

**UNIBERTSITATEKO MASTERRA:**

**Industria Ingeniaritza Unibertsitate Masterra**

# **MASTER AMAIERAKO LANA**

***FABRIKAZIO GEHIGARRIA ERABILIZ  
BIOBATERAGARRIAK DIREN MIKROTXANTILOI  
POLIMERIKOEN FABRIKAZIOA ZELULEN KOKAPEN  
SELEKTIBOA LORTZEKO***

**Ikaslea**

*Aldalur, Urresti, Eider*

**Zuzendaria**

*Muñoz, Ugartemendia, Jone*

**Saila**

*Meatze eta Metalurgia Ingeniaritza eta Materialen  
Zientzia*

**Ikasturtea**

*2017-2018*



# Aurkibidea

<b>I. LABURPENA</b> .....	<b>4</b>
<b>II. IRUDIEN, TAULEN ETA AKRONIMOEN ZERRENDAK</b> .....	<b>5</b>
<b>IRUDIAK</b> .....	<b>5</b>
<b>TAULAK</b> .....	<b>5</b>
<b>AKRONIMOAK</b> .....	<b>7</b>
<b>1. SARRERA</b> .....	<b>8</b>
<b>2. TESTUINGURUA</b> .....	<b>9</b>
<b>3. HELBURUA ETA IRISMENA</b> .....	<b>10</b>
<b>4. PROIEKTUAREN ONURAK</b> .....	<b>12</b>
<b>5. ARTEAREN EGOERA</b> .....	<b>13</b>
5.1. MIKROTXANTILOIEN ERRONKA: EHUN-INGENIARITZA ETA BIRSORTZE-MEDIKUNTZA.....	13
5.1.1. <i>Etokizuneko garapena</i> .....	18
5.2. MIKROTXANTILOIEN FABRIKAZIOA .....	19
5.2.1. <i>Fabrikazio gehigarria: EBP (Extrusion Based Printing)</i> .....	23
5.3. MIKROTXANTILOIAK FABRIKATZEKO MATERIALAK.....	25
5.3.1. <i>PLLA</i> .....	25
5.3.2. <i>Dopamina</i> .....	25
5.3.3. <i>PVDF</i> .....	26
5.3.4. <i>Silikona</i> .....	26
5.4. ZELULAK.....	26
<b>6. METODOLOGIAREN DESKRIBAPENA</b> .....	<b>27</b>
H.P.1: GAIAREN EGOERAREN AZTERKETA BIBLIOGRAFIKOA .....	27
H.P.2: MATERIALEN AUKERAKETA ETA HAUEN EZAUGARRITZEA.....	27
H.P.2.1. <i>Aukeraketa</i> .....	27
H.P.2.2. <i>Lehortzea</i> .....	28
H.P.2.3. <i>Ezaugarritze termikoa</i> .....	28
H.P.3: MATERIALEN INPRESIO PARAMETRO OPTIMOAK DEFINITZEA .....	29
H.P.3.1. <i>3D inprimagailuaren funtzionamendua ikastea</i> .....	29
H.P.3.2. <i>Substratuak prestatzea</i> .....	29
H.P.3.3. <i>Inpresio moduak definitzea</i> .....	29
H.P.3.4. <i>Inpresio parametroen optimizazioa</i> .....	30
H.P.4: MIKROTXANTILOIEN NEURRIAK ZEHAZTEA.....	30
H.P.4.1. <i>Geometria definitzea</i> .....	30
H.P.4.2. <i>Mikrotxantiloiak neurtzea</i> .....	31
H.P.4.3. <i>Inpresio neurrien optimizazioa</i> .....	31
H.P.5: AZTERKETA ZELULARRA.....	32
H.P.5.1. <i>Laginak prestatzea</i> .....	32
H.P.5.2. <i>Mikrotxantiloietan zelulak ezartzea eta laginak behatzea</i> .....	32
H.P.5.3. <i>Burututako entseguak</i> .....	34
H.P.6: EMAITZEN HELARAZTEA.....	35
<b>7. EMAITZAK ETA EZTABAIDA</b> .....	<b>36</b>



H.P.2: MATERIALEN EZAUGARRITZEA.....	36
H.P.3: MATERIALEN INPRESIO PARAMETRO OPTIMOAK DEFINITZEA .....	37
<i>H.P.3.3. Inpresio moduak definitzea .....</i>	<i>37</i>
<i>H.P.3.4. Inpresio parametroen optimizazioa .....</i>	<i>37</i>
H.P.4: MIKROTXANTILOIEN NEURRIAK ZEHAZTEA.....	38
<i>H.P.4.1. Geometria definitzea .....</i>	<i>38</i>
<i>H.P.4.2. Mikrotxantiloiak neurtzea .....</i>	<i>39</i>
<i>H.P.4.3. Inpresio neurrien optimizazioa.....</i>	<i>39</i>
H.P.5: AZTERKETA ZELULARRA.....	42
<i>H.P.5.3. Burututako entseguak.....</i>	<i>42</i>
<b>8. EGINKIZUNEN DESKRIBAPENA .....</b>	<b>46</b>
8.1. EGINKIZUNAK.....	47
<i>E.1. Azterketa bibliografikoa.....</i>	<i>47</i>
<i>E.2. Garapen praktikoa.....</i>	<i>47</i>
<i>E.3. Emaitzen analisia eta ondorioak .....</i>	<i>50</i>
<i>E.4. Idazketa.....</i>	<i>50</i>
8.2. MUGARRIAK.....	50
8.3. KRONOGRAMA.....	52
<b>9. AURREKONTUA.....</b>	<b>53</b>
9.1. BARNE ORDUAK .....	53
9.2. AMORTIZAZIOAK.....	54
9.3. GASTUAK.....	54
9.4. KOSTU TOTALA.....	56
<b>10. ARRISKUEN ANALISIA.....</b>	<b>56</b>
10.1. ARRISKUEN SAILKAPENA ETA KONTINGENTZIA PLANA.....	57
<i>10.1.1. Arlo esperimentalari eragiten dioten arriskuak .....</i>	<i>57</i>
<i>10.1.2. Pertsonalarentzat kaltegarriak diren arriskuak.....</i>	<i>58</i>
10.2. ARRISKUEN PREBENTZIOA .....	58
<i>10.2.1. Arlo esperimentalari eragiten dioten arriskuak .....</i>	<i>58</i>
<i>10.2.2. Pertsonalarentzat kaltegarriak diren arriskuak.....</i>	<i>58</i>
<b>11. ONDORIOAK ETA ETORKIZUNERAKO IKERKUNTZAK.....</b>	<b>59</b>
<b>12. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>61</b>
<b>ERANSKINAK.....</b>	<b>64</b>
<i>ERANSKINA I: KALKULUAK ETA PLANOAK .....</i>	<i>65</i>



# I. LABURPENA

**Laburpena:** Azken hamarkadetan, birsortze-medikuntzaren barnean ehun-ingeniartzak garapen handia izan du eta arlo honetan, biobateragarriak diren eta zelulen itsaspen selektiboa baimentzen duten gainazalak oso desiragarriak izan daitezke zenbait aplikazio ezberdinetarako. Hala, mikrotxantiloien bidez, azalera oso konkretuetan zelulentzat ingurune egokiak defini daitezke, honen aplikazio izan daitezkeelarik, esaterako, biosentsoreak, ehun-ingeniartzarako in vitro eginiko kultibo zelularrak edo inplanteen gainazal egokiak sortzea. Lan honetan, zehazki, hiru mikrotxantilo geometria ezberdin (artekatutako zutabeak, sareak eta irloteak) sortu dira, hauek zelulen hazkunde kontrolatua eta bideratua baimendu ditzaketelarik, substratu konkretu baten gainean. Mikrotxantilo biobateragarri hauek 3D inprimagailu baten bidez ekoitzi dira, FDM (Fused Deposition Modeling) delako fabrikazio gehigarriko teknologia erabiliz eta honetarako bi bide nagusi jorratu dira: batetik, substratu negatibo baten gainean (bertan zelulak itsasten ez direlarik), polimero positibo bat inprimatu da zelulak bertan ezartzeko eta bestetik, substratu positibo batean gainean, txantilo negatibo bat sortu da, zelulak zati positiboan soilik itsasteko. Honela, zonalde positiboetan zelulen itsasgarritasuna aztertu da eta zelulen morfologian txantiloien itxurak eraginik duen baloratu da.

**Resumen:** En las últimas décadas, la medicina regenerativa ha ido ganando relevancia y en especial la ingeniería de tejidos ha tenido un papel vital en ello. Dentro de este ámbito, las superficies biocompatibles que permiten la adhesión celular selectiva han adquirido gran importancia. Los “micropatterns” son adecuados para el crecimiento celular en áreas muy concretas, dando lugar a microsensores, cultivos celulares in vitro o superficies adecuadas para implantes. En este proyecto, se han fabricado “micropatterns” de tres geometrías distintas (columnas, rejillas e islas) que pueden controlar en un determinado sustrato el crecimiento celular y su direccionamiento. Estos “micropatterns” biocompatibles se han fabricado con una impresora 3D utilizando la tecnología de fabricación aditiva denominada FDM (Fused Deposition Modeling). Además, se han llevado a cabo dos líneas de investigación: por una parte, en un sustrato negativo se ha imprimido un polímero positivo y por otra parte, encima de un sustrato positivo se ha imprimido un “micropattern” negativo. En ambos casos en el área positiva se adherirán las células y en la negativa no. Mediante este proceso se observará la capacidad de adhesión de las células en la parte positiva y la influencia de la geometría de los “micropatterns” en la morfología de ellas.

**Abstract:** In the last years, especially tissue-engineering that is inside of the regenerative medicine, has had a great development. One of the main challenges in tissue-engineering is the development of biomimetic surfaces that promote selective adhesion of cells while promoting specific responses, including cell orientation and differentiation. In this way, micropatterning is a versatile approach to obtain such surfaces to use for example, in microsensors, in cell cultures in vitro or in implants surfaces. In the present work, we have fabricated biocompatible micropatterns with three different geometries (lines, grids and dots) to control the cell adhesion and we have used a technology of additive manufacturing called FDM (Fused Deposition Modeling) to fabricate them. Besides, we followed two lines of research: on the one hand, we printed a positive polymer in a negative substrate and on the other hand, we printed a negative polymer in a positive substrate. In both cases in the positive area the cells will adhere and in the negative no. In this way, we studied the adhesion of cells into the substrates and the influence of the micropatterns geometry in the cell morphology.



## II. IRUDIEN, TAULEN ETA AKRONIMOEN ZERRENDAK

### IRUDIAK

1.Irudia. Mikrotxantiloien orokor baten adierazpen grafikoa, (laranja) substratu negatibo baten gainean (beltza) inprimatutako material positiboa. Zelulak zonalde positiboan itsatsiko dira.....	10
2.Irudia. Elektroizpi bidezko litografia erabiliz sortutako polimetakrilatozko (PMMA) mikrotxantiloien sinusoidal eta zuzenak .....	14
3.Irudia. Ehun-ingeniaritzaren eskema .....	14
4.Irudia. Ehunen birsortzearen prozesua in vitro .....	16
5.Irudia. Zelulen direkzionamendua forma erregulardun mikrotxantiloietan .....	17
6.Irudia. Zelulen direkzionamendurako erabilitako zutabe mikrotxantiloien positiboa .....	18
7.Irudia. Fabrikazio gehigarriaren teknika ezberdinak materialen arabera .....	23
8.Irudia. EBP prozesua.....	24
9.Irudia. PVDF substratu negatibo baten gainean inprimatutako PLLA-Dopa-ren adierazpen grafikoa eta lortutako mikrotxantiloia.....	28
10.Irudia. Zutabe artekatu, sare eta irlote geometriak.....	31
11.Irudia. Zelulen behaketarako prestatutako mikrotxantiloien lagin zirkularrak .....	32
1.Grafikoa. PLLA-ren (a) DSC eta (b) TGA grafikoa.....	36
2. Grafikoa. PLLA-Dopa-ren (a) DSC eta (b) TGA grafikoa .....	36
3.Grafikoa. PVDF-ren (a) DSC eta (b) TGA grafikoa.....	37
12.Irudia. Zutabe artekatu itxurako (0.2 mm-ko tartearekin) eta sare itxurako (0.4 mm-ko tartearekin) silikonazko mikrotxantiloien mikroskopioan ateratako irudia.....	39
13. Irudia: Silikonazko zutabe artekatu mikrotxantiloietan zelulen itxura 6 ordura (a eta b) eta 24 ordura (c eta d) .....	43
14. Irudia: Silikonazko zutabe artekatu mikrotxantiloietan tanta bidez ereindako zelulen itxura 7 ordura (a eta b) eta 24 ordura (c eta d) .....	44
15. Irudia: Silikonazko sare mikrotxantiloietan tanta bidez ereindako zelulen itxura 24 ordura ..	45
16. Irudia: PLLA-Dopa-zko zutabe artekatu mikrotxantiloietan tanta bidez ereindako zelulen itxura 7 ordura (a eta b) eta 24 ordura (c eta d) .....	46
17.Irudia: Gantt diagrama .....	52
18.Irudia. 3D- Biploterraren planoak .....	67
32.Irudia. 3D-Biplotter-aren planoak .....	67
19.Irudia. Kultibo gelaren planoak.....	68

### TAULAK

I.Taula. Teknika ezberdinak material ezberdinean .....	20
II.Taula. Teknika ezberdinak material berdinean .....	22
III. Taula. PLLA-zko mikrotxantiloien inprimatzeko parametro optimoak .....	38
IV. Taula. PLLA-Dopa-zko mikrotxantiloien inprimatzeko parametro optimoak.....	38
V. Taula. Silikonazko mikrotxantiloien inprimatzeko parametro optimoak.....	38
VI. Taula. PLLA-zko zutabe artekatu mikrotxantiloien neurri errealak.....	39
VII. Taula. PLLA-zko sare mikrotxantiloien neurri errealak.....	39
VIII. Taula. Silikonazko zutabe artekatu mikrotxantiloien neurri errealak .....	40
IX, X eta XI. Taulak. Silikonazko sare mikrotxantiloien neurri errealak.....	40
XII. Taula. PVDF gainean inprimatutako PLLA-Dopa-zko zutabe artekatu mikrotxantiloien neurri errealak. ....	41



<b>XIII. Taula. Dopaminaz estalitako PLLA film gainean inprimatutako silikonazko zutabe artekatu mikrotxantilo optimoen neurri errealak.....</b>	<b>41</b>
<b>XIV. Taula. . Dopaminaz estalitako PLLA film gainean inprimatutako silikonazko sare mikrotxantilo optimoen neurri errealak.....</b>	<b>41</b>
<b>XV. Taula. Eginkizun bakoitzerako erabili den ordu kopurua. ....</b>	<b>53</b>
<b>XVI. Taula. Barne orduen koste totala. ....</b>	<b>53</b>
<b>XVII. Taula. Amortizazioen banaketa. ....</b>	<b>54</b>
<b>XVIII. Taula. Material suntsikorraren kostua. ....</b>	<b>54</b>
<b>XIX. Taula. 3D-aren gastuak.....</b>	<b>55</b>
<b>XX. Taula. Gainontzeko gastuak. ....</b>	<b>56</b>
<b>XXI. Taula. Kostu totala.....</b>	<b>56</b>
<b>XXII. Taula. Akats eta Ondorioen Analisi Modala arlo esperimenterako.....</b>	<b>57</b>
<b>XXIII. Taula. Akats eta Ondorioen Analisi Modala pertsonentzako arriskueterako. ....</b>	<b>58</b>



## AKRONIMOAK

FDM: Fused Deposition Modeling

3D: Hiru Dimentsio

EBP: Extrusion Based Printing

MAL: Master Amaierako Lan

EHU/UPV: Euskal Herriko Unibertsitatea/Universidad del País Vasco

BAM: Biologically Active Molecules

PLLA-Dopa: Poli-L-laktida-Dopamina

PVDF: Polifluoruro binilidenoa

PLLA: Poli-L-laktida

H.P.: Helburu partzial

2D: Bi dimentsio

PMMA: Polimetakrilato

ECM: Extracelular Matrix

$\mu$ CP: Microcontact Printing

PDMS: Polidimetilsiloxano

UV: Ultramore

CAD: Computer-Aided Design

STL: Standard Triangle Language

PCL: Polikaprolaktona

DSC: Ekortze diferentzialeko kalorimetria

TGA: Analisi termograbitrikkoa

PBS: Phosphate-Buffered Saline

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: Fetal Bovine Serum

P/S: Penicillin/Streptomycin

BSA: Bobine Serum Albumin

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

AOAM: Akats eta Ondorioen Analisi Modala



# **1. SARRERA**

Gaur egun, medikuntzak baditu zenbait berebiziko erronka. Alde batetik, bizi itxaropenaren luzatzea dela eta, biztanleriaren zahartzea gertatzen ari da, eta bestetik, oraindik badira sendabiderik gabeko zenbait gaixotasun, lesio eta trastorno genetiko. Hala, hauei aurka egin eta sendabidea bilatu ahal izateko birsortze-medikuntza garrantzia handia hartzen ari den esparrua da [1].

Azken urteetan, medikuntzaren arlo espezializatu hau kaltetuta dauden edo funtzionamendu anomaloa duten ehunak erreparatzeko soilik erabili izan da baina hala eta guztiz ere, etorkizun oparoa izango duen zientziaren arloa izango dela aurreikusten da, *in vitro* laborategian gizakietan transplantagarriak izango diren organo osoak lortzeraino. Birsortze-medikuntzaren barnean, besteak beste, ehun-ingeniaritza eta ama zelulen terapia sartzen dira. Ama zelulen terapiak giza gorputzeko zelula ama helduak hartu eta hauek nahi den eratako zeluletan diferentziaztea du helburu. Ehun-ingeniaritzak, berriz, *in vivo* zein *in vitro* ehun funtzionalak sortzean datza [2].

Gainera, azken hamarkadetan biomaterialen erabilerak eta ikerketak asko egin du gora, batez ere, medikuntzaren arloan. Biomaterialak edo biobateragarriak diren materialak jatorri sintetiko zein organikoa duten materialak dira, bizirik dagoen sistema baten atal bat ordezkatzeko edo forma seguruan ehun bizi batekin kontaktuan lan egiteko gai direnak.

Hala, ehun-ingeniaritzan biomaterialak funtsezkoak dira. Esaterako, biobateragarriak diren eta zelulen itsaspen selektiboa baimentzen duten gainazalak oso erabilgarriak dira zenbait aplikazio ezberdinetarako [3]. Gainazal mota hauek lortu ahal izateko mikrotxantiloien (gainazal baten gainean, gainazalaren material berean edo material ezberdinean maila milimetrikoan eginiko formak) erabilerak gora egin du azken aldian, gainazala zelulak itsas daitezkeen eta itsatsi ezin daitezkeen sektoreetan banatzen delarik. Gainera, teknika honen bidez, zelulen hazkuntza direkzionatua eta zelulen dentsifikazioa ere lor daitezke.

Ildo honi jarraiki, mikrotxantilo hauek egiteko dauden teknika guztien artean, azken aldian, fabrikazio gehigarriak edo hiru dimentsioko (3D) inpresioak indarra hartu du. Izan ere, teknologia honen bidez lortzen diren mikrotxantiloien zehaztasuna eta errepikagarritasuna oso handiak dira. Lan honetan, zehazki, fabrikazio gehigarriaren barneko teknologia guztien artetik, estrusio bidezko inprimaketa (Extrusion Based Printing, EBP) aukeratu da, bertan, biopolimeroak gainazal polimerikoetan inprimatuko direlarik zelulen nahi den kokapena eta forma lortzeko helburuarekin.





## 2. TESTUINGURUA

Master Amaierako lan (MAL) hau, Bilboko Ingeniaritza Eskolako (Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU), Meatze eta Metalurgia Ingeniaritza eta Materialen Zientzia sailean egin da Biomaterial Polimerikoen Zientzia eta Ingeniaritzari buruzko ZIBIO ikerketa taldearen barnean.

ZIBIO taldea 2012-tik Basque Research Center for Macromolecular Design and Engineering (POLYMAT) taldearen barruan dago [4] eta proiektu hau egiteko POLYMAT ikerketa taldeko diru-laguntza bat jaso da. Hala, ZIBIO taldea modu iraunkorren Bilboko Ingeniaritza Eskolako (UPV/EHU), Meatze eta Metalurgia Ingeniaritza eta Materialen Zientzia sailean lanaldi osorako titularrak diren irakasle katedratiko batez eta bost irakasle doktozez osatua dago. Gainera, gaur egun, taldean badaude lau ikertzaile postdoktoral eta hiru doktorego aurreko. Amaitzeko, taldea osatzen dute formakuntza bidean dauden zenbait ikasle laguntzailek.

