plasmáticas pH=7)	Incubador	13.67	2.10
	Reómetro	14.81	1.9
Ensayo C (Plasma decolorado con el sistema H_2O_2 /Catalasa)	Reómetro	26.25	6.86

Como se puede comprobar con los datos de la tabla, la pérdida de agua fue mayor tras realizar la síntesis que después de almacenarlos a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Se debe a que en el momento de su síntesis todavía retienen cierta cantidad de agua, mientras que una vez que se dejan secar pierden la mayoría de ésta. Dicha cantidad para los ensayos A y B es bastante insignificante, es decir, después de 24 horas estos geles se secaron tanto que puede considerarse que ya no retienen agua. En el gel del ensayo C, 24 horas a $4\pm 1^\circ\text{C}$ no fueron suficientes para que se secase completamente y tras ese tiempo aún muestra bastante retención de agua. Esto concuerda con los resultados anteriores en los que se había comprobado el mayor carácter viscoso de la muestra y su mayor debilidad estructural.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, la síntesis de geles en el reómetro y en el incubador no proporciona diferencias claras en cuanto a la retención de agua. Parece que cuando son sintetizados en el horno se secan un poco más y no son capaces de retener tanta agua como cuando se sintetizan en el reómetro. Sin embargo, las diferencias entre estas dos formas de síntesis no son demasiado considerables.

4.4 CRECIMIENTO DE CÉLULAS

Tal y como se indica en el apartado 3.6, los geles en los que se comprobó el crecimiento de células de la piel se organizaron en 2 bloques. Para los geles del bloque I, no se consiguió ningún tipo de resultado, ya que su forma de almacenaje (inserción en agua destilada) aunque los conservaba correctamente, los hacía ser muy débiles estructuralmente y su manipulación resultaba complicada. Se rompían con facilidad y resultaron ser demasiado opacos para comprobar el crecimiento de células al microscopio. Esos fueron los motivos por los que se decidió llevar a cabo el ensayo C (decoloración del plasma sanguíneo) además de intentar utilizar otro tipo de almacenamiento (nevera a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$). Estos cambios se introdujeron en los geles del bloque II. De los tres tipos de geles de este bloque, sólo para los geles nº 5 y 7 se pudieron cultivar células, ya que el gel nº 2 estaba demasiado roto como para poder realizarlo. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

4 días de incubación

Transcurridos 4 días de incubación de los fibroblastos, se comprueba su crecimiento al microscopio en los geles nº 5 y 7.