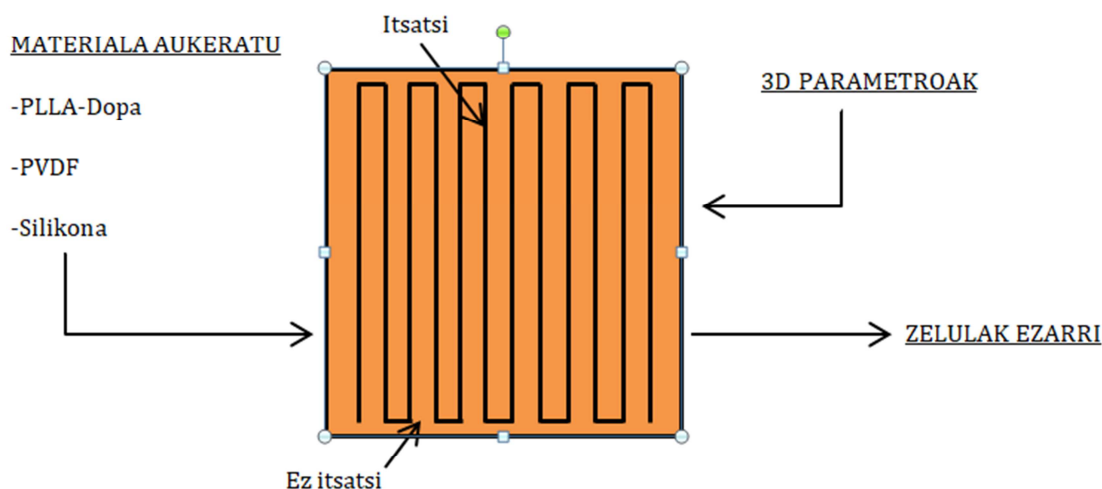
Modu honetan, taldeak sorreratik gaur egun arte, hainbat proiektu ezberdin landu eta garatu ditu enpresa pribatuek, UPV/EHU-k, Eusko Jaurlaritzak edo Espainia eta Europako ministerio ezberdinek emandako finantziazio eta diru laguntzei esker. ZIBIO taldearen plan estrategikoa, orain gutxi, Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza eta Ikerkuntza Saileko ikerketa talde osatuen deialdian onartua izan da, 2016-2021 artean taldearen ikerketa lerro nagusiak honakoak izango direlarik:

- Aktibitate biologikodun material biodegradagarri berrien garapena. Biologikoki aktiboak diren polimero/molekulak (Biologically Active Molecules, BAM).
- Biodegradagarriak diren kopoliester berrien sintesia eta karakterizazioa.
- Erradioopazitate eta bioaktibitate hobetuak dituzten biodegradagarriak diren konposatu polimerikoen ikerketa.
- Injektagarriak diren hidrogelak.
- Nukleo pulposoa duten zeluletan interleucina-1 $\beta$ -k sortutako hantura modelo batean, estres oxidatiboa prebenitzeko mikroerreaktore polimeriko antioxidatzaileen garapena.
- Polimeroen prozesaketa teknika berriak: 3 dimentsioko (3D) inpresioa eta elektro-harilketa. Ehun-ingeniartzarako zelula-euskarrien garapena.

Beraz, honako lan hau, hain zuzen ere, polimeroen prozesaketa teknika berrien ikerketa lerroan kokatzen da, 3D inprimaketaren bidez zelulen direkzionamendua eta kokapen selektiboa baimenduko duten mikrotxantiloak sortuko direlarik. Ondoren azalduko den guztia burutzeko, Jone Muñoz proiektu zuzendariak eta Eider Aldalur ikasleak parte hartu dute bertan. Honez gain, Aitor Larrañaga doktoreak eta Naroa Saldaba ikasle predoktoralak ere euren jakintza alorretan laguntza eman diote proiektuari.

### **3. HELBURUA ETA IRISMENA**

Proiektu honetan zenbait gainazal polimerikotan mikrotxantilo polimerikoak sortu dira, zelulen itsaspen selektiboa baimentzen duten gainazalak izateko. Esandakoa burutu ahal izateko, badira helburu nagusi bat eta hau lortzeko bete beharreko zenbait helburu partzial. Beronen **helburu nagusia geometria ezberdinetako mikrotxantilo polimerikoak inprimatzea da, zelulen itsaspen selektiboa eta direkzionamendu optimoak izateko**. Hala, bi bide nagusi jarraitu dira. Alde batetik, *1. Irudian* ikus daitekeenez, substratu negatibo baten gainean polimero positibo bat inprimatu da geometria definitu batekin. Eta bestetik, era berean, substratu positibo baten gainean polimero negatibo bat inprimatu da. Honetarako, fabrikazio gehigarria erabili da eta zutabe, sare eta puntu geometriak burutzen saiatu gara.



*1. Irudia. Mikrotxantilo orokor baten adierazpen grafikoa, (laranja) substratu negatibo baten gainean (beltza) inprimatutako material positiboa. Zelulak zonalde positiboan itsatsiko dira.*

Bestalde, **helburu partzialen** artean honakoak daude:

- H.P.1 (Helburu partziala 1): Gaiaren egoeraren azterketa bibliografikoa burutzea.
- H.P.2: Inprimagarriak izango diren biomaterial egokien aukeraketa eta hauen ezaugarritzea.



-H.P.3: Hiru dimentsioko (3D) inprimagailuaren funtzionamendua ikastea eta aukeratutako materiala hautatutako gainazalean inprimatzeko parametro optimoak definitzea, hala nola, temperatura, presioa, abiadura, inpresio modua, punta diametroa etab.

-H.P.4: Mikrotxantiloiak burutzeko erabilitako neurri eta geometrien (zutabeak, sareak eta irloteak) artean egokienak aukeratzea.

-H.P.5: Zelulen kultiboa burutu eta hauen itsastea behatzea.

-H.P.6: Emaitzak helaraztea.

Amaitzeko, proiektu honen garapenean beste zenbait kompetentzia ere landu dira: laborategi bateko lanerako dinamika nolakoa den ezagutzea, entsegu ezberdinen jarraipena egitea baimenduko diguten zenbait teknika analitikoren barnerapena, laborategiko beharrezko material eta ekipamenduen erabilera ezagutzea, emaitzen analisi eta interpretatze gaitasuna, ahozko eta idatzizko adierazpenerako gaitasuna eta sintesi eta analisi kritikorako gaitasuna.

Adierazitako helburuak lortu ahal izateko, bi lan-bloke planteatu dira, lehenak ikerketa teorikoa (A) hartuko du barnean eta bigarrenak berriz, alde esperimental (B).

A- Fase teorikoa: zati honetan gaiari buruz, gaur egun arte, idatzi eta argitaratutako artikuluak irakurri dira. Batetik, birsortze-medikuntza eta ehun-ingeniariari buruzko informazioa bildu da, hauetan mikrotxantiloien erabilera zehazki aztertuz. Gainera, mikrotxantiloien aplikazioei eta ekoizpen teknika ezberdinei buruz informazioa ere bildu da. Bestetik, 3D inpresioaren teknologiari buruzko oinarri bat hartu da, sektore medikoan eta biomaterialetan honek duen aplikagarritasuna aztertuz. Azkenik, gure proiekturako biomaterial egokienei eta zelula aproposenei buruzko artikuluak irakurri dira.

B- Fase esperimental: behin bilaketa bibliografikoa burututa, lortutako emaitza eta informazioarekin entseguak egin dira Donostiako kimikako fakultatean (UPV/EHU) dagoen Bioplotter EnvisionTEC 3D inprimagailuan. Hasteko, fase honen lehen zatian makina honen erabilera ikasi da. Ondoren, gure bilaketa bibliografikoan aurkitutako material egokietan oinarrituz, hauen inprimaketa burutu da, hautatutako gainazal egokiaren gainean, inprimaketa parametro eta geometriak definituz. Gero, Bilboko Ingeniaritza Eskolako (UPV/EHU), Meatze eta Metalurgia Ingeniaritza eta Materialen Zientzia sailean dagoen zelulen gelan zelulen kultiboak burutu dira lortutako emaitzak gorde direlarik eta azkenik, emaitza horien interpretazio eta analisisa burutu dira.

Beraz, lan honen ideia nagusia fabrikazio gehigarria erabiliz material polimeriko egokietan mikrotxantiloiak lortzea izango da eta ondoren, bertan zelulen kokapen



selektiboa eta direkzionamendua lortu nahi izan da, honetarako azterketa teoriko zein esperimentalak burutu direlarik.

## **4. PROIEKTUAREN ONURAK**

Master Amaierako Lan (MAL) hau aurrera eramán izanák, ingeniáritza arloko zenbait gai jorratu direnez, esparru askotarako zenbait onura ezberdin ekarri ditu. Mikrotxantiloien bidez zelulen kokapen selektiboa eta direkzionamendua lortzeak, onura teknologiko, tekniko eta ekonomiko izugarriak ekar ditzake, zenbait gizarte onurarekin batera.

### ONURA TEKNOLOGIKOAK

- Mikrotxantiloiak zelula-euskarriak burutzeko lehen paúsua direnez, *in vitro* zein *in vivo* ehunak edo organo osoak sortzeko eta gero, hauek gaixoan inplantatzeko funtsezkoak izatera irits daitezke. Hala, lan honetan, mikrotxantiloien ezagutzan, fabrikazio moduetan eta karakterizazioan aurrerapenak lortu dira.
- Erabili diren materialak kontuan hartzekoak dira ehun-ingeniáritzako beste zenbait aplikaziotarako.
- Inplanteen eta protesien gainazalak ehun ostalárian hobeto integratzeko ere erabili daitezke mikrotxantiloiak. Hauekin, zelulen direkzionamendua lortzen denez inplanteen inguruko ehuna errazago sortuko da eta inplanteen bazterketa kopurua txikituko da, inplantea aldatzeko egin beharreko bigarren ebakuntzak ekidinez.
- Biosentsoreetan ere zelulen kokapen zehatza lortzea onura handia da sentso-re optimoak lortzerako garaian eta hauekin emaitzarik onenak izaterako orduan.

### ONURA TEKNIKOAK

- Fabrikazio gehigarriko estrusioan oinarritutako inprimaketa (EBP) teknika erabili denez, frogatu diren materialetatik zein diren inprimagarriak eta zein ez determinatu da.
- Inprimagarriak diren materialen parametro egokienak definitu dira.
- Zelulen kultibo eta direkzionamendurako geometria eta neurri proposenak zein diren ere zehaztu dira.

### GIZARTE ONURAK

- Medikuntzako zenbait esparrutan mikrotxantiloien erabileraren ondorioz, gizartearen osasunean eta bizi kalitatean onurak eragin daitezke.
- Zahartzeak eragindako osasun arazoak eta sendabiderik ez duten gaixotasunak konpontzearen ondorioz bizi itzaropena handituko da.

### ONURA EKONOMIKOAK

- Aplikazio klinikoetan honako mikrotxantiloak hauek erabiliko balira honek ekarritako etekin ekonomikoa legoke. Hala ere, esan beharra dago, mikrotxantiloiak sortzeko aipatutako prozesua ez dagoela eskala industrialean ez



ezarria, ez zabaldua ere eta gaur egun, oraindik ez dela prozedura klinikoan erabiltzen. Hau dela eta, honen garapen eta ikerketa egoki eta arrakastatsu batek prozesu osoaren egingarritasuna ekar dezake. Beraz, onura ekonomikoei begiratzen badiegu hau ikerketa proiektu bat izan denez, azaldutako teknologia komertzializatzeko kasuan, lortuko liratekeenak soilik izan ditzakegu kontuan.

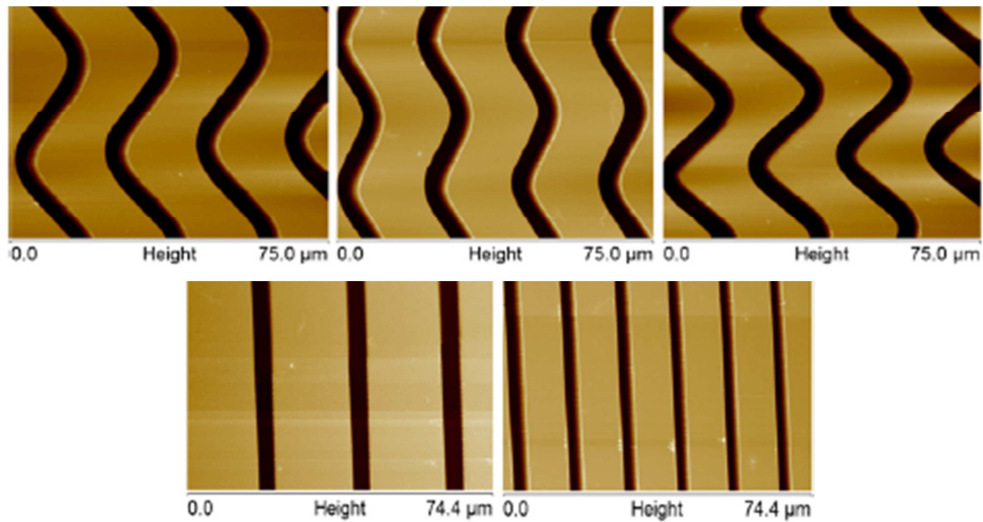
## ONURA AKADEMIKOAK

- Plano pertsonalean, MAL honen bitartez, zenbait gaitasun akademiko lortu dira, hala nola, ikerketa talde baten barruan lana egiteko gaitasuna eta laborategi bateko lanaren dinamika ezagutzea.
- Proiektua aurrera eramaterako garaian, esperimentazioan sortzen diren zenbait arazori aurre egiteko gaitasuna ere lortu da eta honez gain, emaitzen analisi kritikoa egiten eta informe honen formulazioa burutzen ikasi da.
- Azkenik, lan honi eta bertan lortutako emaitza eta analisi ezberdinei buruzko ahozko adierazpen bat burutuko da, ahozkotatasuna eta jende aurrean hitz egiteko abileziak landu direlarik.

## **5. ARTEAREN EGOERA**

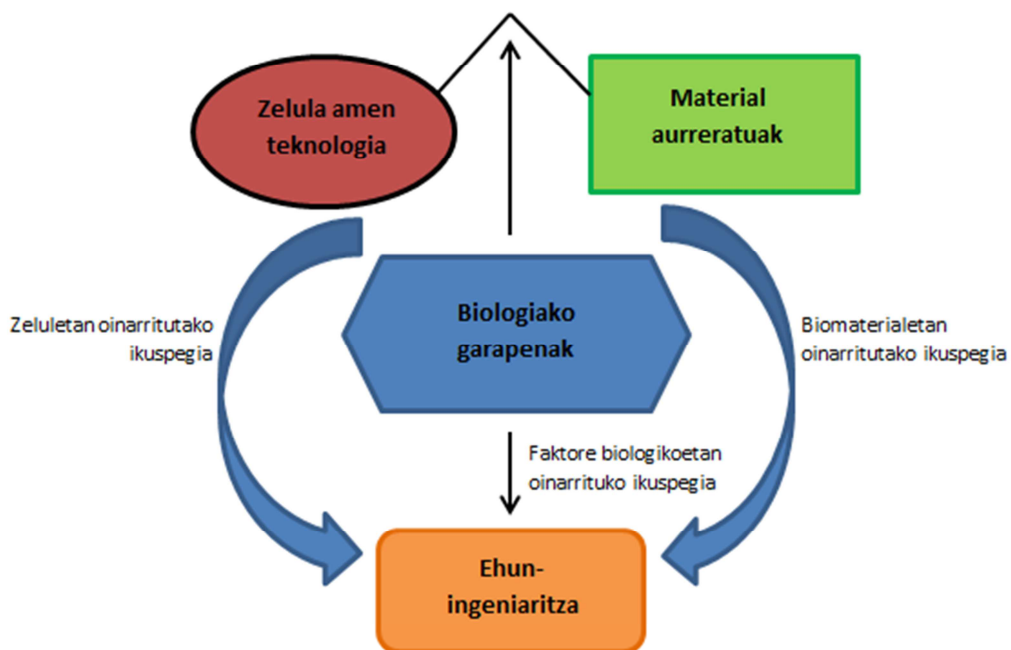
### **5.1. Mikrotxantiloien erronka: Ehun-ingeniari-tza eta birsortze-medikuntza**

Mikrotxantiloiak gainazaletan (2 dimentsiotan; 2D) burutzen diren maila mikrometrikoko formak dira, albo neurri gisa nanometro eta milimetro arteko dimentsioak dituztelarik. Hauek, gainazal mota ugaritan eta material mota anitzetan burutu daitezke eta besteak beste, zelulen kokapen selektiboa eta direkzionamendua lortzeko erabiltzen dira [3]. Hala, 2. *Irudikoak* bezalako mikrotxantiloiak ehun funtzionalak lortzeko lehenengo pausua direnez, euren erabilera nagusia erabilera biologikoa da, zelulekin erlazionatua eta biomedikuntzan funtsezkoa. Hau dela eta, mikrotxantiloien funtsa ondo ulertzeko lehenik eta behin, ehun-ingeniari-tza eta birsortze-medikuntza definituko dira.



**2.Irudia.** Elektroi izpi bidezko litografia erabiliz sortutako polimetakrilatozko (PMMA) mikrotxantiloiei sinusoidal eta zuzenak [5].

Ehun-ingeniaritza azken urteetan garapen handia izan duen birsortze-medikuntzaren adar multidisziplinarra da. Ehun-ingeniaritzan zelula-euskarriak, zelulak eta biologikoki aktiboak diren molekulak konbinatzen dira ehun funtzionalak lortzeko. Hala, ingeniartza mota honen helburua egitura funtzionalak mihizatzea da, ehun kaltetuak edo organo osoak birsortzeko, mantentzeko edo hobetzeko [6]. Gainera, ehun-ingeniaritzak, *3.Irudian* ikus daitekeen bezala, barnean hartzen ditu, besteak beste, zelula amen teknologia, faktore biologikoak eta zelulen hazkuntza eta eraldaketarako materialen ezagutza, azken honetan mikrotxantiloiek lagundu dezaketelarik [7].



**3.Irudia.** Ehun-ingeniaritzaren eskema [7].



Era berean, mikrotxantiloiek badute garrantzia birsortze-medikuntzan ere. Zelulen eta ehunen zahartzea dela eta oraindik gizakia ez da gai denboraren igaroari aurre egiteko. Hala, sendabiderik gabeko gaixotasunak sendatzea, zahartzeagatik edo lesio batengatik kaltetutako ehunen birsortzea burutzea, transplantatzeko prest dauden organoak *in vivo* zein *in vitro* sortzea eta hainbat trastorno genetikorentzat konponbidea bilatzea birsortze-medikuntzaren helburuetako batzuk dira [2]. Hau dela eta, esparru honek etorkizuneko medikuntzan garrantzi handia izango duela aurreikusten da eta horren erakusle da, gaur egun, arlo honetan aurrera eramaten ari diren ikerketa kopuru handia.

Gainera, birsortze medikuntzak arrakasta izan dezan erabilitako materialek eta egiturek matrize extrazelularra (Extracellular Matrix (ECM)) imitatzea funtsezkoa da. ECM zelulen multzoek sortzen duten egitura euskarria da eta honen bidez, zelulek eremu ezberdinetako seinaleak jasotzen dituzte eta ondoren, seinale bakoitzak erantzun kate bat sortzen du [8]. Hala, zelula indibidualek seinaleei nola erantzuten dieten ulertzean, euren inguruarekin nola elkar eragiten duten ikustean eta ehunetan nola antolatzen diren jakitean prozesu hauek manipulatzeko aukera sortzen da.

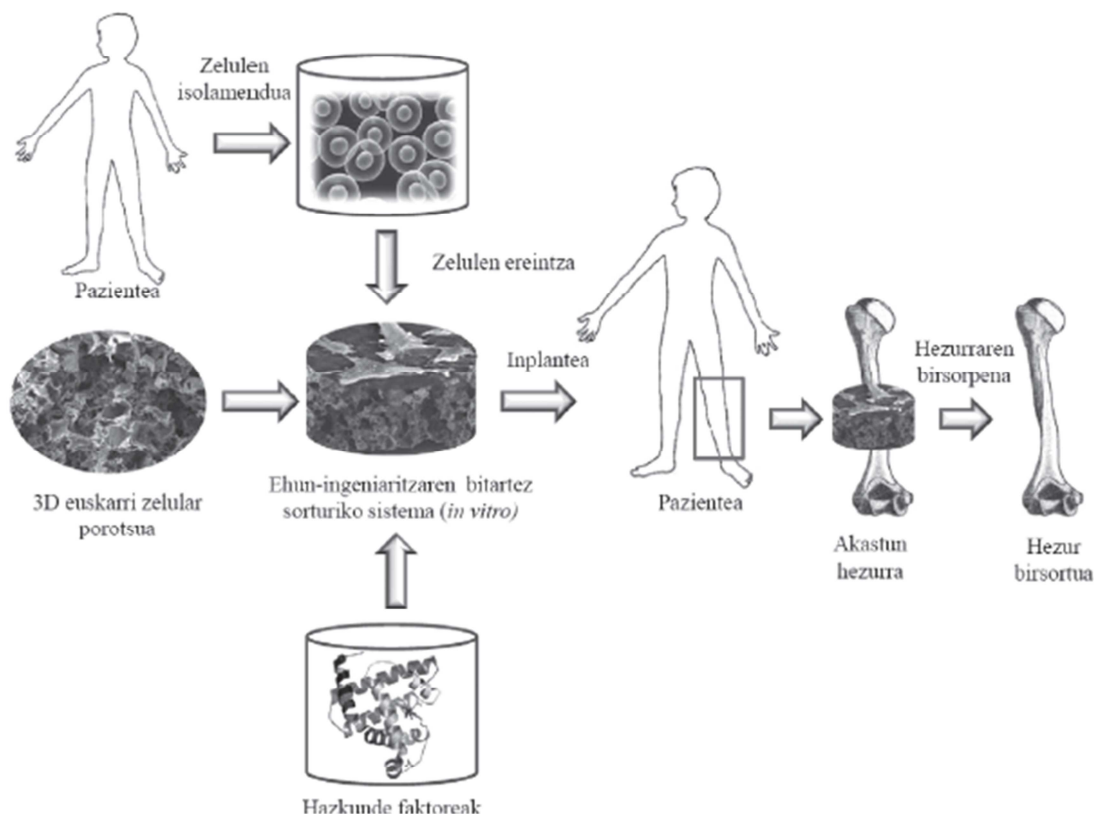
Modu honetan, aipatutako birsortze-medikuntzaren helburu guztiak aurrera eramateko mikrotxantiloiek erabilgarriak izan daitezke, eurretan zelula bizidunak selektiboki gainazaleko azalera konkretuetan itsasten baitira [3]. Alde batetik, zelulen biologiko oinarritzko ikerketetarako oso erabiliak dira zelulen mikrotxantiloiek. Hauen bidez, zelulen kokapen espaziala eta tamaina kontrola daitezke eta ikusi da zelulen formak eta euren kokapenak, banaketan, proliferazioan eta diferentziazioan nabarmen eragiten dutela. Hala, tamaina eta forma ezberdinetako txantiloiek zelula-zelula eta zelula-substratu interakzioak kontrola ditzakete, hauek zelulekin erlazionatutako prozesuetan eta zeluletan eurretan duten eragina nabarmena delarik [9]. Beraz, esaterako, mikrotxantiloiek lagungarriak dira terapia zelularra aurrera eramateko; bertan, prozedura ezberdinen bidez jatorri ezberdineko ama zelulak nahi den zelula motan ezberdintzen edo diferentziazitzen direlarik [10].

Bestetik, gaur egun, mikrotxantiloiek ehun-ingeniaritzan erabilera handia dute, zelulen antolamendu espaziala berebizikoa baita honelako aplikazioetarako. Ehunen birsortzea lortzeko, orokorrean, zelula-euskarriak, azken finean, albo dimentsioan milimetro batzuetako neurria duten mikrotxantiloiek, eraikitze hasten da, honetarako proteinetatik hasi eta polimero jakin batzuetara arteko biobateragarriak diren biomaterial gama zabala erabil daitekeelarik. Orain gainera, biomaterial hauek bioaktiboak ere izan daitezke eta maila zelular eta molekularrean estimuluak sortzen dituzte [8]. Hala, zelula-euskarri horiek zelulei babesa, euskarria eta ehun berriak gainean sortzeko moduko ingurunea ematen dizkiete.

Bide honetatik, ehunen birsortzea burutzeko, *4.Irudian* ikusten den prozesua jarraitzen da. Zelula-euskarrian zelula biziak ezartzen dira, hazkunde faktoreekin edo gabe, eta ingurunea egokia bada bertan ehun bat sortuko da [7]. Zelula-euskarrian zelulen kargatzea eta lehen ehun geruzen sortzea, organo biziaren baldintzak imitatzen dituen



biorreaktore batean egiten da, tenperatura eta baita gasen, elikagaien eta hondakinen trukea kontrolatuz. Behin ehuna sortuta, hau organo kaltetuan ezartzen da bere birsortzea bultzatuz. Gainera, oraindik epe luzeagora, laborategian, giltzurruna, gibela, pankrea edo bihotza bezalako organo osoen birsortzea planteatzen da, organo-emaielen beharra erabat murriztuz.

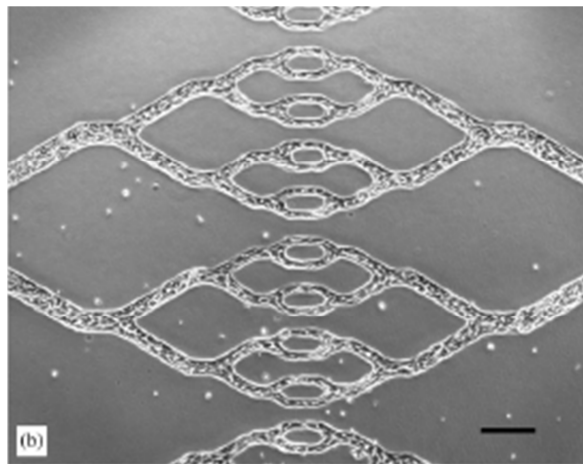


#### 4.Irudia. Ehunen birsortzearen prozesua in vitro [11].

Dena den, zelula euskarriekin, hau da, 3 dimentsiotan lan egiteak, baditu zenbait zailtasun. Izan ere, zelulen kokapenaren kontrola ez da hain handia, emaitzen behaketa asko zailtzen da eta gainera, prozedura eta azterketa guztietarako denbora gehiago beharko da. Hau dela eta, funtsezkoa da lehenik eta behin, 2 dimentsiotan (mikrotxantiloietan) zelulen portaera, geometria egokienak eta emaitzarik onenak definitzea, ondoren hiru dimentsiotara pasatzeko.

Beraz, gainazalen topografiak, zimurtasuna, poroak eta orientazioa barnean hartuta, baliagarriak dira zelulen portaera (itsaspena, orientazioa, mugikortasuna, hazkuntza, diferentziazioa...) kontrolatzeko [9,12]. Topografia hauek lortzeko, mikrotxantiloiak sortzeko teknikak erabiltzen dira, biomaterialen gainean nahi diren moduko, 5.Irudikoa bezalako, egitura erregularrak sortuz. Hala, esaterako, zenbait ikerketaren ondoren, ondorioztatu da gainazaleko arrastoen zabalerak garrantzi handia duela zelulen orientazioan eta aldiz, sakonerak ez duela ia eraginik [13]. Adibidez, nerbioen birsorkuntzarako oso faktore garrantzitsua da mikrotxantiloien tamaina [14].



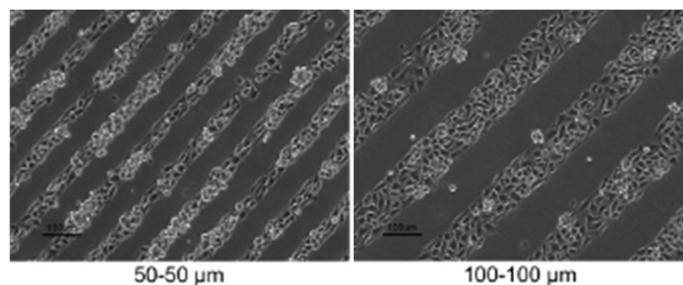


**5.Irudia.** Zelulen direkzionamendua forma erregularan mikrotxantiloietan [15].

Gainera, teknika tradizionalekin ez zen posible substratu berdinean zelula mota ezberdinak ezartzea kontrol maila altuarekin. Mikrotxantiloiek bestalde, bi edo mota gehiagotako zelulen arteko zelula-zelula interakzioak aztertzeo aukera ematen dute [9].

Modu honetan, zelula eta substratuen arteko interakzioak zelula eta materialaren interfasean gertatzen diren maila molekularreko itsasketarekin erlazionatuta daude. Maila nanometrikoan zelulen eta gainazalaren arteko interakzioetan eragina duten faktoreak bitan bana daitezke. Batetik, alderdi fisikoa dago, substratuaren zurruntasuna eta topografiarekin erlazionatutako faktoreak sartzen direlarik bertan eta bestetik, alderdi kimikoa, molekula aktiboen mugikortasun murrizketarekin erlazionatua. Horien artean dira, esaterako, hidrofobizitate edo hidrofilitatea, gainazalaren karga edo zimurtasuna. Hala, propietate edo faktore hauek manipula daitezke, zelulen distribuzio espaziala substratuaren gainean kontrolatzeko. Esaterako, ikerketa batean fibroblastoak *in vitro* kultibatu dira, ongi kontrolatutako gainazal topografia duen eta urarekiko afinitate gradientek dituen polikarbonatozko mintz porotsu baten gainean, ikusi delarik gainazalaren zati hidrofiloan zelulak itsasten direla eta ugaltze handiagoa dutela zati hidrofoboan baino, poroen neurria edozein izanik ere [16].

Azken aldian mikrofabrikazio teknikek eta gainazal-ingeniaritzak izandako garapenaren ondorioz, eskala mikrometrikoan zelulen itsaspena eta hedapena kontrolatuko dituzten teknika berriak garatu dira. Zelulak itsaskorrak diren eta ez diren gainazal zatiak definitzeko teknika gehienek, gainazal tentsioa eta urarekiko afinitatea kontrolatzen dituzte. Hala, behin 6. Irudikoa bezalako, mikrotxantiloak sortuta zelulak bi dimentsioko substratu baten zonalde batzuetatik mugitu ezinda geratzen dira, zelula gehienak *in vivo* duten egoera, ezaugarri geometriko konplexuak dituen nanoegituratutako inguru batean egotea, imitatzen saiatzen direlarik [17]. Bestalde, zenbait ikerketatan maila nanometriko eta mikrometrikoetan geometrikoki ezberdinak diren gainazaleko formak (isloteak, zutabeak, punta zorrotzak, poroak, sareak...) erabili izan dira, zelulen itsastea zeinetan den egokiena ikusteko [18].



**6.Irudia.** Zelulen direkzionamendurako erabilitako artekatutako zutabe mikrotxantilo positiboak [19].

### 5.1.1. Etorkizuneko garapena

Ehun-ingeniartzan azken 25 urteetan gertatu den garapena izugarria izanagatik, gaur egun oraindik, klinikoki pertsoneri laguntzen dieten ehun-ingeniartzako produktuen kantitatea ez da oso handia eta gainera, prozedurak oraindik esperimentalak eta oso garestiak dira [20]. Etorkizunerako, mikrotxantiloien ikerketaren bidez, zelula-euskarri egokiak lortzea posible izango da eta hauek bihotza, birrikak eta gibela bezalako organo konplexuen ehunak laborategian lortzea ahalbidetuko dute [8].

Erronka kliniko handi honi ekiteko beharrezkoa da biologiko, materialen zientziako, fisikako, kimikako eta ingeniartzako teknologia berritzaileenei erabilera transdiziplinar bat ematea gorputzak jada berez duen hazkuntza eta garapen gidaturako gaitasunarekin batera. Hala, ehun-ingeniartzaren garapena dela eta, beronek konektatzen eta erlazionatzen dituen alorretan ere garapena handia izan da, esaterako, orain birsortze ahalmen izugarria duten ama zelula heldu eta enbrioi ama zelulen ezagutza sakonagoa da eta euren lorpena ere errazagoa da [8].

Modu bertsuan, biomaterialen zientziak ere asko egin du aurrera polimero eta zeramiko biodegradagarrietatik hasi eta neurria eginiko, ongi kontrolatutako propietate fisiko, mekaniko eta biologikoak dituzten gorputzaren berezko birsortze prozesu naturalari laguntzen dioten biomaterial biomimetiko inductiboetaraino [23]. Gainera, mikro eta nanoteknologiaren agerpenak ehun-ingeniartzaren inguruko ikerketa asko bultzatu du, hiru dimentsiotako zelula-euskarri biomimetikoak egiteko metodologia berriak sortuz [8].

Beraz, ehun-ingeniartzaren garapena era bat lotuta dago biomaterialen diseinuarekin, zelulen ezartze eta ugaltze metodoekin, zelula eta biomaterialen interakzioekin eta seinalizazio molekularren garapenarekin [22]. Azken batean, arlo hauetako guztietako ikerketei esker, ingurune biologikoko sentzibilitate zelularra hobeki ulertzea eta biomaterial aurreratuak eta zelula-euskarri biomimetikoak erabilia funtzio zelularrak modulatzeko lortu da [8].



Hala, erronka hauei guztiei aurre egiteko mikrotxantiloiek garrantzia handia dute, izan ere, euren bidez, ehun funtzionalak lortzeko lehen pausua eman daiteke, oinarrizko ezagutzak lortuz.

## 5.2. Mikrotxantiloien fabrikazioa

Lan honetan, material polimerikoen gainean zelulen mikrotxantiloiak sortzean zentratuko gara. Gaur egun, txantilo mota hau burutzeko teknika mota ezberdinak existitzen dira, bakoitzak dituen abantaila eta desabantailekin. Teknika asko eta asko dauden arren, guztiek badute ezaugarri komun bat: zelulen itsaspena baimentzen duten eta baimentzen ez duten gainazaleko azaleraren desberdintzea egiten dute txantiloien bidez [10].

Mikrotxantiloiak egiteko teknikak 1970etik garatu dira eta egun, bi taldetan bana daitezke. Batetik, itsaste eremuak definitzeko gainazalen kimika erabiltzen dutenak daude eta bestetik, muga fisikoen bidez zelulen itsaste areak mugatzen dituztenak ditugu. Teknika ezberdin asko egon arren, gehienek bi dimentsiotako gainazaletan sortzen dituzte honelako areak, jakina delarik zelulen funtzioetan drastikoki eragiten dutela gainazalaren propietate fisiko eta topografikoek [9]. Bestalde, teknika mota aukeratzeko garrantzitsua da mikrotxantiloiak substratuaren material berean edo material ezberdinetan egingo diren jakitea. Hala, *I. eta II. Tauletan* laburbilduta agertzen dira berrikuspen bibliografikoan aurkitu diren mikrotxantiloiak sortzeko teknika ezberdinak eta honako proiektuan, guztien artetik fabrikazio gehigarria erabiltzea erabaki da.



• **Material ezberdinean**

*I.Taula. Teknika ezberdinak material ezberdinean*

Teknika		Abantailak	Desabantailak	Deskribapena
Litografia biguna [24,25]	Mikrokontaktuzko inpresioa (microcontact printing ( $\mu$ CP)) [19,24,25,26,27]	-Merkea. -Sinplea. -Moldagarria. -Material mota ugaritan erabil daiteke.	-Txantiloien egonkortasun eza. -Fidagarritasun eza. -Geometria konplexuak egiteko zailtasuna. -Substratuak material zurruna izan behar du.	Polidimetilsiloxanozkoa (PDMS) den estanparen gainean biomolekulak, proteinak edo polimeroak (zelulen itsasgarritasuna hobetzen dutenak) edo zelulak eurak dituzten suspentsioak ezartzen dira. Ondoren, substratuaren gainera kasuan kasuko substantzia estanparen formarekin transferitzen da mikrotxantiloiak sortuz.
	Mikrofluxu bidez [24,26]	-Material delikatuen txantiloiak sortzeko.	-Ezin da erabili interkonektatutako kanalak dituzten txantiloietan.	Txantiloien forma daraman PDMS-zko estampa substratuaren gainean ezartzen da, mikrokanalak sortzen direlarik. Ondoren, fluidoak kanal hauetan injektatzen da eta fluxua pasatuz, nahi den materialezko txantiloiak sortzen dira gainazalean.
Fotolitografia [25,15]		-Material gama handian erabilgarria.	-Ekipamendua garestia. -Maskara fotoerresistenteak ekoizteak denbora eta kostua.	Teknika honetan prozedura mota ugari daude baina guztiek dute ezaugarri komun bat: denetan erabiltzen dira fotoerresistentea den maskara bat eta ultramore (UV) izpiak.
Aerosolak [28]		-3D-ko gainazaletan.	-Ausazko kokapenak.	Aerosolak erabilia txantiloiek ausazko kokapenak hartzen dituzte baina lortzen diren zirkuluen batzuetan besteko diametroa kontrola daiteke.



Kimikoki [29]	-Sinplea. -Merkea.	-Zehaztasun eza.	Gainazaleko nahi den zatietan soilik ezartzen da prestatua izan den disoluzioa.
Fotopolimerizazioa [30,31]	-Zehatza.	-Polimero fotogurutzagarriekin soilik erabil daiteke.	Substratuaren gainean interesatzen den polimero fotogurutzagarria ezarri eta ondoren, nahi den forma geometrikoak dituen maskara fotoerresistentea gainean jarriko zaio. UV izpiekin argizatuko da eta hala, maskararen zati fotoerresistenteetan ez da polimeroaren gurutzaketa gertatuko eta aldiz beste zatietan bai, txantiloak sortuz.
Fabrikazio gehigarria	-Zehaztasun handia. -Geometria konplexuak.	-Ekipamendu garestia.	3D inprimagailuaren bidez, substratu polimeriko baten gainean beste polimero bat inprimatzen da.

• **Material berdinean**

*II.Taula. Teknika ezberdinak material berdinean*

Teknika	Abantailak	Desabantailak	Deskribapena
Elektroi edo ioi izpi bidezko litografia [5,32]	-Zutabe edo puntu egiturak zuzenean egiteko egokia.	-Ekipamendu garestia.	Substratu bat hartu eta hau material geruza batez estaliko da, esaterako, PMMA, ondoren, elektroi edo ioi izpi batez nahi den forma marraztuko da substratuaren gainazalean eta hala, mikrotxantiloiak lortuko dira.
Laser bidezko ablazio selektiboa [33]	-Erraza. -Gainazal polimerikoetan, metalikoetan zein zeramikoetan erabili daiteke. -Geometria konplexuak. -Kontaktu bidezko kutsadurarik ez. -Sakonera/zabalera aspektu ratio handia posible da.	-Aldi berean zulo edo zutabe bakarra marraztu daiteke. -Prozesu motela.	Laser baten bidez gainazalaren gainean txantiloien formak marrazten dira, berauek sortuz.
Faseetan banaketa bidezko mikromoldeaketa [34]	-Material gama zabalarekin erabili daiteke, beti ere, existitzen bada material horren disolbatzaile batekin nahasgarria den, disolbatzailea ez den substantzia bat.	-Moldea sortu beharra.	Gehienetan silikonazkoa den molde bat hartu eta gainean, soluzio polimerikoa ezartzen da. Jarraian, fase banaketa burutzen da, moldea disolbatzailea ez den likido batean sartuz eta azkenik, moldetik askatzen da mikrotxantiloia daraman filma.

### 5.2.1. Fabrikazio gehigarria: EBP (Extrusion Based Printing)

Fabrikazio gehigarria hiru dimentsiotako objektuak egiteko, material geruza milimetrikoak bata bestearen gainean sortzen dituzten tekniken multzoari deritze. Funtsean eta laburbilduz, teknika mota honetan piezaren edo egituraren hiru dimentsiotako modelo digital batetik (Computer-Aided Design(CAD)) abiatzen da. Modelo digital hau programa baten bidez geruzatan zatitzen da, Standard Triangle Language (STL) fitxategi bat sortuz eta ondoren geruzaz geruza pieza osoa inprimatzen da, geruza bakoitzeko materialaren konsolidazioa teknologia mota bakoitzean modu ezberdinean egiten delarik [35].

Gainera, fabrikazio gehigarria material mota ugarian erabil daiteke, metaletan, zeramiketean, polimeroetan, material konposatuetan... Eta material mota bakoitzerako teknika ezberdinak erabiltzen dira *7.Irudian* ikus daitekeen bezala. Polimeroen kasuan, erabilienetako bat proiektu honetarako erabili den FDM (Fused Deposition Modeling)-ren barneko EBP (Extrusion Based Printing) teknika dugu.



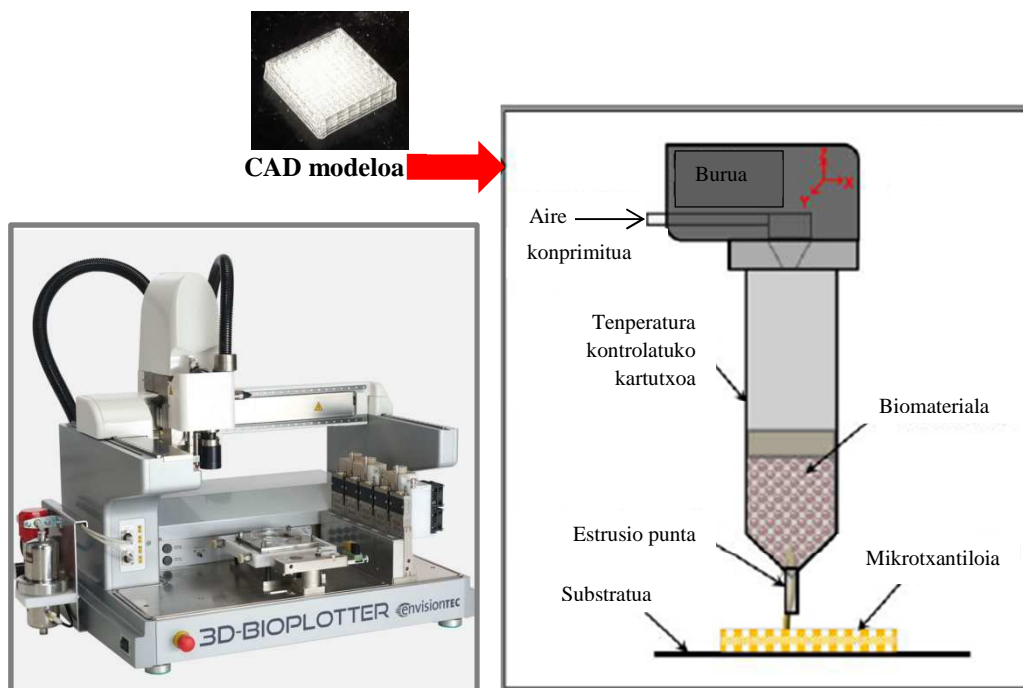
*7.Irudia. Fabrikazio gehigarriaren teknika ezberdinak materialen arabera.*

Industria medikoan eta batez ere, ehun-ingeniaritzan fabrikazio gehigarria oso erabilgarria da. Arlo honetan, 3D inpresioa teknologia berritzailea da batik bat, ehun eta organoak erreparatu eta ordezkatzeko dituzten euskarri-zelularren (*scaffold*-en) ekoizpenerako, inplante pertsonalizatuak sortzeko [36] eta baita zenbait inplante edo antzekoren gainazalaren zelulen direkzionamendua baimentzen duten mikrotxantiloak sortzeko ere.

Hala, mikrotxantiloak sortzeko ere oso erabilgarria da fabrikazio gehigarria. Izan ere, geruza bat, bi edo hiru inprimatuta mikrometro gutxi batzuetako albo neurria duten geometria konplexuak lor daitezke gainazalen gainean eta ekoizpen parametroak kontrolatu behar dira nahi den egitura zehatza duten mikrotxantiloak sortzeko. Gainera, teknologia honen bidez, metalezko, zeramikazko, zein polimerozko mikrotxantiloak lor daitezke eta baita multimaterialez osatuak ere [35].

Bestalde, kontuan izan behar da, inpresio parametroek eta materialaren preprosezaketak garrantzia dutela bukaeran lortuko den inprimatutako materialaren kalitatean eta propietate mekaniko eta geometrikoetan. Zenbait ikerketatan ikusi da inprimaketa burutu baino lehen materiala lehortzen bada, aurretik lehortu gabekoarekin baino emaitza hobekak lortzen direla, modu honetara, material egonkorragoa lortzen baita eta propietateak denbora luzeagoan mantentzen baititu. Gainera, materiala kartutxoaren barnean berotzen mantentzen den denborak ere garrantzia du, inpaktu handia baitauka materialaren portaeran. Bestetik, jakina da materiala denbora limite batetik aurrera berotzen jarraitzen bada materiala degradatu egiten dela eta jada ez dela erabilgarria [37].