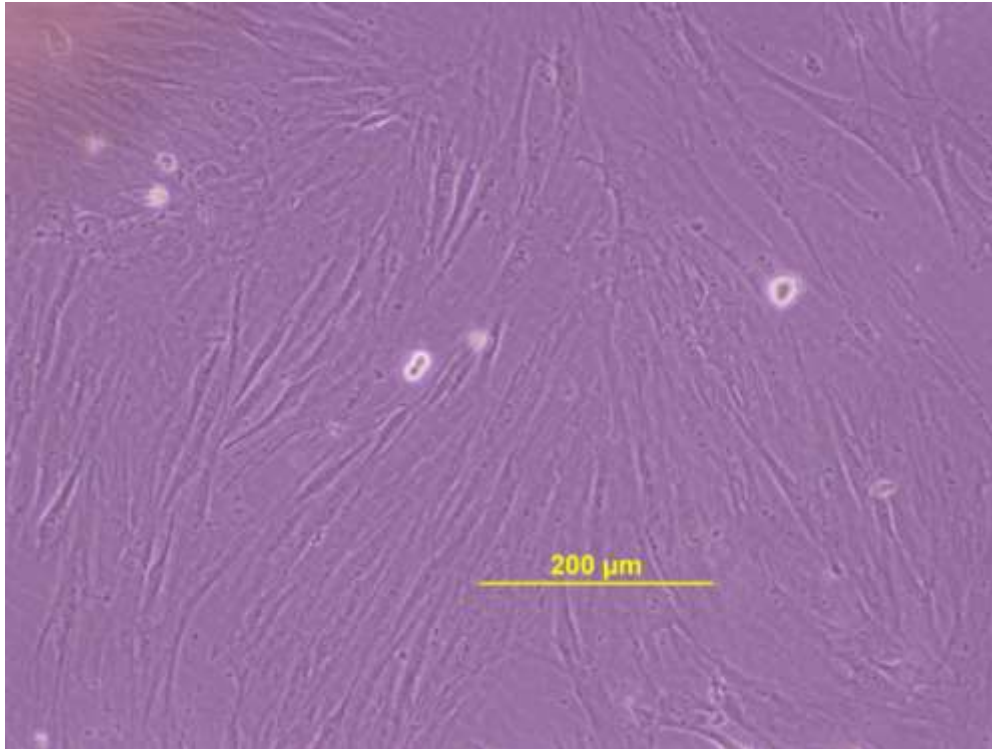


Fig. 26. Proliferación de los fibroblastos en el soporte plástico

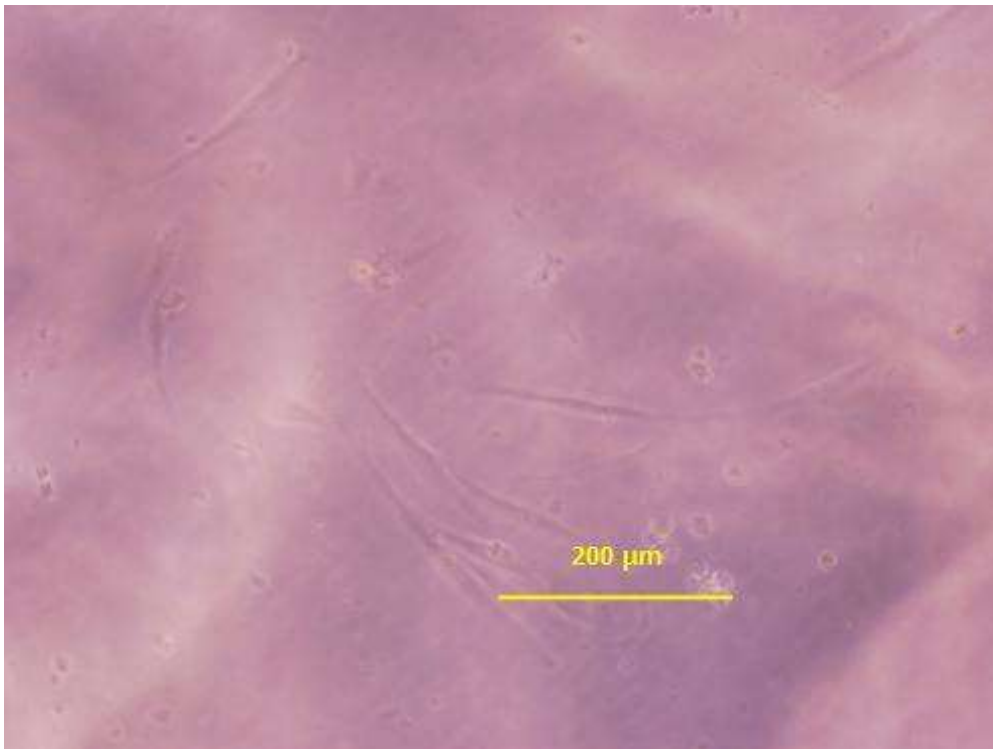


Fig. 27. Proliferación de los fibroblastos debajo del gel nº 7

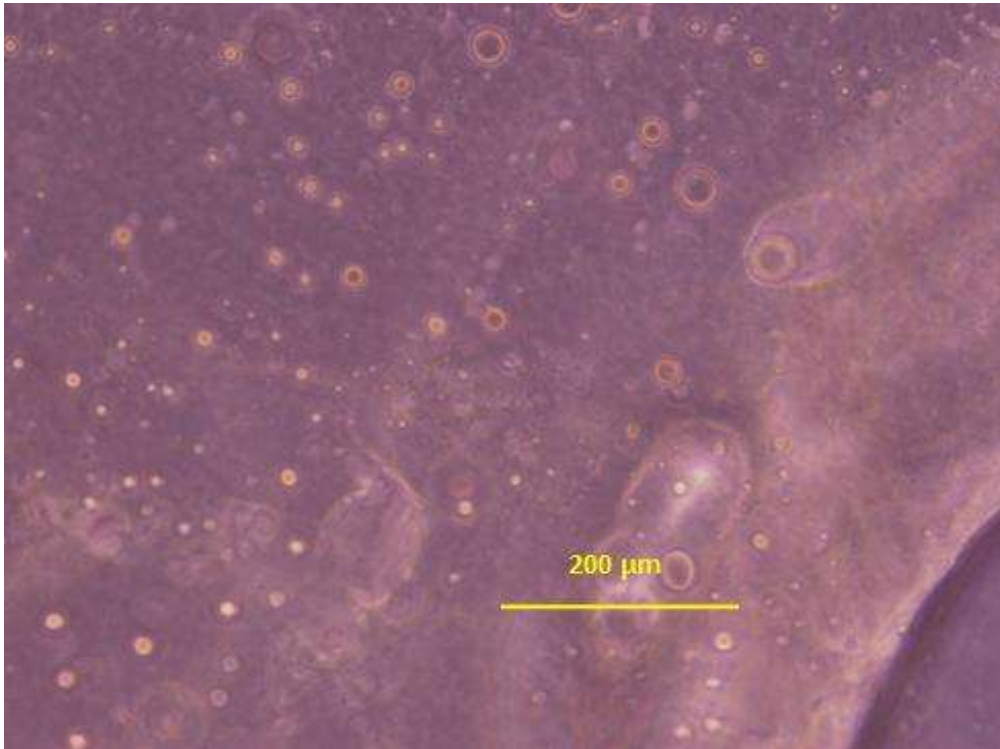


Fig. 28. Proliferación de células sobre la superficie del gel n° 5

Como se comprueba en las imágenes anteriores, los fibroblastos crecen perfectamente en el soporte plástico (figura 26), ya que éste medio les es muy favorable y una vez lo encuentran crecen en forma filamentosa. Para el gel decolorado con H_2O_2 (gel n°7) no se consigue la proliferación de las células sobre él, pues los fibroblastos que se aprecian están situados por debajo del gel (figura 27). Por otro lado, sobre el gel n° 5 aparecen algunas células circulares, que podrían ser las células