EBP teknikan, materiala *8.Irudian* ikusten den, makinaren buruan dagoen kartutxoaren barnean nahi den formatuan (hautsa, *pellet*-ak, etab) sartu eta kartutxoko sare kalefaktoreari esker urtu egiten da. Ondoren, gas presioa aplikatuta urtutako polimeroa estrusio bidez puntatik ateratzen da plataformaren gainean depositatuz. Makinaren burua zehaztasun handiz ordenagailu bidez kontrolatuta, X, Y eta Z ardatzen gainean mugitu daiteke eta nahi den puntuan materiala nahi den kantitatean deposita dezake [38]. Behin lehenengo geruza inprimatuta, buruak geruza baten lodiera gora egin eta bigarren geruza inprima dezake lehenengoaren gainean, lehenengo geruzako materialarekin bat eginez.



**8.Irudia.** EBP prozesua [39].

Beraz, teknologia hau oso erabilgarria da, polikaprolaktona (PCL) eta poli (L-laktida) (PLLA) bezalako, biopolimeroz eginiko errepikagarritasun handiko mikrotxantiloiak, inplanteak zein zelula-euskarriak sortzeko. X eta Y ardatzetan teknika honen bidez lortzen den zehaztasun izugarria dela eta, txantiloia edo





euskarrien poro tamaina oso ongi kontrola daiteke, aldiz, Z ardatzean poroen altuera mugatua dago inprimatzen den hariaren diametroaren, hau da, punta tamainaren, arabera [40]. Bestalde, EBP-n erabili daitezken materialak mugatuta dauden euren fusio puntuaren eta prozesatzeko behar diren parametroen arabera.

### 5.3. Mikrotxantiloiak fabrikatzeko materialak

Anitzak dira mikrotxantiloiak sortzeko materialak baina gure kasuan, fabrikazio gehigarriko Extrusion Based Printing (EBP) teknika erabili denez polimeroekin egin da lan. Gainera, sortutako mikrotxantiloiek biobateragarriak izan behar dute, zelulen kontaktuan lan egiteko eta itsastea eta migrazioa bezalako zelulen funtzioei laguntzeko [36] eta beraz, erabili diren material guztiak biobateragarriak izango dira. Hala, zelulen itsaspen selektiboa lortzeko funtsezkoa da bi material mota erabiltzea. Batetik, material positiboak (Poli-L-laktida (PLLA) eta Poli-L-laktida-Dopamina (PLLA-Dopa)), hau da, zelulen itsaspena baimenduko dutenak erabili dira eta bestetik, negatiboak (binilideno polifluoruroa (PVDF) eta silikona), zelulak itsastea ahalbidetuko ez dutenak.

#### 5.3.1. PLLA

Polilaktida edo azido laktikoa biodegradagarria eta biobateragarria den poliester termoplastikoa da. Artoaren almidoia, mandioka sustraiak edo azukre-kanabera bezalako iturri berriztagarrietatik eratortzen da eta medikuntzaren arloan oso erabilia da.

Gainera, azido laktikoa, duen izatearen ondorioz, zenbait formatan izan dezakegu, horien artean PLLA. PLLA-k 60–65 °C-ko beira trantsizio tenperatura du, 173–178 °C-ko urtze tenperatura eta 2.7-16 MPa-eko trakzio modulu elastikoa. Bestalde, azido polilaktikoa, termoplastiko gehien gisa, zuntzak edo *film*-ak lortuz prozesa daiteke eta 3D inpresioaren bidez inprimagarria da.

#### 5.3.2. Dopamina

Dopamina ( $C_6H_3(OH)_2-CH_2-CH_2-NH_2$ ) animalia ugari ekoizten duten neurotransmisorea da. Gainera, egitura kimikoari dagokionean feniletilamina bat da, gizakien nerbio-sistema zentrolean neurotransmisore lanak burutzen dituen katekolamina bat, hain zuzen ere.

Honez gain, dopamina muskuiluek ere erabiltzen dute edozein gainazalen gainean itsatsi ahal izateko eta azken urteetan ikerketa ugari burutu dira honen harira [41]. Ikusi da, dopaminaren oso antzeko egitura molekularra duen polidopamina oso modu errazean gainazalak eraldatzeko estaldurak sortzeko erabil daitekeela. Izan ere, polidopamina oso erraz deposita daiteke substratu inorganiko zein organikoen gainean eta baita superhidrofobikoak diren gainazaletan ere, nahi den geruza lodierarekin eta egonkortasun iraunkorrarekin. Zenbait ikerketatan



frogatuta geratu da, polidopaminak zelulen itsaskortasuna handitzen duela eta gainera, biobateragarritasun handia ere badu biomedikuntzan oso erabilia delarik [41].

### 5.3.3. PVDF

Binilideno polifluoruroa (PVDF) kimikoki oso inerteia den fluoropolimero termoplastiko bat da. Purutasun handia, temperatura altuetan azido, base eta disolbatzaileei, zahartzeari eta ultramore izpiei erresistentzia eskatzen duten aplikazioetan erabili ohi da. Gainera, polimero honek urtze temperatura (177 °C) erlatiboki baxua du beste fluoropolimeroekin konparatuz eta hau dela eta, bere prozesaketa errazagoa da. Bestalde, zelulekin interakzioei dagokienean, material honek duen urarekiko afinitate baxua dela eta, ez du zelulak itsasteko gaitasunik. Ondorioz, fluoropolimero gehienak bezala zelulak ez itsastea behar den aplikazioetarako erabiltzen da material hau [42].

### 5.3.4. Silikona

Silikona polisiloxanotik eratorritako polimero inorganiko bat da eta silizio eta oxigeno atomo serie batez osatua dago. Koloregabea eta usaingabea da eta temperatura altuetan egonkorra eta inerteia. Hau dela eta, zenbait aplikazio ditu lubrikatzaile, itsasgarri eta molde gisa. Gainera, biobateragarria denez, medikuntzan ere erabilia da protesi balbular eta kardiakoak eta titi inplanteak egiteko.

Bere egitura kimikoaren ondorioz, malgua, eta leuna da eta ez da gastatzen, ez da zahartzen, ez du kutsatzen eta erabilerarekiko erresistentea da. Gainera, eroankortasun termiko eta erreaktibitate kimiko baxua ditu, ez da bateragarria hazkuntza mikrobiologikoarekin eta ez da toxikoa. Bestalde, 3D inpresioaren bidez erraz inprima daiteke [43] eta zelulak bertan ez itsastea espero da.

## 5.4. Zelulak

Proiektu honetan erabilitako HeLa zelulak lehendabizi lortu ziren zelula-lerro hilezkorrak izan ziren, izan ere, beste zenbait zelula-lerro ez bezala, laborategian etengabe kultibatu daitezke. Gainera, zelula-lerro hau kultibo zelularretarako erabiltzen da eta gaur egun, ikerketa arloan gehien erabiltzen dena berau dugu. Jatorria, Henrietta Lacks pazientearen kartzinoma zerbikal-uterinoko zelula epitelialen lagin batean dago eta ikertzaileak konturatu ziren zelula hauek ohikoak baino luzeago bizi zirela. Hala, mota honetako zelula bat isolatu eta lehen zelula-lerro hilezkorra sortu zuten. Hortik aurrera etengabe erabili izan dira ikerketa zientifikoan [44]. Gure proiekturako zelula hauek aukeratu dira erabilerarako errazena eta guk frogatu nahi duguna frogatzeko nahikoa direlako.



## **6. METODOLOGIAREN DESKRIBAPENA**

Lanaren zati honetan, proiektuaren helburu nagusia lortzeko aurrera eramandako metodologia aztertuko da, honetarako zenbait helburu partzial jorratu direlarik. Kasu honetan, **helburu nagusia geometria ezberdinetako mikrotxantilo polimerikoak inprimatzea da, zelulen itsaspen selektiboa eta direkzionamendu optimoak izateko**. Hala, irismenean aipatu den bezala, proiektuak zati teorikoa eta esperimentala izan ditu. Zati teorikoan, orain arte gaiari buruz idatzitako artikuluen bilaketa eta azterketa sakona burutu da (H.P.1; helburu partziala 1) eta zati esperimentalean aldiz, lortutako informaziotik abiatuz laborategiko makinan mikrotxantilo ezberdinak ekoitzi dira, gero, berauetan zelulak ereiteko eta emaitzak ikusteko.

Lehenik eta behin, nahi den helburua lortzeko bibliografian oinarrituz materialen aukeraketa burutu da eta hauek bai fisikoki eta bai termikoki karakterizatu dira (H.P.2). Gero, mikrotxantiloak hiru dimentsioko (3D) inprimagailuaren bidez egingo direla erabaki denez, honen erabilera ikasi da eta materialen inpresio parametro optimoak definitu dira (H.P.3). Ondoren, material bakoitzerako inpresio neurri optimoak definitu dira (H.P.4) eta behin hau eginda, mikrotxantiloak inprimatu eta euren karakterizazio burutu da. Azkenik, eurretan zelulak erein dira (H.P.5).

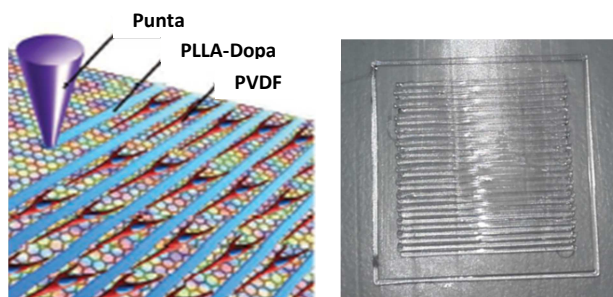
### **H.P.1: Gaiaren egoeraren azterketa bibliografikoa**

Gaiaren egoera aztertu da, honi buruz argitaratu diren artikulua irakurriz eta eurretatik informazio interesgarria bilduz. Artikuluaren bilaketa burutzeko Science Direct eta Scifinder bezalako artikulua bilatzaileak erabili dira eta taldeak aldeztatik aurretik eginiko lanak ere behatu dira.

### **H.P.2: Materialen aukeraketa eta hauen ezaugarritzea**

#### **H.P.2.1. Aukeraketa**

Burutu den bilaketa bibliografikoan oinarrituta materialik egokienak hautatu dira gainazal lau polimerikoetan mikrotxantilo polimerikoak sortzeko. Batetik, zelulak itsatsiko ez diren, binilideno polifluorurozko (PVDF;  $M_w$ : 180000; Sigma-Aldrich) *film* negatibo baten gainean ikerketa taldean sintetizatzen den poli-L-laktida-Dopamina (PLLA-Dopa) [45] polimero positiboa inprimatzea erabaki da, *9.Irudian* ikusten den moduan. Kasu honetan, espero da zelulak soilik PLLA-Dopa gainean itsatsiko direla eta inpresio parametroak eta neurriak optimizatzeko PLLA-Dopa gutxi daukagunez, poli-L-laktida (PLLA;  $M_w$ : 106.6 kg/mol; Corbion(Purac); PURAPOL L-105; 2 mm-ko *pellets* solidoak) soila erabiliko da modelo bezala, parametroak antzekoak izango direla uste baita.



**9.Irudia.** PVDF substratu negatibo baten gainean inprimatutako PLLA-Dopa-ren adierazpen grafikoa [46] eta lortutako mikrotxantiloia.

Bestetik, polidopaminaz estalitako PLLA-zko *film* positiboan, lehengo bidearen kontrakoa egin nahi denez, PVDF negatiboa inprimatzen saiatu gara. Ondoren, dopaminaz estalitako PLLA-zko substratu positibo gainean silikona (Silcoferm S; Silikon Dichtstoff-41 dunkelbraun; PCI) negatiboa inprimatu da.

### H.P.2.2. Lehortzea

Material guztiak erabili baino lehen beti hutseko lehorgailu (VACIOTEM-T; P-Selecta) batean lehortu dira, hutsean eta 25 °C-tara.

### H.P.2.3. Ezaugarritze termikoa

Materialen, inprimatzeko tenperaturak definitzeko euren urtze eta degradazio tenperaturak ( $t_m$  eta  $t_d$  hurrenez hurren) beharrezkoak izan dira eta hau dela eta, materialaren karakterizazio termikoa egin da. PLLA eta PLLA-Dopa-ren urtze tenperaturak ekortze diferentzialeko kalorimetroan (DSC; Q200-DSC; TA Instruments) aztertu dira, bi ekortze eginez: -30 °C-tik 130 °C-ra PLLA-Dopa-n eta 30 °C-tik 220 °C-ra PLLA-n, 20°C/min-ko abiadurarekin. Hala, propietate termikoak bigarren ekortzean neurtu dira. Degradazio tenperatura aztertzeko aldiz, analisi termograbitrikoa (TGA; Q50 TA Instruments) erabili da, ekortzea 10°C/min-ko abiadurarekin egin delarik giro tenperaturatik 500°C-taraino (DSC eta TGA-ren emaitzak hurrengo puntuan).

PVDF-aren karakterizazio termikoa egiteko, berriz, ekortze diferentzialeko kalorimetroan bi ekortze egin dira: -30 °C-tik 220°C-ra, 20°C/min-ko abiadurarekin. Analisi termograbitrikoan aldiz, ekortzea 10°C/min-ko abiadurarekin egin da giro tenperaturatik 800°C-taraino.



## H.P.3: Materialen inpresio parametro optimoak definitzea

### H.P.3.1. 3D inprimagailuaren funtzionamendua ikastea

Inpresioari ekiteko, lehenik eta behin, Alemaniako EnvisionTEC GmbH etxeke Developer Series modeloko 3D-Biplotter-aren (ikus II. eranskinean planoak) funtzionamendua ikasi da.

### H.P.3.2. Substratuak prestatzea

#### a) PVDF film-ak lortzea

PVDF *film*-ak prentsa hidrauliko (Collin's etxeke P200 E modeloa) bidez egin dira, 210 °C eta 250 bar ezarriz eta mikrometro gutxi batzuetako lodiera duten *film* lauak lortuz. Honetarako, materialak alde aurretik lehorgailuan 24 orduz lehortu dira hutsean.

#### b) PLLA-Dopa film-ak lortzea

Lehenik eta behin 24 orduz materialak lehortzen izan dira lehorgailuan eta ondoren, prentsa hidraulikoa erabiliz, PLLA-zko *film*-ak egin dira, 200 °C eta 250 bar ezarriz. Behin, PLLA-zko *film*-ak izanda, hauek polidopaminaz estaltzeko, Trizma ( $M_w$ : 121.14 g/mol; Sigma-Aldrich) 10 Mm den ur disoluzioa prestatu da. Ondoren, hau irabiagailuan ezarri da disoluzioa homogeneizatu dadin eta jarraian, pH-metroaren (Mettler Toledo FiveEasy) bidez pH konpentsazioa burutu da pH-a 8.5 izan arte. Gero, disoluzioa irabiagailuan genuen bitartean, 1 g dopamina kloridrato ( $M_w$ : 189.64 g/mol; Sigma-Aldrich) gehitu zaio eta estaldura izateko, PLLA *film*-a disoluzioan sartu da, 24 orduz irabiatzen izan delarik. Azkenik, *film*-a disoluziotik atera, ur destilatuz garbitu eta beste 24 orduz lehortu da. Hala, prozesu honen bidez, polidopaminaz estalitako PLLA *film*-ak lortu dira.

### H.P.3.3. Inpresio moduak definitzea

Erabili den inprimagailuak bi modutara egin dezake lan, urtze moduan ( $T=30-250$  °C,  $P=2-10$  bar) eta disoluzio moduan ( $T=2-70$  °C,  $P=2-5$  bar). Urtze moduan materiala kartutxoaren barruan urtu eta estrusio bidez inprimatuko da. Disoluzio moduan, berriz, materialak disolbatu egiten dira disolbatzaile egokietan eta gero, tenperatura baxuko kartutxoaren bidez inprimatzen dira nahi den tenperaturan, aire presio bidez. Hautatutako materialekin mikrotxantiloiak sortzeko inpresio modu ezberdinak frogatu dira eta egokiena aukeratu da kasu bakoitzean (emaitzak hurrengo atalean).



### H.P.3.4. Inpresio parametroen optimizazioa

Inpresioa burutzeko, lehenik eta behin, inpresio punta aukeratu beharko da, hauek tamaina ezberdinetako materialaren irteera zuloak dituztelarik. Irteera zulo honen diametroaren arabera inprimatuko den lerroaren tamaina definituko da. Temperatura altuko kartutxoan erabilera anitzekoak diren tamaina ezberdinetako ( $s = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$  mm) metalezko puntak daude eskuragarri. Temperatura baxukoan aldiz, diametro neurri ezberdineko ( $s = 0.2, 0.25, 0.4, 0.6, 0.84, 1.6$  mm) erabilera bakarrekoak direnak. Hala, material bakoitzarekin inpresio punta ezberdinak frogatu eta egokienak aukeratu dira (emaitzak hurrengo atalean).

Jarraian, inpresio parametroen optimizazio burutu da, garrantzitsuenak, temperatura, inpresio abiadura, ezarritako presioa (2-10 bar), *needle offset* eta *pre* eta *post flow delay* direlarik.

#### a) PLLA eta PLLA-Dopa mikrotxantiloak

PLLA eta PLLA-Dopa inprimatzeko parametro ezberdinak frogatu dira. Honetarako, PLLA-zko eta PLLA-Dopa-zko mikrotxantilo txikiak (20x20 mm) inprimatu eta lerroen trinkotasuna eta zehaztasuna behatu da mikroskopio optiko bidez eta azkenik, emaitzarik onenak ematen zituztenak optimo bezala izendatu dira (emaitzak hurrengo atalean).

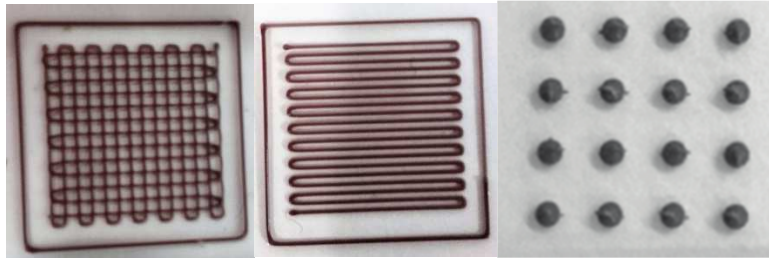
#### b) Silikonazko mikrotxantiloak

Kasu honetan, 0.2, 0.25 eta 0.4 mm-tako diametroa duten puntentzako optimizatu dira parametroak. PLLA-rekin eta PLLA-Dopa-rekin jarraitutako prozedura berdina erabilita, 3D inpresioaren parametro garrantzitsuenak, silikonazko mikrotxantilo txikiak (20x20 mm) inprimatuz eta lerroen trinkotasuna eta zehaztasuna behatuz optimizatu dira (emaitzak hurrengo atalean).

## H.P.4: Mikrotxantiloien neurriak zehaztea

### H.P.4.1. Geometria definitzea

VisualMachines (EnvisionTEC GmbH; Alemania) software-a erabilita STL fitxategiak prozesatu, zutabe-poro geometria egokiak definitu eta inpresio parametroak ezartzen dira. Hala, honen bidez mikrotxantiloien geometria eta hutsune tamaina zehaztuko dira. Lan honetan, *10.Irudian* agertzen diren mikrotxantiloien geometria ezberdinak, artekatutako zutabeak, sareak eta irloteak, frogatu dira, zelulek eurretan duten portaera ezberdina behatzeko.



**10.Irudia.** Zutabe artekatu, sare eta irlote geometriak.

#### H.P.4.2. Mikrotxantiloiak neurtzea

Behin mikrotxantiloiak sortuta, EVOS XL Core mikroskopio optiko alderantzikatuarekin, euren eskala mikrometrikoko argazkiak atera dira, txantilo bakoitzaren hiru zonalde ezberdinetan. Ondoren, ImageJ programa eta eskala bat erabiliz, argazki bakoitzean mikrotxantiloia zutabe zabaleraren eta zutabe arteko tartearen batz bestekoak neurtu dira.

#### H.P.4.3. Inpresio neurrien optimizazioa

Bestalde, kontuan hartzekoa da mikrotxantilo hauek albo neurri gisa nanometro eta milimetro arteko dimentsioak dituztenez lehen eta bigarren inprimaketa geruzak soilik inprimatzen direla. Hala, makinaren fabrikatzaileek, euren adierazten dute lehen eta bigarren geruzak izaten direla zehaztasun gutxien izaten dutenak, puntak materiala deforma eta zanpa baitezake plataformarekin kontaktuan denean. Hau dela eta, neurri ezberdinetako tartekin zutabe eta sare geometriadun mikrotxantiloak sortu dira bai PLLA-n (PLLA-Dopa gutxi baitaukagu) eta bai silikonan eta ondoren, neurtu egin dira ezarri denaren eta benetako neurrien arteko aldea ikusteko eta korrelazio bat ateratzeko.

##### a) PLLA mikrotxantiloak

Artekatutako zutabe eta sare mikrotxantiloak (40x40 mm) zutabetik zutaberako neurri ezberdinekin (0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mm) egin dira, guk programan ezarritako neurrien eta neurri errealeen artean dagoen aldea ikusteko (emaitzak hurrengo atalean). Honela, nahi diren neurrietako tarte errealak lortzeko, jakina izango da zein balio ezarri beharko den programan.

##### b) Silikonazko mikrotxantiloak

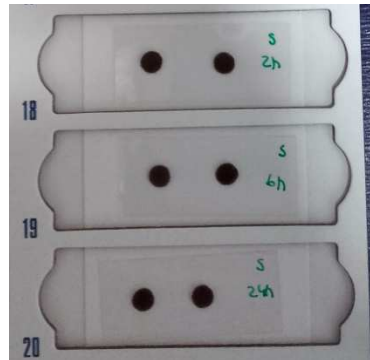
Aurreko kasuan bezala, lehen eta bigarren geruzen zehaztasun falta dela eta, programan ezarritako neurrien eta neurri errealeen artean sortzen den akatsa atzemateko (emaitzak hurrengo atalean) artekatutako zutabe eta sare mikrotxantiloak (20x20 mm) zutabetik zutaberako neurri ezberdinekin (0.18, 0.2, 0.4, 0.8 mm) egin dira.