que intentamos incubar. Sin embargo, puesto que no han adquirido su forma alargada característica, se dejan incubar durante 7 días más.

12 días de incubación

Tras 12 días de incubación se comprueba al microscopio si los fibroblastos han proliferado en la superficie del gel n° 5. Tal y como se aprecia en la figura 29, finalmente no ha ocurrido dicha proliferación. Las posibles células alargadas que se observan se encuentran debajo del gel. Se realiza la comprobación final, levantando el gel de la placa y mirando al microscopio como los fibroblastos que se apreciaban han crecido en el plástico y no se han ido con el gel (figura 29).

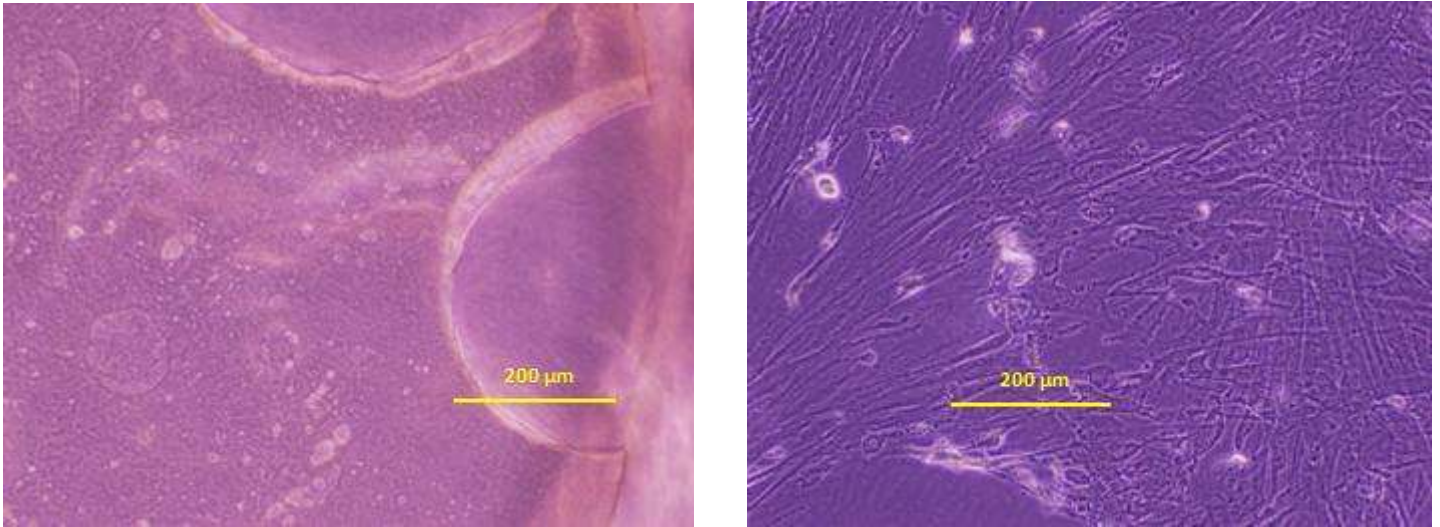


Fig. 29. No hay proliferación de fibroblastos en el gel (izquierda) y sí hay proliferación de fibroblastos debajo del gel (derecha)

No se ha llegado a una conclusión concreta de porque no se ha producido la proliferación en los geles, pues los fibroblastos son las células de la piel que mejor se pueden cultivar. Probablemente la superficie del gel plasmático no es totalmente idónea para que esto suceda. Otro tipo de materiales también han sido probados por parte del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias con el mismo fin, sin llegar tampoco en esos casos a buenos resultados. Es necesaria por tanto más investigación centrada en los geles plasmáticos con este tipo de aplicación, debido a las grandes ventajas previamente comentadas que supondría utilizar el plasma como soporte para la creación de nuevas pieles artificiales. Cambios en la forma de síntesis, almacenamiento o tratamiento previo antes de la siembra de células podrían ser estudiados en el futuro, así como el uso de otro tipo de células epiteliales que puedan producir mejores resultados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La síntesis de geles a partir de proteínas plasmáticas aplicando un tratamiento térmico inducido es posible, siendo mejor cuando ésta se produce en el reómetro en lugar de en el incubador, ya que el calor utilizado se aplica directamente en la muestra y apenas hay pérdidas por dispersión, de forma que se reduce considerablemente el tiempo de síntesis de los mismos. Además, tras su síntesis en el reómetro se consiguen geles homogéneos que pueden despegarse y manejarse con facilidad, al contrario de si se utiliza el incubador en el que nunca se obtuvo un gel sin ningún tipo de fisuras.
2. La forma de almacenamiento utilizada tras la síntesis de los geles es crucial para la obtención de sus características estructurales finales. Mientras que su introducción en agua destilada hacía que los geles se pudieran conservar correctamente, esto implicaba a su vez que se debilitaran estructuralmente y se rompieran, de forma que perdían su total manejabilidad. Por otro lado, su introducción a $4\pm 1^\circ\text{C}$ durante al menos 24 horas, hacía que los geles se secaran en gran medida, lo cual provocaba que su estructura se fortaleciera, volviéndose más flexibles y totalmente manejables.
3. El plasma de los ensayos A y B (plasma sin tratar y plasma diluido con 10% de agua destilada (v/v) respectivamente) se comportó de la misma forma a la hora de realizar la síntesis; los geles pertenecientes a estos dos ensayos eran iguales visualmente. El plasma del ensayo C (decolorado con el sistema H_2O_2 /catalasa) se decoloró correctamente, existiendo clara diferencia respecto al de los otros dos ensayos. Por otra parte, el tratamiento del plasma con el sistema H_2O_2 implicó que fuera más complicado obtener los geles, además de hacer que éstos fueran más débiles y por tanto menos manejables.
4. La transición líquido-gel en el caso de los ensayos A y B se alcanzó a la misma temperatura (86 y 85°C respectivamente), mientras que para el plasma del ensayo C ésta fue un poco mayor (90°C). Se comprobó además que el gel del ensayo C es bastante más débil estructuralmente que los de los otros dos ensayos, ya que tan solo es capaz de soportar un esfuerzo de entre 10 y 30 Pa, en comparación con los 60 Pa que soporta el gel A y los 100 Pa que puede soportar el gel del ensayo B. Se concluye por tanto que el tratamiento previo del plasma tiene influencias en la estructura del gel posterior.

CONCLUSIONES

5. Gracias a los ensayos de fluencia y recuperación, se determinó el rango viscoelástico lineal de las muestras (entre 0-100 Pa). Los geles de los ensayos A y B mostraron un comportamiento principalmente elástico (87.4 y 87.2 % recuperación elástica respectivamente). Esto explica que este tipo de geles fueran más fuertes y manejables cuando se sintetizaron. Por su parte el gel del ensayo C resultó ser más viscoso que elástico (15.5 % de recuperación elástica), lo cual explica todas las pruebas anteriores en las que se encontró que este tipo de gel era mucho más débil y menos manipulable.
6. La capacidad de retención de agua de los geles no está influenciada por la forma de síntesis llevada a cabo. Los geles retenían unas 10 veces más cantidad de agua tras su síntesis que después de dejarlos en nevera a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, alcanzándose los mayores valores para el gel del ensayo C (26% de pérdida de agua tras su síntesis). Esto explica una vez más porque este gel era más débil estructuralmente y más viscoso que el resto.
7. Debido a los problemas encontrados de rotura, debilidad y color con algunos de los geles, la incubación de fibroblastos solo se llevó a cabo en dos geles pertenecientes a los ensayos A y C. Debido a la debilidad del gel del ensayo C el cultivo de células en éste resultó imposible, pues los fibroblastos rápidamente crecieron en el soporte plástico en lugar de sobre la superficie del gel. Para el gel A, a pesar de cultivar durante 12 días y observar ciertas células sobre la superficie del mismo, se comprobó finalmente que la proliferación de fibroblastos sobre el gel no fue posible (su estructura filamentosa característica se veía en el soporte y no en el gel), probablemente porque sus características superficiales no eran las adecuadas para el crecimiento de éstos.
8. Como resumen final, se puede concluir que tras los resultados de los ensayos reológicos se comprueba que el tratamiento previo del plasma influye en las características reológicas de los geles posteriores. Los geles decolorados resultaron más transparentes, lo cual los hacía ideales para poder seguir el crecimiento de células. Sin embargo, también eran más débiles y por tanto inútiles para su uso como soporte para la creación de nuevas pieles artificiales, ya que una de las principales características que deben tener es gran resistencia y flexibilidad. Los geles de plasma sin decolorar, mostraron comportamientos parecidos durante todas