## H.P.5: Azterketa zelularra

### H.P.5.1. Laginak prestatzea

Jarraian, mikrotxantiloietan zelulen ezartzea burutzeko, puntzoi baten bidez hauen, *11.Irudia* ikusten diren bezalako, 6 mm-ko diametrodun zirkuluak egin dira eta honela, jada materiala prest dago zelulak gainean ezartzeko prozesuari ekiteko.



*11.Irudia. Zelulen behaketarako prestatutako mikrotxantiloien lagin zirkularrak.*

### H.P.5.2. Mikrotxantiloietan zelulak ezartzea eta laginak behatzea

Jarraian azalduko den guztia, Bilboko ingeniarietza eskolako (UPV/EHU) zelulen kultiborako gelan (planoa II. eranskinetan) egin da. Lehenik, materialak esterilizatu behar dira; ondoren, zelulak erein eta laginetan ipiniko dira; jarraian, zelulak nahi den denbora inkubagailuan mantenduko dira eta azkenik, fluoreszenti mikroskopia batean interesatzen zaigun momentuan duten itxura ikusteko, ezarri eta tindatu egingo dira. Segidan, urrats bakoitza laburki azalduko da:

#### a) Materialak esterilizatzea

Lehenik eta behin, material guztiak esterilizatuko dira etanol %70 eta UV izpiekin. Honetarako, mikrotxantiloak dituzten zirkuluak (6 mm) zelulen ereite plaketan ezarri eta bi aldiz etanol bidez garbituko dira, garbiketarik garbiketara 5 minutu lagaz. Ondoren, 3 aldiz, esterila den PBS (Phosphate-buffered saline; Sigma-Aldrich)-arekin garbiketa burutuko da eta azkenik, UV izpien azpian izango dira 30 minutuz.

#### b) Zelulak ereitea eta laginetan ipintzea

Behin materialak esterilizatuta, ikerketa zelularri ekiteko, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco)-an, %10 FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco) eta %1 P/S (penicillin/streptomycin; Gibco)-rekin, HeLa zelulak (American Tissue Culture Collection) kultibatuko dira, T-75 flask batean. Zelulak inkubagailuan direla hazkunde esponentzian bateratzearen %80-90-era iritsi badira, hauen





subkultiboa burutu beharko da. Honetarako, lehenik eta behin, tripsina (Gibco), kultibo ingurunea (DMEM+%10 FBS+%1 P/S) eta PBS-a edo tanpoi soluzio (Hank's balanced solution) ere daitu dakiokoen soluzioa 37 °C-ra berotuko dira bainu epelean. Ondoren, T-75 flask-a inkubagailutik atera, zelulak kultibatzeke ingurune zaharra kendu eta PBS bidez garbituko da, amaitzean hau ere kenduko delarik. Jarraian, zelulak ontziaren hormetatik aska daitezten tripsina gehituko da (5 ml) eta inkubagailuan izango da beste 3 minutuz. Orain jada zelulak askatuta daudenez, tripsina neutralizatzeko 5 ml ingurune gehituko dira eta zelula guztiak 15 ml-ko zentrifugarako tutu batean batuko dira. Segidan, laginean nahi den dentsitate zelularra ezartzeko, dugun zelula kopurua kontatuko da. Hau burutzeko, 10 µl zelulen disoluzio hartu eta hauek beste hainbeste Trypan Blue Stain (%0.4, Gibco) koloratzaileekin nahastuko dira, honen bidez zelula hilak hautemango baitira. Izan ere, Trypan Blue soilik zelula hilen mintza iragateko gai da, hauek urdinez tindatuz eta honela zelula hilen baztertze metodo izanik. Hala, disoluzioa Neubauer-en kamera (BRAND) batean ezarri eta zelulak kontatuko dira, Trypan Blue-k hiltzat markatutakoak izan ezik. Ondoren, 1200 bira/min-ra 5 minutuz tutua zentrifugatuko da, ondoan zelulez osatutako *pellet* bat sortu arte. *Pellet*-a ingurune berrian hautsiko da eta ondoren, alde batetik, materialean ezarriko diren zelulak eta bestetik, subkultibatuko direnak banatuko dira.

Hala, laginean nahi den dentsitate zelularra lortzeko, zenbat ingurune eta zenbat disoluzio zelular gehitu behar den kalkulatu da (ikusi kalkuluak II. eranskinean). Azkenik, zelula hauek laginaren gainean ezarriko dira (5.000 zelula lagineko) eta inkubagailuan, 37°C-an eta %5 CO<sub>2</sub>-an mantenduko dira substratuaren gainean itsatsi arte. Aldiz, subkultiboa burutzeko, T-75 flask berri batean 500.000 zelula ezarriko dira eta hau inkubagailuan sartuko da egun bat edo bi egunetara zelulen egoera behatuko delarik.

### c) Zelulen ezartzea eta emaitzen ikuskatzea

Inkubagailuan nahi den ordu kantitatea izan ondoren, itsaste espezifikoa nahi den zonaldearen gainean ziurtatzeko, zelulak paraformaldehidoarekin (%4; Thermo Scientific) 5 minutuz ezarriko dira aurrez PBS bidez garbitu ondoren. 5 minutu hauek pasa ostean, berriz ere PBS bidez garbituko dira eta honela, zelulak guk nahi genuen momentuan zeuden bezala ezarrita geratuko dira fluoreszentsia mikroskopioan behatu ahal izateko.

Behin lagina honela izanda, mikroskopioan begiratu ahal izateko zelulak tindatu beharra dago. Tindatze prozesuan, lehenik eta behin, zelulen mintza iragazkortuko da PBS-an %0.5 Triton X-100 (Sigma-Aldrich) den disoluzio bidez. Ondoren, PBS bidez garbitu eta blokeoa egingo da PBS-an %1 BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma-Aldrich) den disoluzioa ezarri eta 30 minutuz irabiatzen izanez. Jarraian, zelulak tindatuko dira, zitoeskeletoa rodamina-faloidinarekin (ThermoFisher



Scientific), segidan PBS-T (%0.1 Tween 20 (Sigma-Aldrich) PBS-an)-rekin garbituko direlarik eta nukleoa DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; ThermoFisher Scientific)-rekin, honen garbiketa PBS bidez egingo delarik. Azkenik, laginak fluoreszentsia mikroskopio alderantzikatu (Nikon eclipse Ts2) batekin aztertuko dira.

### H.P.5.3. Burututako entseguak

Mikrotxantiloietan zelulak ezartzeko eta fluoreszentsia mikroskopio bidez ikuskatzeko aipatutako prozesua eta proteina fluorestentearekin burututakoa, jarraian azalduko diren 5 entsegu ezberdinetan aurrera eraman dira.

#### **a) Lehenengo entsegua: Dopaminaz estalitako PLLA *film* gainean eginiko silikona mikrotxantiloietan proteina fluorezentearen ezarpena**

Hasteko, 12.1 mg Trizma ( $M_w$ : 121.14 g/mol; Sigma-Aldrich)) 10 ml ur destilatutan disolbatu dira. Ondoren, disoluzio honen pH-a HCl 1 M erabiliz 8.5-era doitu da pH-metroa (Mettler Toledo FiveEasy) erabiliz. Jarraian, 1 mg BSA-FTIC (Albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate; Sigma-Aldrich) disolbatu dira aurretik doitu den disoluzioaren 1 ml-tan eta disoluzio hau silikonazko mikrotxantilo laginera gehitu da eta 2 orduz irabiatzen izan da 150 bira/min-ra. Azkenik, 3 aldiz PBS bidez garbitu da 5 minutuko tartearekin eta emaitzak fluoreszentsia mikroskopioan ikusi dira (ikus hurrengo atala).

#### **b) Bigarren entsegua: Dopaminaz estalitako PLLA *film* gainean eginiko silikona mikrotxantiloietan zelulen ezarpena**

Optimizatutako silikonazko mikrotxantiloien 16 lagin hartu dira, 8 sare egituradunak eta 8 zutabe artekatu formakoak. Hauek, zelulen ordukako itsaspen selektiboa ikusteko zelulak ereiteko 4 plaka ezberdinetan ezarri dira, plaka bakoitzean bi sare eta bi zutabe jarri direlarik. Ondoren, zelulen disoluzioaren 0.5 ml erein da lagin bakoitza doan gunean eta inkubatzen izan da plaka bakoitza denbora tarte ezberdin batez. Lehen azaldutako prozesua erabiliz, paraformaldehido bidez ezarpena lehenengo plakan erein eta 30 minutura egin da, bigarrenetan 2 ordura, hirugarrenean 6 ordura eta azkenekoan, 24 ordura (emaitzak hurrengo atalean). Ikusienez, zelula oso gutxi ezarri dira gure materialean, materialaren zirkuluek flotatu egiten baitzuten eta beraz, zelulak materialean geratu gabe hondora joaten baitziren. Gainera, ikusi da, sei ordu igaro arte zelulek oraindik forma borobildua dutela, hau da, ez direla hasi forma poligonalak lortzen. Hau dela eta, hirugarren entseguan zelula guztiak materialean izateko tanta bidez ezartzea erabaki da eta zortzi ordutara duten itxura soilik begiratuko da.



### **c) Hirugarren entsegua: Dopaminaz estalitako PLLA *film* gainean silikona mikrotxantiloietan zelulen tanta bidezko ezarpena**

Kasu honetan ere, 2. entseguko metodologia bera erabili da, silikonazko mikrotxantiloiekin eta bi plakatan bakoitzean bi sare geometria eta bi zutabe geometria ezarri dira. 2. entseguan ez bezala, hemen zelulak tanta bidez (25  $\mu$ l) erein dira, hau da, materialezko zirkuluen gainean zelulen disoluzioaren tanta bat soilik erein da, zelula guztiak materialean egon daitezten eta materialak flota ez dezan. Lehenengo plakan, zelulak erein eta inkubagailuan 7 orduz izan dira. Denbora hau pasatuta, lehenago aipatutako prozesuaren bidez ezarpena egin da eta emaitzak ikusi dira fluoreszentsia mikroskopioan. Bigarren plakan aldiz, zelulek itxura borobila erakuts ez dezaten, 7 ordu igaro ondoren zelulenzako ingurunea gehitu da eta zelulak, gau osoa izan dira bertan hazten (ikus emaitzak hurrengo atalean).

### **d) Laugarren entsegua: PVDF film gainean PLLA-Dopazko mikrotxantiloietan proteina fluoreszentearen ezarpena**

1.entseguan jarraitu den prozesu bera erabiliz, PLLA-Dopa mikrotxantiloien gainean proteina fluoreszentea ezarri da eta emaitzak fluoreszentsia mikroskopioaren bidez ikusi dira (ikus hurrengo atala).

### **e) Bosgarren entsegua: PVDF film gainean PLLA-Dopazko mikrotxantiloietan zelulen tanta bidezko ezarpena**

3. entseguko prozedura jarraituz, PLLA-Dopazko zutabe itxurako mikrotxantiloietan zelulak ezarri dira. Hau burutzeko, zelulak kultibatzeke bi plaka ezberdinetan bakoitzean zutabe artekatu formako bi mikrotxantilo zirkulu ipini dira. Sareekin entsegua ez egitea erabaki da, 3.entseguan ikusi denez berauetan oso zelula gutxi lortzen baitziren sareko tarteez duten tamaina txikia dela eta. Hemen, plaka bat zazpi orduz izan da inkubagailuan eta bestean zazpi ordu horiek pasa ostean, kultibo ingurunea gehitu da eta gau osoa edukiko da inkubagailuan. Emaitzak fluoreszentsia mikroskopio bidez behatuko dira (ikus hurrengo atala).

## **H.P.6: Emaitzen helaraztea**

Lan honetan lortutako emaitzak zabaltzeko, Materialen Zientzia eta Teknologiaren IV. Kongresuan parte hartuko da ahozko azalpen bat emanaz. Honez gain, lan honi esker, posible izan da Ekaia argitalpen zientifikoan argitaratuko den artikulua idaztea.

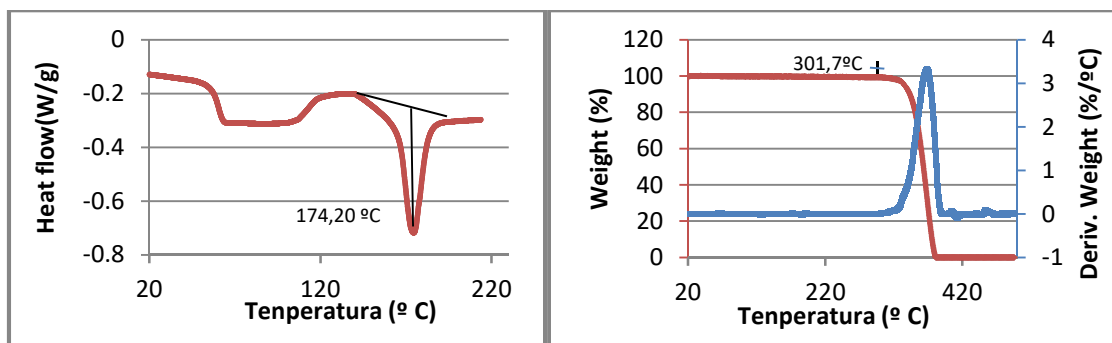
## 7. Emaitzak eta Eztabaida

### H.P.2: Materialen ezaugarritzea

Metodologian ikusi den bezala, inpresio tenperaturak ezartzerako garaian funtsezkoa da materialen karakterizazio termikoa burututa izatea eta hau ekortze diferentzialeko kalorimetiraren (DSC) eta analisi termograbitrikoen (TGA) bidez egiten da.

#### a) PLLA karakterizazio termikoa

1. *Grafikoa* ikusten denez, PLLA-aren urtze temperatura 174 °C inguru da eta degradazio temperatura, berriz, 302 °C da. Hala, erabaki da PLLA-aren inpresio temperatura gisa 180 °C  $\mp$  20 °C erabiltzea.



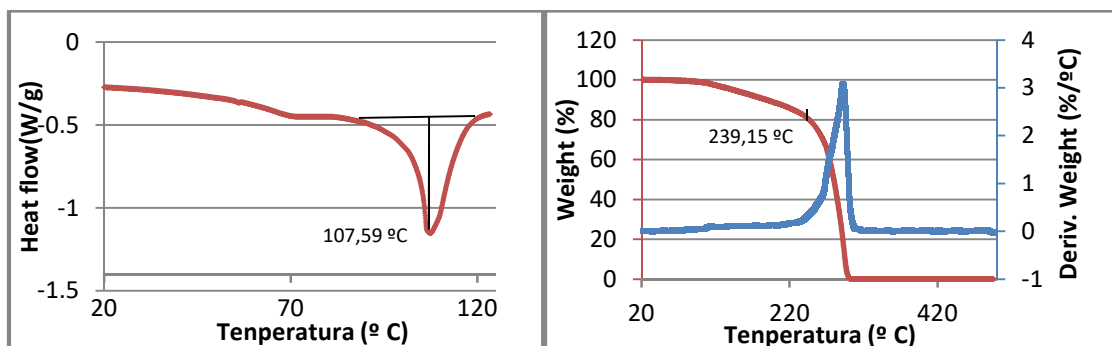
a)

b)

1. *Grafikoa*. PLLA-ren (a) DSC eta (b) TGA grafikoa.

#### b) PLLA-Dopa-ren karakterizazio termikoa

PLLA-Doparen urtze temperatura 108 °C ingurukoa da eta berriz, degradazioa 239 °C inguruan hasten da (ikus 2. *Grafikoa*). Hau dela eta, inpresioa 110 °C  $\mp$  20 °C egitea erabaki da.



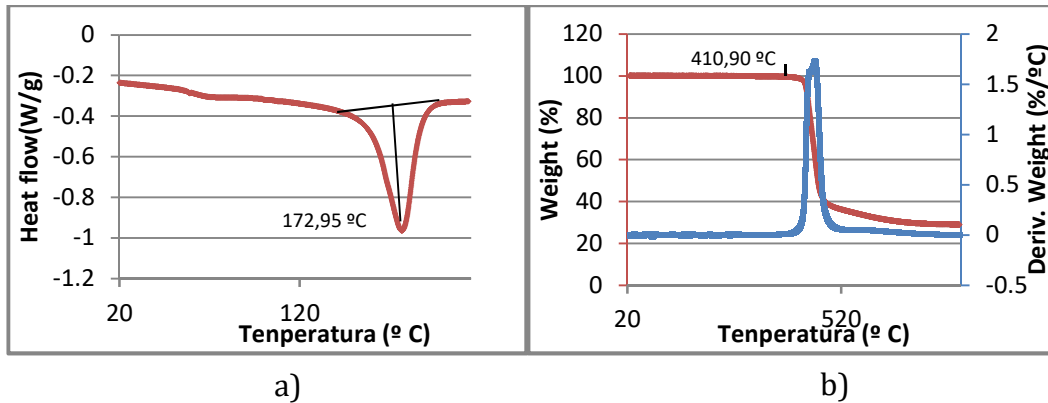
a)

b)

2. *Grafikoa*. PLLA-Dopa-ren (a) DSC eta (b) TGA grafikoa.

### c) PVDF karakterizazio termikoa

3. Grafiko honetan, PVDF-aren degradazio temperatura 411 °C dela ikus daiteke eta urtze temperatura, berriz, 173 °C ingurukoa. Hala, inpresio temperatura 180 °C±20 °C-an ezarri da.



3.Grafikoa. PVDF-ren (a) DSC eta (b) TGA grafikoak.

## H.P.3: Materialen inpresio parametro optimoak definitzea

### H.P.3.3. Inpresio moduak definitzea

Proiektu honetan erabili den 3D inprimagailuak inprimatzeko bi modu ditu eta hau dela eta, material bakoitzarentzat zein den egokiena definitu beharra dago. Batetik, bai PLLA eta bai PLLA-Dopa inprimatzeko urtze modua eta disoluzio modua (disolbatzailea kloroformoa izanik) biak frogatu dira baina erabaki da urtze modua eta tenperatura altuko kartutxoak erabiltzea mikrotxantiloiz zehatz eta egonkorragoak lortzen baitira modu honetara.

Bestetik, PVDF inprimatzen saiatu gara polidopaminaz estalitako PLLA-zko *film* baten gainean baina ez da lortu, materialak duen urtze tenperatura eta biskositateagatik. Hau dela eta, materialez aldatu eta silikonazko mikrotxantiloak egitea erabaki da; kasu honetan ere, zelulak *film*-aren gainean ezartzea espero delarik eta ez mikrotxantiloian. Silikona urtze moduan inprimatu da tenperatura baxuko kartutxoaren bidez arazorik gabe.

### H.P.3.4. Inpresio parametroen optimizazioa

Lehenik eta behin, inprimatzeko puntarik egokienak zein diren determinatu da. Lehen kasuan, PLLA eta PLLA-Dopa inprimatzeko 0.3 mm-ko barne-diametrodun punta erabiltzea erabaki da bi kasuetan arazorik ematen ez duen txikiena berau baita. Silikona inprimatzeko aldiz, 0.25 mm-ko punta erabili da.

Bestalde, III., IV. eta V. Tauletan ikus daitezke, punta bakoitzerako material bakoitzaren parametro optimoak.

**III. Taula.** PLLA-zko mikrotxantiloiak inprimatzeko parametro optimoak, 0.3 mm-ko puntarentzat.

Parametroa	Balioa
Materialaren temperatura set point-a (°C)	190
Estrusioko airearen presioa (bar)	5
Inpresio abiadura (mm/s)	9.5
Needle offset (mm)	0.65
Pre flow delay	0.04
Post flow delay	0

**IV. Taula.** PLLA-Dopa-zko mikrotxantiloiak inprimatzeko parametro optimoak, 0.3 mm-ko puntarentzat.

Parametroa	Balioa
Materialaren temperatura set point-a (°C)	105
Estrusioko airearen presioa (bar)	1.6
Inpresio abiadura (mm/s)	13.5
Needle offset (mm)	0.6
Pre flow delay	0.04
Post flow delay	0

**V. Taula.** Silikonazko mikrotxantiloiak inprimatzeko parametro optimoak.

Parametroa	Punta diametroa (mm)		
	0.2	0.25	0.4
Materialaren temperatura set point-a (°C)	28	28	28
Estrusioko airearen presioa (bar)	4.9	2.5	2
Inpresio abiadura (mm/s)	9.5	9.5	9.5
Needle offset (mm)	0.65	0.55	0.55
Pre flow delay (s)	0.21	0.25	0.15
Post flow delay (s)	0.08	0.08	0.08

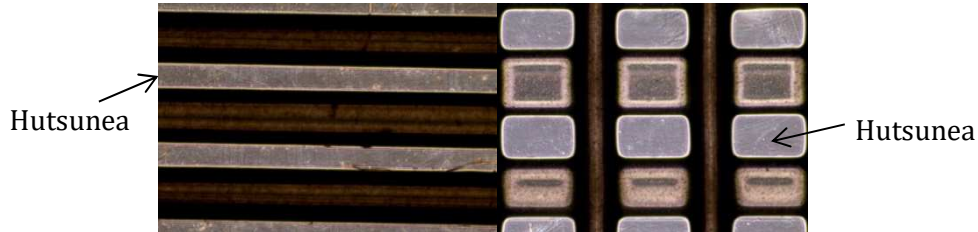
## H.P.4: Mikrotxantiloien neurriak zehaztea

### H.P.4.1. Geometria definitzea

Makinaren diseinuak ez du posible egiten irloteak tenperatura altuko kartutxoaren bidez burutzea eta beraz, tenperatura baxuan, disoluzioan, egitea erabaki da. Modu honetara, ordea, irloteen tamaina murrizta dela eta, irloteak puntak berak eramaten ditu inprimatzen bukatu eta segidan, ezinezkoa bihurtuz hauek burutzea. Beraz, azkenean, artekatutako zutabeak eta sareak soilik aztertu dira.

## H.P.4.2. Mikrotxantiloiak neurtzea

12. Irudian ikus ditzakegun bezalako eskala mikrometrikoko argazkiak lortu dira mikroskopia optiko bidez eta ondoren, ImageJ programa erabiliz, mikrotxantiloiak neurtu dira.