CONCLUSIONES

las pruebas del proyecto, siendo bastante resistentes, manejables y flexibles, por lo que a pesar de su color a priori eran ideales para la creación del nuevo soporte para pieles artificiales buscado. Sin embargo, el crecimiento de células tras 12 días de incubación no fue posible, probablemente debido a que las características superficiales del gel no eran ideales para la proliferación de los fibroblastos. Buscar el gel adecuado para el crecimiento de células epiteliales con las características reológicas correctas y el color adecuado para su uso en biomedicina regenerativa es el camino por el que debe seguir este campo de investigación.

NOMENCLATURA

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

· A	Área
· Bar	Bares (medida de presión)
· °C	Grado centígrado
· cm	Centímetro
· cm ²	Centímetro cuadrado
· cos	Coseno
· CS	Modo de esfuerzo controlado
· CD	Modo de deformación controlada
· DSC	Differential Scanning Calorimetry
· De	Número de Deborah
· dl	Decilitro
· DQO	Demanda química de oxígeno
· Eq.	Ecuación
· f	Fuerza
· f	Función
· Fig.	Figura
· G	Módulo instantáneo elástico de la unidad de Maxwell
· G'	Módulo elástico
· G''	Módulo viscoso
· g	Gramo
· g	Fuerza de centrifugación
· Hz	Hercio
· Ig	Inmunoglobulina
· J ₀	Compliance instantánea
· J ₁	Compliance retardada
· J _e	Compliance en estado estacionario
· Kg	Kilogramo
· L	Litro
· M	Molar
· ml	Mililitro
· min	Minuto

NOMENCLATURA

· m	Metro
· m ²	Metro cuadrado
· mg	Miligramo
· mPa	Milipascal
· m_i	Masa inicial
· m_f	Masa final
· N	Newton
· N°	Número
· n	Índice de comportamiento
· OMS	Organización Mundial de la Salud
· Pa	Pascales
· rpm	Revoluciones por minuto
· SEM	Scanning Electron Microscopy
· SDS-PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis
· s	Segundo
· sin	Seno
· t	Tiempo
· tan	Tangente
· T	Temperatura
· VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
· % v/v	Porcentaje en volumen
· % w/w	Porcentaje en peso
· XX	Veinte

LETRAS GRIEGAS

· α	Alfa
· β	Beta
· γ	Gamma
· γ	Deformación
· $\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación
· γ_0	Amplitud de la deformación
· λ_{ret}	Tiempo de retardo

NOMENCLATURA

· μ	Viscosidad
· μ_0	Viscosidad newtoniana del amortiguador libre
· μ_p	Coefficiente de viscosidad plástica
· μm	Micrómetro
· σ	Esfuerzo aplicado
· τ	Esfuerzo cortante aplicado
· τ_0	Valor de fluencia
· ω	Frecuencia

BIBLIOGRAFÍA

1. P. Hoyo, M. Rendueles, M. Díaz. *“Valorización de sangre de mataderos mediante el desarrollo de nuevos materiales y productos”*. Tesis doctoral- Universidad de Oviedo-2012
2. J. Boatella Riera, R. Codony Salcedo, P. López Alegret *“Química y Bioquímica de los alimentos II”* (2004)
3. E. Davila, D. Pares, G.Cuvelier, P.Relkin *“Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH” Meat Science* Vol 76, p. 216-225 (2007)
4. E. Davila, D. Pares *“Structure of heat induced plasma protein gels studied by fractal and lacunarity analysis” Food Hydrocolloids* Vol 21, p. 147-153 (2007)
5. S. Dailloux, G. Djelveh, A. Peyron, C. Oulion *“Rheological behaviour of blood plasmas concentrated by ultrafiltration and by evaporation in relation to liquid-gel transition temperature” Journal of Food Engineering* Vol 55, p. 35-39 (2002)
6. E. Davila, M. Toldra, E. Saguer, C. Carretero, D. Pares *“Characterization of plasma protein gels by means of image analysis” LWT* Vol 40, p. 1321-1329 (2007)
7. L. Camblor, A. Meana , J.M.Llaneza, F. Vaquero, S.Gómez, D.López, H.Cubillas, N.Alonso, M.J. Ramos, J.A.Carreño, M.A. Menendez, J. Alvarez, J. Rodriguez, J.M. Gutierrez *“Tratamiento de úlceras vasculares crónicas con equivalentes cutáneos obtenidos mediante ingeniería tisular” Angiología* Vol 55, p. 21-33 (2003)
8. Dean H.Whitman, Ronald L. Berry, David M. Green *“Platelet gel: an autologous alternative in oral and maxillofacial surgery” Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* Vol 55 (Issue 11), p. 1294-1299 (1997)
9. N. Pallua, T. Wolter, M. Markowicz *“Platelet rich plasma in burns” Burns* Vol 36, p. 4-8 (2010)
10. A.F. Palacio, M.A. Hoyos *“Reanimación del paciente quemado” Iatreia* Vol 21 (nº 2), p. 153-165 (2008)
11. C.R. López, A.G. Acosta, J.L.Diaz *“Piel artificial” Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada* Vol 2 (nº8), p. 41-47 (2006)
12. <http://www.uv.es/~reologia/> Diciembre 2012

BIBLIOGRAFIA

13. H.A. Barnes, J.F.Hutton AND K.Walters *“An introduction to rheology”* ELSEVIER (1989)
14. Gebhard Schramm *“A practical approach to rheology and rheometry”* (1998)
15. J.W. Kane, M.M. Sternheim *“Física”* REVERTÉ (2007)
16. http://www.ing.unlp.edu.ar/dquimica/paginas/catedras/iofq809/apuntes/Fluidos%20no%20newtonianos_R1.pdf Diciembre 2012
17. <http://www.efn.unc.edu.ar/departamentos/aero/Asignaturas/MecFluid/material/introducci%C3%B3n%20no%20newtonianos.pdf> Diciembre 2012
18. J.F. Steffe *“Rheological methods in food process engineering”* (1996)
19. <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3624/1/tema3RUA.pdf> Diciembre 2012
20. P. Farreras *“Medicina Interna”* ED. DOYMA (1992)
21. Jan Koolman, Klaus-Heinrich Röhm *“Bioquímica: textos y atlas”* EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA (2004)
22. Escrito por Donald Voet, Judith G. Voe, Charlotte W. Pratt *“Fundamentos de bioquímica”* EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA (2007)
23. Constantino de Llano *“Física”* (1998)
24. <http://todoenfermeria.es/inicio/apuntes/anatomia/sangre.pdf> Enero 2013
25. <http://www.ub.edu/legmh/capitols/napal.pdf> Enero 2013
26. H. R. Moyado, E. Q. García, M. H. Mejía *“El banco de sangre y la medicina transfusional”* EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA (2004)
27. G. Thews, E. Mutschle, P.Vaupel *“Anatomía, Fisiología y Patofisiología del hombre”* EDITORIAL REVERTÉ (1983)
28. B. G. Iglesias, M. L. Gallardo, A.I. Martin *“Bases de la fisiología”* (2007)
29. <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/proteinas.pdf> Enero 2013
30. J.M.Teijon, A.G. Pertierra, D.B. Gaitan, C.V. Gutierrez, C.M. Oltras, J.R.Rodrigo *“Fundamentos de bioquímica estructural”* EDITORIAL TEBAR (2006)
31. A. Gennaro *“Remington, farmacia”* EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA (2003)
32. <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21369/Antecedentes.pdf> Enero 2013
33. A.Totosaus *“Funcionalidad de proteínas musculares”* Mexico (2006)
34. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Instituto Tecnológico Agroalimentario *“Aplicaciones del Manual Media a Sectores Industriales: Sector Cárnico”* (2001)