12. Irudia. Zutabe artekatu itxurako (0.2 mm-ko tartearekin) eta sare itxurako (0.4 mm-ko tartearekin) silikonazko mikrotxantiloien mikroskopiaan ateratako irudia.

## H.P.4.3. Inpresio neurrien optimizazioa

### a) Inpresio neurri errealak

VI. eta VII. Tauletan PLLA-zko zutabe artekatu eta sare mikrotxantiloien neurri errealak agertzen dira puntaren diametroa 0.3 mm denerako. VIII., IX., X. eta XI. Tauletan berriz, silikonazko mikrotxantiloien neurri errealak daude, ezartzen den balioaren eta balio errealaren arteko aldea azaltzen delarik.

VI. Taula. PLLA-zko zutabe artekatu mikrotxantiloien neurri errealak.

Zutabe arteko tarte teorikoa (mm)	Punta diametroa ( $\varnothing = 0.3$ mm)	
	Benetako tarte (mm)	Zutabeen zabalera (mm)
0.2	0.194	0.354
0.3	0.261	0.395
0.4	0.319	0.395
0.5	0.481	0.365

VII. Taula. PLLA-zko sare mikrotxantiloien neurri errealak.

Zutabe arteko tarte teoriko horizontala (mm)	Zutabe arteko tarte teoriko bertikala (mm)	Punta diametroa ( $\varnothing = 0.3$ mm)			
		Benetako tarte horizontala (mm)	Benetako tarte bertikala (mm)	Zutabe horizontalen zabalera (mm)	Zutabe bertikalen zabalera (mm)
0.2	0.2	-	-	-	-
0.3	0.3	0.393	0.464	0.153	0.256
0.4	0.4	0.481	0.394	0.324	0.240
0.2	0.3	-	-	-	-
0.2	0.4	-	-	-	-

**VIII. Taula. Silikonazko zutabe artekatu mikrotxantiloien neurri errealak.**

Zutabe arteko tarte teorikoa (mm)	Puntaren diametroa					
	ϕ= 0.2 mm		ϕ= 0.25 mm		ϕ= 0.4 mm	
	Benetako tarte (mm)	Zutabeen zabalera (mm)	Benetako tarte (mm)	Zutabeen zabalera (mm)	Benetako tarte (mm)	Zutabeen zabalera (mm)
0.18	-	-	0.135	0.307	0.073	0.530
0.2	-	-	0.172	0.293	0.135	0.476
0.4	0.165	0.427	0.391	0.277	0.456	0.383
0.8	0.601	0.400	0.795	0.264	0.698	0.444

**IX, X eta XI. Taulak. Silikonazko sare mikrotxantiloien neurri errealak.**

Zutabe arteko tarte teoriko horizontala (mm)	Zutabe arteko tarte teoriko bertikala (mm)	Punta diametroa (ϕ= 0.2 mm)			
		Benetako tarte horizontala (mm)	Benetako tarte bertikala (mm)	Zutabe horizontalen zabalera (mm)	Zutabe bertikalen zabalera (mm)
0.18	0.18	-	-	-	-
0.2	0.2	-	-	-	-
0.4	0.4	0.379	0.236	0.376	0.227
0.8	0.8	0.775	0.633	0.358	0.237

Zutabe arteko tarte teoriko horizontala (mm)	Zutabe arteko tarte teoriko bertikala (mm)	Punta diametroa (ϕ= 0.25 mm)			
		Benetako tarte horizontala (mm)	Benetako tarte bertikala (mm)	Zutabe horizontalen zabalera (mm)	Zutabe bertikalen zabalera (mm)
0.18	0.18	0.218	0.168	0.270	0.224
0.2	0.2	0.227	0.145	0.310	0.231
0.4	0.4	0.439	0.401	0.243	0.227
0.8	0.8	0.841	0.742	0.310	0.229

Zutabe arteko tarte teoriko horizontala (mm)	Zutabe arteko tarte teoriko bertikala (mm)	Punta diametroa (ϕ= 0.4 mm)			
		Benetako tarte horizontala (mm)	Benetako tarte bertikala (mm)	Zutabe horizontalen zabalera (mm)	Zutabe bertikalen zabalera (mm)
0.18	0.18	0.315	0.221	0.366	0.273
0.2	0.2	0.352	0.247	0.357	0.263
0.4	0.4	0.534	0.406	0.401	0.275
0.8	0.8	0.946	0.852	0.336	0.262



## b) Mikrotxantiloii optimizatuak egitea

Azkenik, material bakoitzaren inpresio parametro optimoak eta ezartzen diren eta lortzen diren neurrien arteko aldeak ezagutzen direnean, bi bideetan txantiloirik egokienak izango direla uste direnak inprimatu dira, erabaki delarik, 0.2 mm-ko zutabeen arteko tartea duten zutabe artekatuak eta 0.2x0.2 mm-ko tartearak dituzten sareak egitea, emaitza onak lortu baitira neurri hauekin. Hala, lehenengo bidean PVDF *film* negatibo baten gainean PLLA-Dopa inprimatu da 20x20 mm-ko zutabe artekatu mikrotxantiloiak lortuz (neurri zehatzak, neurtzeko lehen azaldutako prozedura bera erabiliz lortu direlarik, *XII. Taulan*). Bigarren bidean, berriz, dopaminaz estalitako PLLA *film* baten gainean silikona sare eta zutabeak inprimatu dira (neurri zehatzak *XIII. eta XIV. Taulatan*), 30x60 mm-ko mikrotxantiloiak eginez.

*XII. Taula. PVDF ganean inprimatutako PLLA-Dopa-zko zutabe artekatu mikrotxantiloii optimoen neurri errealak.*

Zutabe arteko tarte teorikoa (mm)	Punta diametroa ( $\varnothing = 0.3$ mm)	
	Benetako tartea (mm)	Zutabeen zabalera (mm)
0.2	0.137	0.368

*XIII. Taula. Dopaminaz estalitako PLLA film ganean inprimatutako silikonazko zutabe artekatu mikrotxantiloii optimoen neurri errealak.*

Zutabe arteko tarte teorikoa (mm)	Punta diametroa ( $\varnothing = 0.25$ mm)	
	Benetako tartea (mm)	Zutabeen zabalera (mm)
0.2	0.159	0.306

*XIV. Taula. . Dopaminaz estalitako PLLA film ganean inprimatutako silikonazko sare mikrotxantiloii optimoen neurri errealak.*

Zutabe arteko tarte teoriko horizontala (mm)	Zutabe arteko tarte teoriko bertikala (mm)	Punta diametroa ( $\varnothing = 0.25$ mm)			
		Benetako tarte horizontala (mm)	Benetako tarte bertikala (mm)	Zutabe horizontalen zabalera (mm)	Zutabe bertikalen zabalera (mm)
0.2	0.2	0.236	0.181	0.276	0.220



## H.P.5: Azterketa zelularra

### H.P.5.3. Burututako entseguak

#### a) Lehenengo entsegua: Dopaminaz estalitako PLLA *film* gainean eginiko silikona mikrotxantiloietan proteina fluoreszentearen ezarpena

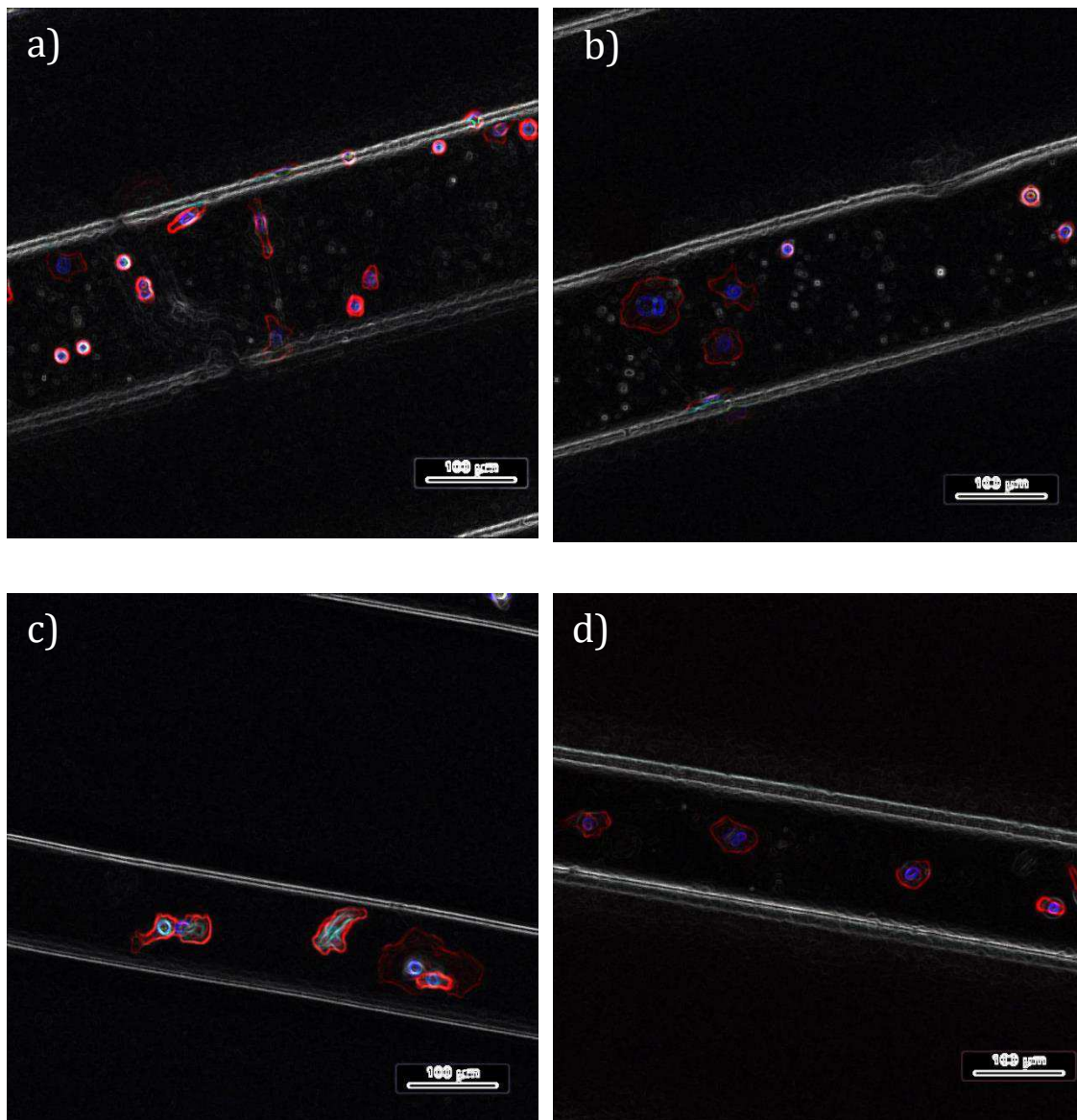
Lehenengo entseguan, dopaminaz estalitako PLLA *film* gainean eginiko silikonazko zutabe artekatu mikrotxantilo optimizatueta proteina fluoreszentea ezarri da. Kasu honetan, espero zen proteina soilik dopaminan itsastea eta ez silikonan eta beraz, bere kokapen selektiboa lortzea. Hala ere, fluoreszentzia mikroskopioan gainazal osoa berdez tindatua ikusi da, proteina fluoreszentea gainazal osoan baitzegoen. Beraz, esan dezakegu proteina gainazal osoan berdin itsatsi dela materialen artean ezberdintasunik egin gabe eta ez dela lortu nahi genuen helburua.

#### b) Bigarren entsegua: Dopaminaz estalitako PLLA *film* gainean eginiko silikona mikrotxantiloietan zelulen ezarpena

Kasu honetan, dopaminaz estalitako PLLA gainean eginiko silikonazko zutabe artekatu eta sare mikrotxantilo optimizatueta zelulen ezarpena burutu da eta emaitzak fluoreszentzia mikroskopioan ikusi dira. Zelulak erein ostean 30 minutu, 2 ordu, 6 ordu eta 24 ordu izan dira inkubagailuan.

- **Zutabe artekatua geometria**

Ikusi denez, zutabe artekatuen kasuan, materialaren gainean oso zelula gutxi izatea lortu da, zelulen kultiboa egiterako garaian materialek flotatzen zuten zelulak ontziaren ondora joan baitira. Hala ere, jarraian dauden irudietan ikusten da, aurkitu diren zelula apurrak, nahi zen bezala, soilik dopamina daraman gainazal zatian aurkitu direla. Gainera, behatu da zelulek 6 orduak (ikus *13. Irudia* a eta b) pasa arte forma borobildua zutela, hau da, ez direla ingurunean hazten hasi eta ez dituzte forma poligonalak lortu. Hala, 24 ordu pasa ostean, *13. Irudiko* c eta d irudietan ikusten denez, zelulak haziago aurkitu dira, jada tamaina handiagoa zutelarik.



**13. Irudia:** Silikonazko zutabe artekatu mikrotxantiloietan zelulen itxura 6 ordura (a eta b) eta 24 ordura (c eta d).

- **Sare geometria:**

Bestalde, sare geometriari dagokionean, ia ez da zelularik aurkitu. Izan ere, uste da zelulei asko kostatzen zaiela sareek dituzten tarte txikietan sartzea, hauen tamaina murrizta dela eta. Gainera, mikrotxantilo hauek plano ezberdinetan geratzen direnez, fluoreszentsia mikroskopiaren bidez emaitzak behatzea oso zaila suertatzen da.

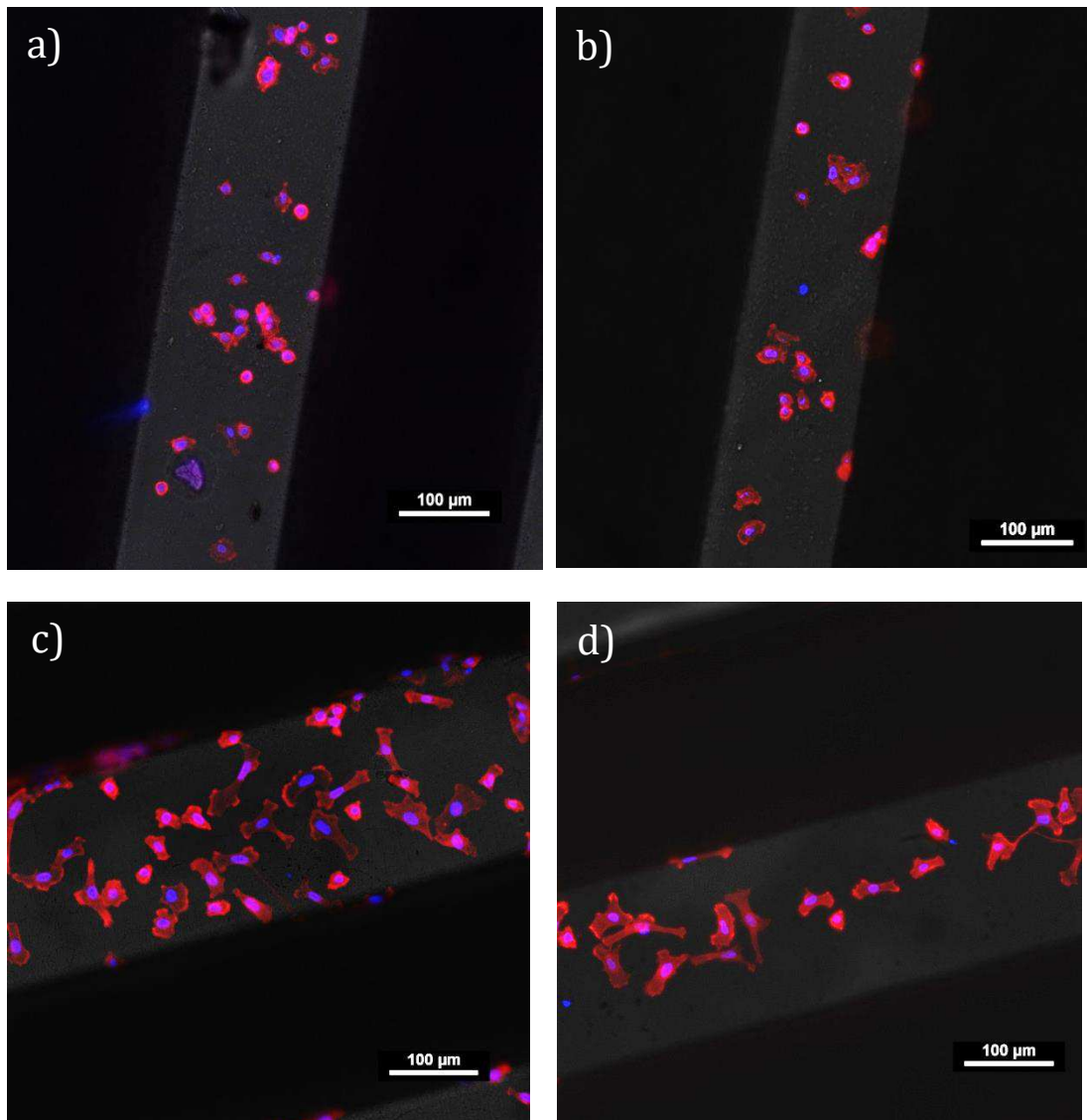
**c) Hirugarren entsegu:** Dopaminaz estalitako PLLA *film* gainean silikona mikrotxantiloietan zelulen tanta bidezko ezarpena

Hemen ere, silikonazko txantiloak erabili dira baina kasu honetan, materialetan zelula gehiago izateko tanta bidez egin da ereitea. Bestalde, aurreko entseguan 6 ordu pasa arte zelulak materialera ongi egokitu ez zirenez, hemen bi bide jorratu

dira: alde batetik, zelulak erein eta zazpi orduz izan dira inkubagailuan, ondoren emaitzak ikusteko eta bestetik, 7 ordu horiek igaro ostean zelulenzako ingurune berria gehitu da eta gau osoa izan dira bertan hazten, azkenik 24 ordu pasata emaitzak behatu diren arte.

- **Zutabe artekatu geometria:**

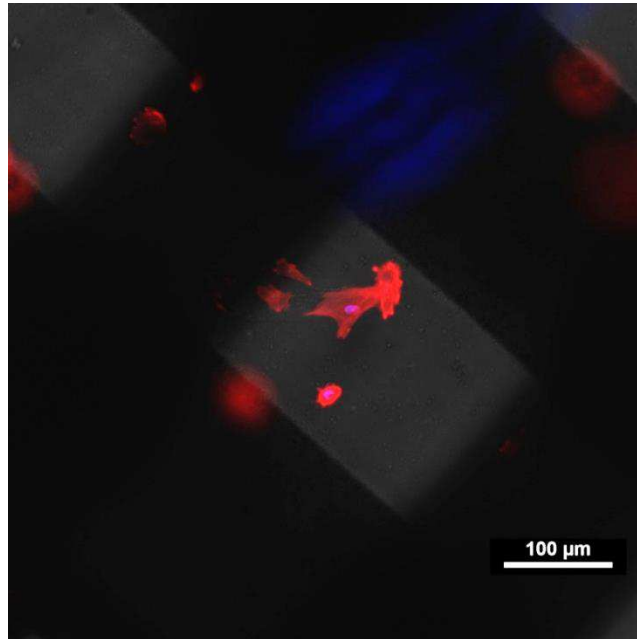
Zutabe artekatu geometriadun mikrotxantiloien gainean zelulak tanta bidez ereinda material gainean askozaz zelula gehiago izatea lortu da eta hemen ere, hauek dopaminazko zatietan soilik aurkitu dira. Hala, argi geratu da zelulek nahiago dutela dopaminan itsastea silikonan baino eta beraz, zelulen kokapen selektiboa lortzeko helburua bete da. Gainera, zazpi ordu pasa ostean baino zelula haziagoak behatu dira 24 ordu igarota. *14. Irudian* ikus daiteke lortutakoa:



**14. Irudia:** Silikonazko zutabe artekatu mikrotxantiloietan tanta bidez ereindako zelulen itxura 7 ordura (a eta b) eta 24 ordura (c eta d).

- **Sare geometria:**

Sareen kasuan, silikonan ez da zelularik aurkitu eta dopaminan berriz, oso gutxi, uste baita sareek hain tarte txikiak izanik zelulei asko kostatzen zaiela hutsuneetan sartzea. Hala ere, gutxi batzuk aurkitu dira, esaterako *15. Irudikoa*.