BIBLIOGRAFIA

35. X. Duan, H. Sheardown *“Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions”* *Biomaterials* Vol 27, p. 4608-4617 (2006)
36. <http://www.cornea.es/enfermedades%20de%20la%20cornea.htm> Mayo 2013
37. L.Liu, L.Kuffova, M.Griffith, Z.Dang, E.Muckersie, Y.Liu, C.R. McLaughlin, J.V.Forrester *“Immunological response in mice to full-thickness corneal grafts engineered from porcine collagen”* *Biomaterials* Vol 28, p. 3807-3814 (2007)
38. B.D.Lawrence, J.K. Marchant, M.A. Pindrus, F.G. Omenetto, D.L. Kaplan *“Silk film biomaterials for cornea tissue engineering”* *Biomaterials* Vol 30, p. 1299-1308 (2009)
39. http://elpais.com/elpais/2013/02/21/media/1361484991_017574.html Mayo 2013
40. Huri Hawa Montiel *“Transplante de cornea, criterio clínico quirúrgico”* *Revista de Investigación Clínica* Vol 57 (nº 2) México (2005)
41. J.L.R. Peña, I.S. Redel, N.D. Payahuela *“Trasplante de Córnea: Perfil Epidemiológico y Resultados en 9 años de experiencia”*. *Cimel* Vol 10 (nº2) p.14-21 (2005)
42. S.L. Hernandez E.M. Moreno, E.E. Leyva, A.C. Perez, Z.P.Parra, S.M.Villalon, C.P.Gonzalez *“Queratoplastia: características clínicas y evaluación de los resultados”* *Revista Cubana de Oftalmología* Vol 21 (nº1) (2008)
43. W.Liu, K Merret, M.Griffith, P.Fagerholm, S.Dravida, B.Heyne, J.C.Scaiano, M.A. Watsky, M.Shinozaki, N.Lagali, R.Munger, F.Li *“Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes”* *Biomaterials* Vol 29, p.1147-1158 (2008)
44. D.G. Wallace, J. Rosenblatt *“Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering”* *Advance Drug Delivery Reviews* Vol 55, p.1631-1649 (2003)
45. V.K. Lai, C.R.Frey, A.M. Kerandi, S.P. Lake, R.T. Tranquillo, V.H.Barocas *“Microstructural and mechanical differences between digested collagen-fibrin co gels and pure collagen and fibrin gels”* *Acta Biomaterialia* Vol 8 p. 4031-4042 (2012)
46. K.Nam, T.Kimura, S.Funamoto, A.Kishida *“Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: in vitro and in vivo biological properties of the collagen gels”* *Acta Biomaterialia* Vol 6 p.409-417 (2010)

BIBLIOGRAFIA

47. J.L. Alio, M. Abad, A. Artola, J.L. Rodriguez-prats, S. Pastor, J. Ruiz-Colecha
“Use os autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers” *Ophthalmology* Vol 114 (nº7) p.1286-1293 (2007)
48. <http://148.206.53.231/UAMI15631.pdf> Mayo 2013
49. E.Anitua, M.H. Alkhraisat, G.Orive ***“Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors”*** *Journal of Controlled Release* Vol 157 p. 29-38 (2012)
50. M.L. Arango, C.I.Chamorro, L.M.Restrepo, L.A. Correa, J.Henao
“Características histológicas de piel cultivada in vitro” *Revista Argentina Dermatologia* Vol 90 p. 190-200 (2009)
51. A. Laca, M. Sáenz, B. Paredes, M. Diaz ***“Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent”*** *Journal of Food Engineering* Vol 97 p. 243-252 (2009)
52. W. Kneifel, P. Paquin, T. Albert, J.P. Richard ***“Water-holding capacity of proteins with special regard to mild proteins and methodological aspects-a review”*** *Journal of Dairy Science* Vol 74 (nº 7) p. 2027-2041 (1991)
53. W. chantrapornchai, D.J. McClements ***“Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels”*** *Food Hydrocolloids* Vol 16 (nº 5) p. 467-476 (2002)
54. F. cordobés, P. Partal, A. Guerrero ***“Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels”*** *Rheological Acta* Vol 43 p. 184-195 (2004)

FIGURAS

Fig.2.http://www.ing.unlp.edu.ar/dquimica/paginas/catedras/iofq809/apuntes/Fluidos%20no%20newtonianos_R1.pdf Diciembre 2012

Fig. 3. <http://www.bsca.org/default.asp?ComponentesSanguineos>

Fig.6..http://www.fresenius-kabi.es/nutricionenteral/pdf/patologias/patologia_quemados.pdf

Fig.30. PROTEIN DATA BANK (RCSB)

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1AO6>

Fig. 31. PROTEIN DATA BANK (RCSB)

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1MCO>

BIBLIOGRAFIA

Fig. 32. Escrito por Donald Voet, Judith G. Voe, Charlotte W. Pratt *“Fundamentos de bioquímica”* EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA (2007)

APENDICE I: ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Se muestran a continuación las estructuras pertenecientes a los tres grandes grupos de proteínas plasmáticas: albúmina, inmunoglobulina (perteneciente a las globulinas) y fibrinógeno.