*15. Irudia: Silikonazko sare mikrotxantiloietan tanta bidez ereindako zelulen itxura 24 ordura.*

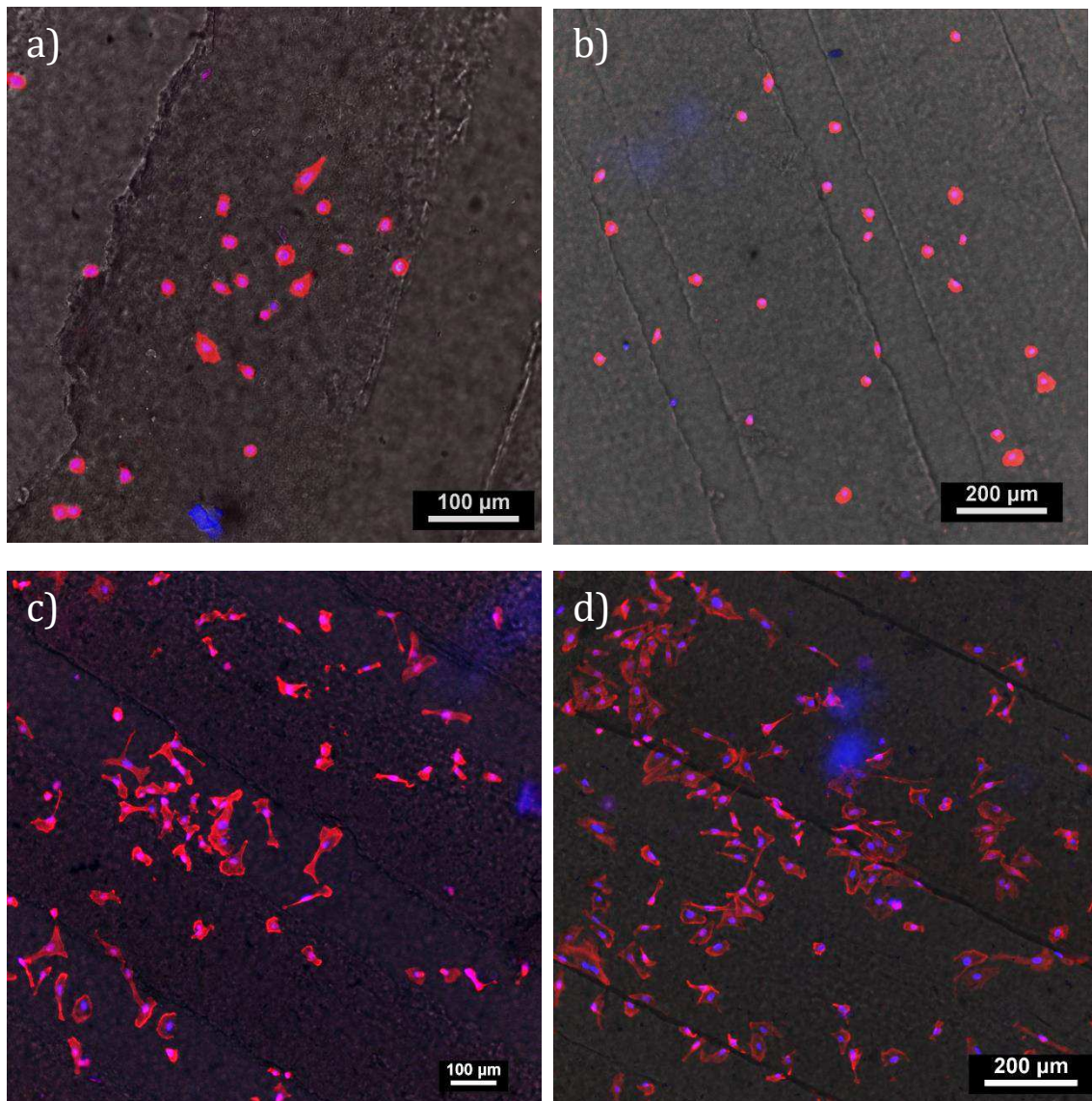
**d) Laugarren entsegua: PVDF film gainean PLLA-Dopazko mikrotxantiloietan proteina fluoreszentearen ezarpena**

Lehenengo entseguan jarraitu den prozesu bera erabiliz, PVDF gainean egindako PLLA-Dopa zutabe artekatu mikrotxantiloien gainean proteina fluoreszentea ezarri da eta emaitzak fluoreszentzia mikroskopioaren bidez ikusi dira. Espero zen proteina soilik PLLA-Dopan ezartzea baina mikroskopio bidez ikusienez, gainazal osoa berde kolorekoa agertu da proteina material osoan berdin itsatsi baita.

**e) Bosgarren entsegua: PVDF film gainean PLLA-Dopazko mikrotxantiloietan zelulen tanta bidezko ezarpena**

Azken entsegu honetan, PVDF gainean egindako PLLA-Dopa mikrotxantiloietan zelulak erein dira hirugarren entseguko prozedura bera erabiliz. Entsegua soilik zutabe artekatuekin egitea erabaki da aurreko entseguetan sareekin lortu diren emaitza ezegokiak direla eta. Gainera, plaka batean zazpi orduz izan dira zelulak kultibatzen eta bestean, zazpi ordu hauek igaro ondoren ingurune berria gehitu da eta gau osoa izan da zelulak gehiago hazteko. Kasu honetan, espero zen zelulak soilik PLLA-Dopa mikrotxantiloietan egotea baina fluoreszentzia mikroskopioan ikusi den bezala (*ikus 16. Irudia*), zelulak gainazal osoan banatuta aurkitu dira eta beraz, material hauetan ez da lortu zelulen kokapen selektiboa izatea. Hala ere, behintzat ikusi da zelulak gehiago hasi direla 24 ordu pasatzean.





**16. Irudia:** PLLA-Dopa-zko zutabe artekatu mikrotxantiloietan tanta bidez ereindako zelulen itxura 7 ordura (a eta b) eta 24 ordura (c eta d).

## **8. EGINKIZUNEN DESKRIBAPENA**

Zati honetan, master amaierako lan hau egiterako garaian, aurrera eramaniko eginkizunak azalduko dira. Gainera, eginkizun hauek burutzeko iraupena, giza baliabideak eta baliabide teknikoak ere zehaztuko dira. Proiektu honi hasiera, 2018eko otsailaren 1ean eman zitzaioan eta 2018ko ekainaren 5ean amaitu zen.

Hala, proiektu honek hiru fase garrantzitsu izan ditu. Lehena teorikoa, bigarrena esperimental eta hirugarrena ondorioak lortu eta idazketakoa. Ondoren azaltzen dira, zehazki, fase hauen barnean burutu diren eginkizunak.



## 8.1. Eginkizunak

### E.1. Azterketa bibliografikoa

#### **E.1.1. Artikulu eta informazio iturri ezberdinen bilaketa eta irakurketa**

-Definizioa: Eginkizun honetan, gaur egun arte argitaratu diren eta gaiarekin erlazionatuta dauden artikulu eta liburu ezberdinetan, mikrotxantiloiei eta 3D inpresioari buruzko informazioa bildu da.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 190 ordu

Tutorea: 50 ordu

Laborategiko laguntzailea: 50 ordu

-Baliabide teknikoak: Datu baseak (ScienceDirect eta Scifinder) eta ordenagailu bat.

-Iraupena: 4 aste

#### **E.1.2. Materialen aukeraketa**

-Definizioa: Irakurritako artikulu ezberdinetatik informazioa bildu da eta proiektu honetarako materialik egokienak aukeratu dira.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 5 ordu

Tutorea: 1 ordu

-Baliabide teknikoak: Ordenagailu bat

-Iraupena: 2 egun

#### **E.1.3. 3D-Biplotter makinaren manuala irakurtzea**

-Definizioa: Makinaren manuala irakurri da bere funtzionamendua ulertzeko eta ikasteko.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 4 ordu

Tutorea: 0 ordu

-Baliabide teknikoak: Ordenagailua eta manuala.

-Iraupena: 2 egun

### E.2. Garapen praktikoa

#### **E.2.1. Materialen karakterizazio termikoa**



-Definizioa: Proiektuan urtze moduaren bidez inprimatuko diren materialen (PLLA-Dopa, PLLA eta PVDF) ezaugarri termikoak (Tu eta Td) DSC eta TGA tekniken bidez lortu dira.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 6 ordu

Tutorea: 0 ordu

-Baliabide teknikoak: DSC makina eta bere osagarriak, TGA makina eta bere osagarriak eta balantza.

-Iraupena: 1 aste

### **E.2.2. 3D-Biplotter-aren erabilera ikastea**

-Definizioa: Naroa Sabada ikasle pre-doktoralaren laguntzaz makinaren erabilera ikasi da.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 40 ordu

Laborategi laguntzailea: 20 ordu

-Baliabide teknikoak: 3D inprimagailua.

-Iraupena: 15 egun

### **E.2.3. Film-ak lortzea**

-Definizioa: Prentsa hidraulikoan PVDF eta PLLA *film*-ak lortu dira.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 12 ordu

Laborategi laguntzailea: 1 ordu

-Baliabide teknikoak: Prentsa hidraulikoa, lehorgailua eta balantza.

-Iraupena: 1 aste

### **E.2.4. PLLA *film*-ak dopaminaz estaltzea**

-Definizioa: Lortuta PLLA *film*-ak dopaminaz estali dira.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 4 ordu

Laborategi laguntzailea: 4 ordu

-Baliabide teknikoak: Irabiagailua, PH-metroa eta bere osagarriak, lehorgailua, pisua eta 500 ml-ko prezipitatu ontzia.

-Iraupena: 2 egun





### **E.2.5. Materialak inprimagarriak diren ikustea, materialen inpresio parametro optimoak zehaztea eta inpresio modu egokienak definitzea**

-Definizioa: Materialak inprimagarriak diren aztertu da, modu ezberdinetan inprimagarritasuna ikusi da eta PLLA-Dopa, PLLA (aurrez lehortu egin dira) eta silikonaren inprimatze parametro optimoak zehaztu dira.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 30 ordu

Tutorea: 1 ordu

-Baliabide teknikoak: 3D-Biplotter makina eta bere osagarriak eta lehorgailua.

-Iraupena: 1 aste

### **E.2.6. Inpresio neurri optimoak zehaztea eta geometriak definitzea**

-Definizioa: Neurri jakinetako mikrotxantiloak egin dira eta honela, softwarean ezartzen diren eta lortzen diren neurri errealean arteko aldeak ikusi dira mikroskopia optiko bidez mikrotxantiloien tamainak neurtuz.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 48 ordu

Tutorea: 1 ordu

-Baliabide teknikoak: 3D-Biplotter-a eta bere osagarriak, mikroskopia optikoa eta ImageJ programa.

-Iraupena: 1 aste

### **E.2.7. Mikrotxantilo optimoak inprimatzea**

-Definizioa: Behin neurri eta inpresio parametro optimoak ezagututa mikrotxantilo egokiak sortu eta neurtu dira.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 16 ordu

Tutorea: 0 ordu

-Baliabide teknikoak: 3D-Biplotter-a eta bere osagarriak, mikroskopia optikoa eta ImageJ programa.

-Iraupena: 5 egun

### **E.2.8. Entseguak**

-Definizioa: 5 entsegu ezberdinetan, gure mikrotxantilo optimizatuetan zuelulak eta proteina fluoreszenteak ezarri dira, hauek duten jarrera fluoreszenti mikroskopia bidez aztertu delarik.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 52 ordu



### Laborategiko laguntzailea: 40 ordu

-Baliabide teknikoak: Zelulen kultibo gela, fluoreszentsia mikroskopia alderantzikatua, irabiagailua, PH-metroa eta neurri ezberdinetako pipetak.

-Iraupena: 3 aste

### E.3. Emaitzen analisisa eta ondorioak

-Definizioa: Entseguan lortu diren emaitza eta datuen bilketa eta adierazpen egokia egin dira. Entsegu bakoitzean lortutako emaitzen analisi kritikoa burutu da, euretatik ondorio ezberdinak lortuz eta hurrengo entsegurako prozedura komenigarriak zehaztuz.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 15 ordu

Tutorea: 5 ordu

Laborategiko laguntzailea: 3 ordu

-Baliabide teknikoak: Excel programa eta ordenagailua.

-Iraupena: 3 egun

### E.4. Idazketa

-Definizioa: Amaitzeko, burututako proiektuari buruzko txosten bat idatzi da, ondoren berau aurkeztu beharko delarik. Txosten honetan, egindako bilaketa bibliografikoan lortutako informazioa, garapena burutzeko metodologia eta lortutako emaitza eta ondorioak adierazi ziren.

-Giza baliabideak: Ikaslea/ MAL-aren egilea: 180 ordu

Tutorea: 30 ordu

-Baliabide teknikoak: Ordenagailua eta Excel programa

-Iraupena: 3 hilabete

## **8.2. Mugarriak**

### H1. Proiektuaren hasiera

-Definizioa: Proiektuari ekin zitzaion tutorearekin burutu zen bilera baten bidez.

-Data: 2018/02/01

### H2. Mikrotxantilo optimoen lorpena

- Definizioa: Gainean zelulak ezartzeko moduko optimizatutako mikrotxantiloak lortu ziren.



- Data: 2018/05/11

### H3. Garapen praktikoaren amaiera

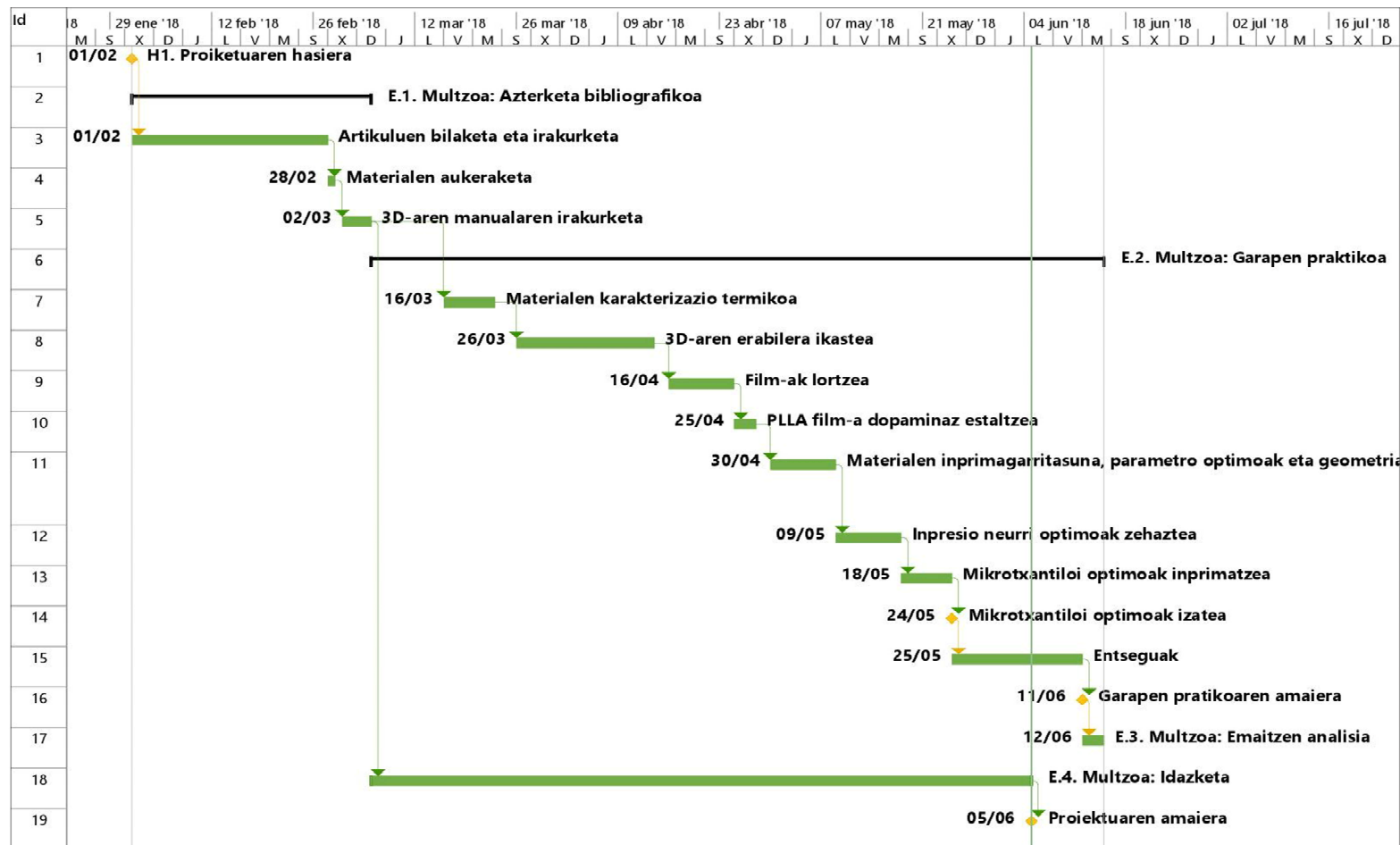
- Definizioa: Laborategian burutu beharreko lana amaitu zen, azken entseguarekin.
- Data: 2018/05/29

### H4. Proiektuaren amaiera

- Definizioa: Idatzitako MAL-aren txostena onartu zen.
- Data: 2018/06/05

### 8.3. Kronograma

Jarraian proiektuaren garapena adierazten duen Gantt-diagrama ikus daiteke, *17.Irudian*:



*17.Irudia: Gantt diagrama.*

## 9. AURREKONTUA

Jarraian master amaierako lan honetarako aurrekontua, atalez atal aztertuko da.

### 9.1. Barne orduak

Barne orduen barruan, proiektua egiteko erabili diren giza baliabideak hartzen dira kontutan, hau da, jarrian eginkizun bakoitza burutzeko, taldeko kide bakoitzak zenbat denbora erabili duen adieraziko da. MAL hau burutu ahal izateko hiru pertsonak egin dute lan bertan: batetik, Master Amaierako Lanaren (MAL) egile den ikaslea, bestetik, MAL-aren zuzendaria den irakasle doktorea eta azkenik, laborategiko laguntzaile Aitor Larrañaga eta Naroa Sabada ikasle post eta predoktoralak. *XV. Taulan* ikus daitezke eginkizun bakoitza egiteko erabili diren orduak:

*XV. Taula. Eginkizun bakoitzerako erabili den ordu kopurua.*

Eginkizuna	Ikasleak egindako ordu kopurua (h)	Tutoreak egindako ordu kopurua (h)	Laborategiko laguntzaileek egindako ordu kopurua (h)
Azterlan bibliografikoa	199	51	30
Garapen praktikoa	208	2	65
Emaitzen analisisa eta ondorioak	15	5	3
Idazketa	180	30	0
GUZTIRA (h)	607	88	98

Hala, langile bakoitzak jasotzen duen soldata bere titulazioaren araberakoa da eta beraz, baita orduko kobratzen duen kantitatea ere. *XVI. Taulan* ikus daiteke barne orduen koste totala.

*XVI. Taula. Barne orduen koste totala.*

Pertsonala	Kostua orduko (€/ordu)	Orduak (h)	Kostua (€)
Ikaslea	6	607	3.642
Tutorea	17	88	1.496
Laborategiko laguntzailea	15	98	1.470
<b>Azpitotala (€)</b>			6.608

Oharra: Kostu ez zuzenak langileen orduen kostuan sartu dira. Proiektu honetan, kostu zuzenen %20a dira kostu ez zuzena.

## 9.2. Amortizazioak

Zati honetan, lan hau aurrera eramateko erabili diren aktibo finakoak sartzen dira eta euretako bakoitzaren bizitza erabilgarria eta emandako erabilera ere adierazten dira. Hauxe ikus daiteke XVII. Taulan.

*XVII. Taula. Amortizazioen banaketa.*

Tresneria	Kantitatea (un)	Kostua unitateko (€/un)	Kostu totala (€)	Bizitza erabilgarria (urte)	Erabilera (urte)	Amortizazioa (€)
3D inprimagailua	1	100.000	100.000	10	0,3	3.000
DSC makina	1	200.000	200.000	15	0,1	1.333,33
TGA makina	1	200.000	200.000	15	0,1	1.333,33
Lehorgailua	1	7.000	7.000	20	0,3	105
Kultibo gela	1	60.000	60.000	10	0,1	600
Newbauer-en kamera	1	60	60	5	0,1	1,2
Fluoreszentzia mikroskopioa	1	18.000	18.000	10	0,1	180
Prentsa hidraulikoa	1	50.000	50.000	15	0,1	333,33
PH-metroa	1	520	520	8	0,3	15,6
Puntzoia	1	60	60	10	0,3	19,5
Balantza	1	420	650	8	0,3	19,5
Micropipeta	4	260	1.040	10	0,3	31,2
Ordenagailua	3	700	2.100	5	0,3	78,75
Microsoft office	1	100	100	1	0,3	30
<b>Azpitotala (€)</b>						<b>7.080,74</b>

## 9.3. Gastuak

Gastuen barnean sartzen dira etorkizuneko proiektuetarako berrerabilgarriak ez diren, material eta konposatuen kostuak. Hauen artean daude, erabilitako material suntsikorra, zelulak, inprimagailuaren polimerozko eta metalezko puntak, disoluzio modurako tutuak, etab daude. XIII, XIX eta XX. Taulak gastuei lotutakoak dira.

*XVIII. Taula. Material suntsikorraren kostua.*

Kontzeptua	Kantitatea (g edo ml)	Kostua unitateko(€/un)	Kostu totala(€)
PLLA (Corbion(Purac))	40 g	4,5	180
PVDF (Sigma-Aldrich)	20 g	1,25	25
Silikona (Silcoferm S; PCI)	-	5,66	5,66
Trizma (Sigma-Aldrich)	5 g	0,84	4,2
Dopamina kloridrato (Sigma-Aldrich)	5 g	3,56	17,8



HeLa zelulak	-	700	700
PBS (Sigma-Aldrich)	2000 ml	0,042	84
DMEM (ThermoFisher Scientific)	1000 ml	0,048	48
FBS (ThermoFisher Scientific)	100 ml	1,2	120
P/S (Gibco)	10 ml	0,07	0,7
Tripsina(Gibco)	15 ml	0,11	1,65
tanpoi soluzioa (Hank's balanced solution)	30 ml	0,042	1,26
Trypan Blue Stain (ThermoFisher Scientific)	0,03 ml	0,3	0,009
Paraformaldehidoarekin (Thermo scientific)	15 ml	4,4	66
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)	0,05 ml	0,43	0,0215
BSA (Sigma-Aldrich)	0,25 g	4,14	1,035
Tween 20 (Sigma-Aldrich)	0,06 ml	0,48	0,0288
DAPI (ThermoFisher Scientific)	0,0063 ml	73	0,46
Rodamina-faloidinarekin (ThermoFisher Scientific)	0,09 ml	103	9,27
Etanol	2000 ml	0,018	36
Kloroformoa	2000 ml	0,0082	180
		<b>Azpitotala (€)</b>	1317,49

*XIX. Taula. 3D-aren gastuak*

Kontzeptua	Kantitatea	Kostua unitateko(€/un)	Kostu totala(€)
Metalezko puntak	4	13,95	55,8
Polimerozko puntak	10	4,60	46
Polimerozko tutuak	2	7,25	14,5
Polimerozko pistoi pieza	2	4,45	8,9
Polimerozko tutuen goiko estalkiak	2	2,9	5,8
Polimerozko tutuen beheko estalkiak	2	1,90	3,8
Juntura polimerikoak	2	5	10
		<b>Azpitotala (€)</b>	144,8



**XX. Taula. Gainontzeko gastuak.**

Kontzeptua	Kantitatea	Kostua unitateko(€/un)	Kostu totala(€)
T-75 flask ontziak	3	0,49	1,47
Materialetan zelulen kultiborako plakak	9	0,39	3,51
CO <sub>2</sub> bonbona	1	93	93
N <sub>2</sub> bonbona	1	250	250
Pipetak	40	0,18	7,2
Falcon tutuak	50	0,114	5,7
Artikuluak, liburuak...	-	30	30
Bulego materiala	-	20	20
Laborategiko materiala (eskularruak, batak, tefloia, aluminio papera, pipeten puntak, DSC-rako pastilak egiteko materiala, pintzak, mailua, ontziak...)	-	200	200
<b>Azpitotala (€)</b>			<b>610,88</b>

## 9.4. Kostu totala

Lortutako kostu azpitotal guztiak batuz eta honi gastu finantzarioa gehituz, kostu totala lortzen da, XXI. Taula:

**XXI. Taula. Kostu totala.**

Atalak	Kostua
Barne orduak	6608 €
Amortizazioak	7080,74 €
Gastuak	1317,49€+144,8€+610,88€=2073,17€
Gastu finantziarioa (%4)	630,47 €
<b>Totala</b>	<b>16.392,39 €</b>

Beraz, denera gure aurrekontua 16.392,39 € izango da.