ALBÚMINA

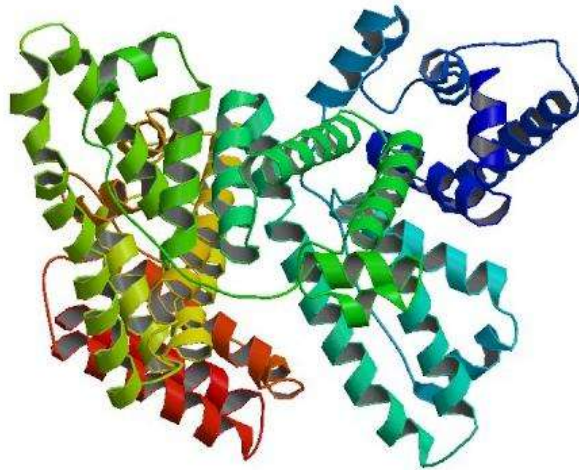


Fig. 30. Estructura cristalina de la albúmina del suero humano obtenida a través de un experimento de difracción de rayos-X, con una resolución de 2,5 Å.

INMUNOGLOBULINA (GLOBULINA γ)

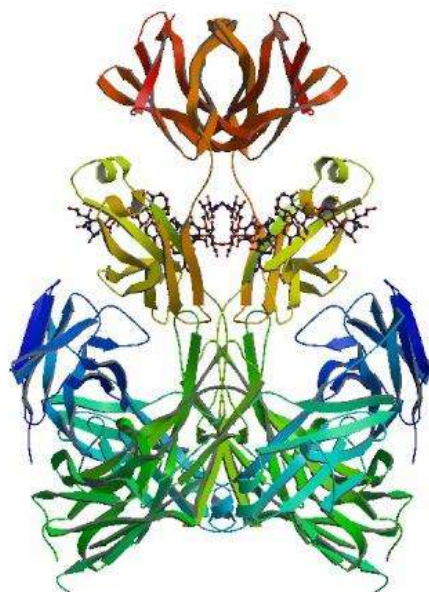


Fig. 31. Estructura tridimensional de una inmunoglobulina humana, obtenida a través de un experimento de difracción de rayos-X, con una resolución de 3,20 Å

FIBRINÓGENO

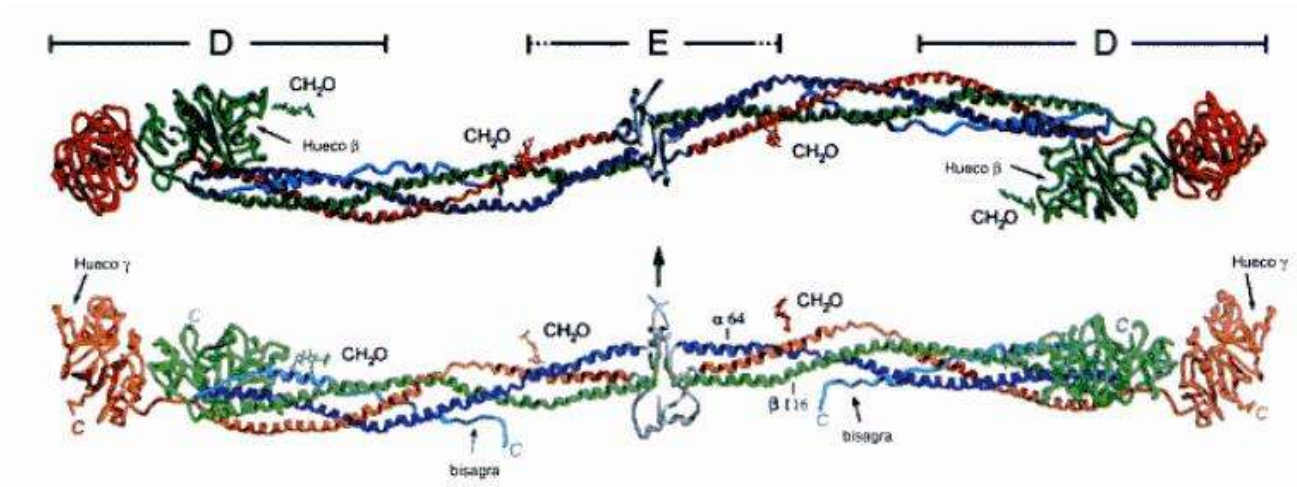


Fig. 32. Estructura del fibrinógeno bobino obtenida a través de un experimento de difracción de rayos X con una resolución de 4Å.