## 10. ARRISKUEN ANALISIA

Edozein proiekturen egikaritzapenean zehar hainbat arrisku sor daitezke. Arrisku hauek mota ezberdinetakoak izan daitezke eta hauen aurreikuspen, identifikazio eta analisi zehatz bat burutzea oso garrantzitsua da. Arriskuen analisiarekin hauek sor ditzaketen kalteak ekidin edota murriztea da helburua, eta horretarako, beharrezkoa izango da arriskuak identifikatzea eta dagozkien kontingentzia planak zehaztea.

Hala, metodologia ezberdinak daude gaur egun, arriskuak aurkitu eta hauek kontrolpean izateko neurriak planifikatzeko. Hauen artean erabilienetakoa, Akats eta Ondorioen Analisi Modala (AOAM; FMEA) da. Berau erabiliko da proiektuko arrisku





potentzialak antzemateko eta analizatzeko, hauen ondorioak sailkatuko direlarik gertatzeko frekuentzia eta garrantziaren arabera. Metodo honen bidez, akatsen desagerpena edo gutxitzea lortu nahiko da eta baita arriskuen gestioko lehentasunak ezartzea ere. Lortutako emaitzak *XII. eta XIII. Tauletan* daude ikusgai, baliorik altuenak lortu dituzten arriskuak kaltegarrienak direlarik.

## 10.1. Arriskuen sailkapena eta kontingentzia plana

Master amaierako lan honetan arrisku nagusiak garapen praktikoan izan ditugu. Alde batetik, 3D inprimagailuarekin lotutakoak eta zelulen kultibo gelan gerta litezkeenak daude eta bestetik, pertsonalarentzat kaltegarriak izan daitezkeenak. Hona hemen, gerta litezkeen arriskuen zerrenda eta euren kontingentzia plana.

### 10.1.1. Arlo esperimentalari eragiten dioten arriskuak

Entseguen garapenean emaitzen lorpena kolokan jartzen duten zenbait arrisku daude. Hala, arrisku hauek soilik prozesu esperimentalean eta lortutako emaitzetan izango dute eragina. Hauek dira, entseguetan gerta daitezkeen ezuste nagusiak:

*XXII. Taula. Akats eta Ondorioen Análisi Modala arlo esperimentalerako.*

Arriskua	Probabilitatea/Eragina	Kontingentzia plana
3D-aren matxura arriskua	2/5	Hiru dimentsioko inpresioa egiteko beste teknika batzuk bilatzea
Puntak haustea	3/2	Biltegian erosita soberan izatea
Zelulen kutsatze arriskua	1/4	Beste zelula batzuk erosi beharko dira
Zelulak ez itsastea	2/4	Zelula motak eta materialak aldatzea
DSC edo TGA matxuratzea	1/1	Bibliografian entsegu hauetatik lortuko zen informazioa bilatzea



## 10.1.2. Pertsonalarentzat kaltegarriak diren arriskuak

**XXIII. Taula.** Akats eta Ondorioen Analisi Modala pertsonentzako arriskueterako.

Arriskua	Probabilitatea/Eragina	Kontingentzia plana
Erretzeko arriskua	3/2	Kartutxoari puntaren zonaldean estalki bat ezartzea
3D inprimagailuak eskua harrapatzea	2/4	3D-ari kutxa babeslea ezartzea
Kloroformoaren arriskua	1/4	Beste disolbatzaile batzuk erabiltzea
UV izpien arriskua	2/2	Izpi hauei zuzenean begiratzea
Laborategiko zenbait konposaturen ondoriozko arriskuak	2/2	Konposatu arriskutsuak arriskutsuak ez diren beste batzuegatik aldatzea

## 10.2. Arriskuen prebentzioa

### 10.2.1. Arlo esperimentalari eragiten dioten arriskuak

Alde batetik, arlo esperimentaleko arriskuak prebenitzeko 3D inprimagailua nahikoa makina sentikorra denez zaintza eta mantentze egokiak burutu beharko dira. Hau dela eta, zerbitzu teknikoak ere hor dago eskuragarri. DSC eta TGA makinaren hondatze arriskua prebenitzeko ere mantentze egokia funtsezkoa izango da. Bestalde, puntak haustea prebenitzeko derrigorrezkoa da inpresioaren hasieran edo punta aldatzen den bakoitzean makinaren kalibrazioa burutzea arrisku hau gutxitu nahi bada gutxienik.

Kultibo gelako kutsatze arriskua prebenitzeko berriz, prozesu bakoitza aurrera eramateko protokolo zehatzak ezarrita daude. Honez gain, biosegurtasun kabinan edo inkubagailuan sartzen den edozer alde aurretik etanolez garbitzen da bertan dauden bakteriak hiltzeko eta lanean hasi baino lehen eta gero etanolez garbitzen da kabina. Gainera, bainu epelari hilean behin Water Stabil (Julabo) izeneko likidoa gehitzen zaio bertan bakterien hazkuntza saihesteko. Hondakin likidoak beti, Virkon izeneko likidoarekin tratatzen dira eta zelulekin erabilitako hondakin solidoak tratamendu berezia burutzen zaie. Bestalde, gela honetan eskularruekin eta laborategiko bata jantzita egingo da beti lan. Azkenik, astean behin biosegurtasun kabina goitik behera garbituko da, hautsak kenduko dira eta lixibaz garbituko da lurra.

### 10.2.2. Pertsonalarentzat kaltegarriak diren arriskuak

Lehenik eta behin, erretze arriskua prebenitzeko tenperatura altuko kartutxoa beti beroa jasateko eskularruekin manipulatu beharko da. Bestetik, 3D inprimagailuari inguruan kutxa babesle garden bat ezarri zaio, honek leiho bat duelarik makinaren



buruak manipulatu ahal izateko eta eskuen harrapatze arriskua gutxitzeko. Kloroformoa toxikoa denez eta osasunean kalteak sor ditzakeenez, hauek prebenitzeko beti ke-kanpai baten barnean manipulatu da. Bestalde, proiektuan erabili diren UV izpiek begietan eragin ditzaketen arriskuak prebenitzeko biosegurtasun kabinak berak UV izpiez babesteko kristal egokia dauka eta mikroskopioa erabiltzean komeni da argi honi zuzenean ez begiratzea. Azkenik, proiektu honetan zehar erabili diren produktu arriskutsuek, hala nola, azidoek, kloroformoak etab, duten arriskua gutxitzeko beharrezkoa da material hauekin lanean ari garenean, eskularruak, betaurrekoak eta laborategiko bata erabiltzea.

## **11. ONDORIOAK ETA ETORKIZUNERAKO IKERKUNTZAK**

Amaitzeko, azken atal honetan, master amaierako lan honen, zati teoriko nahiz esperimental burutu ondoren, lortu diren ondorioak eta gaian ikertzen jarraitzeko etorkizuneko bideak adierazten dira.

Lehenik eta behin, ikusi da frogatu diren material guztietan mikrotxantiloiak **hiru dimentsiotako inprimagailuaren bidez fabrikatzean urtze modua disoluzio modua erabiltzea baino hobe dela**. Izan ere, urtze moduan lortzen diren mikrotxantiloiak zehatzagoak eta egonkorragoak dira.

Bestetik, argi geratu da material eta puntaren diametro bakoitzerako inpresio parametro ezberdinak erabili beharra dagoela eta beraz, **kasuan kasuko materialekin parametroen optimizazioa burutu beharko da** inprimatzen hasi baino lehen.

Geometriei dagokienean, bestalde, ondorioztatu da **erabilitako materialekin ezinezkoa dela irloteak egitea**, bai makinaren mugak eta bai materialen euren propietateak direla eta. Gainera, espero zenez makinaren softwarean ezarritako mikrotxantiloien geometrien neurrien eta neurri errealeen balioen artean aldea sumatu da. Hau gertatzen da, mikrotxantiloietan inpresioko lehen eta bigarren geruzak soilik inprimatzen direlako eta punta inpresio plataformarekin kontaktuan denean materiala zanpa dezakeelako. Hala, mikrotxantiloien **ekoizpen orotan funtsezkoa izango da neurri errealeen eta ezarritako neurrien arteko aldea kalkulatzeko alde aurretik**.

Zelulen entseguei begiratuta berriz, bi ideia nagusi lortu dira. Batetik, **proteina fluoreszentea bai PLLA-Dopa-zko eta bai silikonazko mikrotxantiloien gainean ezartzean** material osoan era berean itsatsi da eta beraz, **ezinezkoa izan da beronen kokapen selektiboa lortzea**. Bestetik, zelulen entseguetan zelulen kokapen selektiboa eta direkzionamendua lortu nahi izan dira. Dena den, PVDF gainean inprimatutako PLLA-Dopa-zko mikrotxantiloietan ez da lortu zelulak nahi zen lekuan soilik izatea. Izan ere, zelulak ezberdintzerik egin gabe gainazal osoan ezarri dira eta beraz, gure helburu nagusia ez da bete. Aldiz, dopaminaz estalitako **PLLA film gainean silikona**



**inprimatzean** eta zelulak bertan ezartzean lortu da zelulak soilik nahi zen lekuan, hau da, *film*-aren gainean izatea. Hala, **zelulen kokapen selektiboa eta direkzionamendua lortu direnez** lan honen helburu nagusia beteta geratu da. Gainera, aipatzekoa da, zelulekin burututako entsegu hauetan guztietan materialaren gainean emaitzak behatzeko adina zelula izateko tanta bidez egin behar dela ereitea. Bestalde, kasu guztietan, **zutabe artekatuen geometriak izan dira emaitzarik egokienak eman dituztenak**, sare geometrietan sareen hutsuneen tamaina txikia zela eta zelulei asko kostatzen baitzitzaien eurretan sartzan eta gainera, emaitzen behaketa asko zailtzen baitzen, mikrotxantiloien plano anitzeko izaera dela eta.

Beraz, aipatutakoak izan dira lan honetatik ateratako ondorioak eta etorkizuneko ikerketei dagokienez, frogatu ez diren beste zenbait material ezberdinen mikrotxantiloiak sortzea posible litzateke emaitza positiboak lortzeko. Gainera, zutabe artekatu, sare eta irlote geometriez gain forma ezberdinetako, ia nahi adinako konplexutasuna duten mikrotxantiloiak sor daitezke eta euren emaitzak behatu, zelulen morfologian honek eraginik duen ikusteko.

Bestetik, behin mikrotxantiloiak zenbait materialetan frogatu ostean, geometria optimoak definitzean eta mikrotxantiloietan zelulen kontrol handia dugunean, zelula-euskarriak ekoizten hasi gaitezke, hauek ehun-ingeniaritzaren oinarria direlarik eta etorkizun handia izango dutela uste delarik.



## 12. BIBLIOGRAFIA

- [1]: M. E. Furth, A. Atala, M. E. Van Dyke, *Biomaterials*, Vol **28** (2007) 5068–5073.
- [2]: V. M. Valdespino-Gómez, P. M. Valdespino-Castillo, V. E. Valdespino-Castillo, *Cir. Cir.* Vol **82** (2014) 578-589.
- [3]: G. P. Chate, N. R. Kale, V. Khobragade, C. Rahane, M. Calderón, S. S. Banerjee, J. J. Khandare, *Adv. Mater. Interfaces* (2018), 1701581.
- [4]: Polymat. (2018). <http://www.polymat.eu/es/groups/group-in-science-and-engineering-of-polymeric-biomaterials>.
- [5]: J. R. Gamboa, S. Mohandes, P. L. Tran, M. J. Slepian, J.-Y. Yoon, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Vol **104** (2013) 318– 325.
- [6]: C. Fabres, *Rev. Med. Clin. Condes*. Vol **21** (2010) 488 – 493.
- [7]: C. T. Laurencin, K.M. Ashe, N. Henry, H. M. Kan, K. W-H. Lo, *Drug Discov Today*, Vol **16** (2014) 794–800.
- [8]: C. T. Laurencin, L. S. Nair, *Regen. Eng. Transl. Med.* Vol **1** (2015). R. C. Cardós, *Médica Sur* Vol **7** (2000) 68-72.
- [9]: L. Wen-Wen, C. Zhen-Ling, J. Xing-Yu, *Chin J Anal Chem.* Vol **37** (2009), 943–949.
- [10]: W. K. Cho, B. Kong, H. J. Park, J. Kim, W. Chegal, J. S. Choi, I. S. Choi, *Biomaterials* Vol **31** (2010) 9565-9574.
- [11]: A. Larrañaga, J. M. Ugartemendia, J.-R. Sarasua, *EKAIA* Vol **25** (2012) 7-17.
- [12]: G. Li, X. Zhao, W. Zhao, L. Zhang, C. Wang, M. Jiang, X. Gu, Y. Yang, *Biomaterials* Vol **35** (2014) 8503-8513.
- [13]: M. J. Song, K. E. Uhrich, *Ann. Biomed. Eng.* Vol **35** (2007) 1812-1820.
- [14]: C.C. Blong, C.J. Jeon, J.Y. Yeo, E.A. Ye, J. Oh, J.M. Callahan, W.D. Law, S.K. Mallapragada, D.S. Sakaguchi, *J. Neurosci. Res.* Vol **88** (2010) 1445-1456.
- [15]: K. Itoga, J. Kobayashi, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials* Vol **27** (2006) 3005–3009.
- [16]: J.H. Lee, S.J. Lee, G. Khang, H.B. Lee, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* Vol **10** (1999) 283-294.
- [17]: H. J. Lee, D. N. Kim, S. Park, Y. Lee, W. Koh, *Acta Biomaterialia* Vol **7** (2011) 1281–1289.



- [18]: C. Yang, T. Liao, H. Shuai, T. Shen, J. A. Yeh, C. Cheng, *Biomaterials* Vol **33** (2012) 4988-4997.
- [19]: I. Elloumi-Hannachi, M. Maeda, M. Yamato, T. Okano, *Biomaterials* Vol **31** (2010) 8974-8979.
- [20]: S. F. Badylak, R. M. Nerem, *PNAS* Vol **107** (2010) 3285–3286.
- [21]: E.K. Cushnie, B.D. Ulery, S.J. Nelson, M. Deng, S. Sethuraman, S.B. Doty, K.W. Lo, Y.M. Khan, C.T. Laurencin, *PLoS One*. Vol **9** (2014).
- [22]: Q. Tang, C. Piard, J. Lin, K. Nan, T. Guo, J. Caccamese, J. Fisher, Y. Chen, *Biotechnology and Bioengineering* Vol **115** (2018) 257–265.
- [23]: M. T. Lam, W. C. Clem, S. Takayama, *Biomaterials* Vol **29** (2008) 1705-1712.
- [24]: F.L. Yap, Y. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics* Vol **22** (2007) 775–788.
- [25]: D. Falconnet, G. Csucs, H. M. Grandin, M. Textor, *Biomaterials* Vol **27** (2006) 3044–3063.
- [26]: P. S. Hale, P. Kappen, N. Brack, W. Prissanaroon, P. J. Pigram, J. Liesegang, *Applied Surface Science* Vol **252** (2006) 2217–2228.
- [27]: Y. Zhao, R. Truckenmuller, M. Levers, W.-S. Hua, J. Boer, B. Papenburg, *Materials Science and Engineering C* Vol **71** (2017) 558–564.
- [28]: L. Gagne, G. Rivera, G. Laroche, *Biomaterials* Vol **27** (2006) 5430–5439.
- [29]: W. M. Choi, O. O. Park, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* Vol **277** (2006) 131–135.
- [30]: C. Rodriguez-Emmenegger, C. M. Preuss, B. Yameen, O. Pop-Georgievski, M. Bachmann, J. O. Mueller, M. Bruns, A. S. Goldmann, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Adv. Mater.* Vol **25** (2013) 6123–6127.
- [31]: J. M. Karp, Y. Yeo, W. Geng, C. Cannizarro, K. Yan, D. S. Kohane, G. Vunjak-Novakovic, R. S. Langer, M. Radisic, *Biomaterials* Vol **27** (2006) 4755–4764.
- [32]: F. Yu, P. Li, H. Shenc, S. Mathur, C.-M. Lehr, U. Bakowsky, F. Mucklich, *Biomaterials* Vol **26** (2005) 2307–2312.
- [33]: C.-W. Yeh, L.-W. Wang, H.-C. Wu, Y.-K. Hsieh, J. Wang, M.-H. Chen, T.-W. Wang, *Biofabrication* Vol **9** (2017).
- [34]: B. J. Papenburg, L. Vogelaar, L. A.M. Bolhuis-Versteeg, R. G.H. Lammertink, D. Stamatialis, M. Wessling, *Biomaterials* Vol **28** (2007) 1998–2009.



- [35]: B. Stevens, Y. Yang, A. Mohandas, B. Stucker, K. T. Nguyen, Wiley Periodicals Inc. (2007) 573-582.
- [36]: M. A. Mendoza, M. Izadifar, X. Chen, J. Funct. Biomater. Vol **8** (2017) 48-61.
- [37]: A. Balogová, O. Pindroch, S. Bodnárová, J. Feranc, R. Hudák, J. Živčák, Lekar a technika – Clinician and Technology Vol. **47** (2017) 88–95.
- [38]: Envisiontec. (2018). <https://envisiontec.com/3d-printers/3d-bioplotted/developer-series/>
- [39]: S. V. Mehendale, L. F. Mellor, M. A. Taylor, E. G. Lobo, R. A. Shirwaiker, Rapid Prototyping Journal Vol **23** (2017) 534-542.
- [40]: V. L. Tsang, S. N. Bhatia, Advanced Drug Delivery Reviews Vol **56** (2004) 1635–1647.
- [41]: Y. Liu, K. Ai, L. Lu, Chem. Rev. Vol. **114** (2014) 5057–5115.
- [42]: K. Lhoste, Thesis Université René Descartes - Paris V (2012).
- [43]: J. Plott, A. Shih, Additive Manufacturing Vol. **17** (2017) 1-14.
- [44]: Ra. Rahbari, T. Sheahan, V. Modes, P. Collier, C. Macfarlane, R. M. Badge, Biotechniques Vol. **46** (2009) 277–284.
- [45]: N. Sadaba, M. Salsamendi, N. Casado, E. Zuza, J. Muñoz, J.-R. Sarasua, D. Mecerreyes, D. Mantione, C. Detrembleur, H. Sardon, Polymers Vol **10** (2018) 155.
- [46]: Y. Wang, W. Cheng Lee, K. Kumar Manga, P. Kailian Ang, J. Lu, Y. Peng Liu, C. Teck Lim, K. Ping Loh, Adv. Mater. Vol **24** (2012), 4285–4290.



# ***ERANSKINAK***

---

## ***Eranskina I***





## Eranskina I: Kalkuluak eta planoak

### I.1. Kalkuluak

Honako kalkulu hauek egin dira entsegu bakoitzean, laginetan nahi den dentsitate zelularra lortzeko zenbat ingurune eta lehendik dugun zenbat disoluzio zelular gehitu behar den kalkulatzeko.

#### a) Bigarren entsegua

Datuak:

-Lagin kopurua= 16

-Lagineko zelula kopurua=10000 zelula

-Lagineko disoluzio kopurua= 0.5 ml

$$16 \text{ lagin} \times \frac{10000 \text{ zelula}}{1 \text{ lagin}} = 160000 \text{ zelula}$$

$$16 \text{ lagin} \times \frac{0.5 \text{ ml}}{1 \text{ lagin}} = 8 \text{ ml}$$

$$\text{Dentsitate zelularra gehituko den disoluzioan} = \frac{160000 \text{ zelula}}{8 \text{ ml}} = 20000 \text{ zelula/ml}$$

Ziur egoteko gehituko den disoluzioaren 10 ml prestatuko dira eta beraz, denera 200000 zelula izango dira.

Aurretik dugun disoluzio zelularreko zelula kopuruaren kontaketa Newbauerren kamerarekin egin da:

$$\frac{139 \text{ zelula zenbatu}}{4 \text{ karratu}} \times 2 \times 10000 = 695000 \frac{\text{zelula}}{\text{ml}} \text{ dugun disoluzio} \rightarrow 6950000 \text{ zelula denera.}$$

$$200000 \text{ zelula} \times \frac{1 \text{ ml}}{695000 \text{ zelula}} = 0.29 \text{ ml dugun disoluzio gehitzeko}$$

$$10 \text{ ml} - 0.29 \text{ ml} = 9.7 \text{ ml ingurune gehitzeko}$$

#### b) Hirugarren entsegua

Datuak:

-Lagin kopurua= 8

-Lagineko zelula kopurua= 5000 zelula

-Lagineko disoluzio kopurua= 0.25  $\mu$ l

$$8 \text{ lagin} \times \frac{5000 \text{ zelula}}{1 \text{ lagin}} = 40000 \text{ zelula}$$



$$8 \text{ lagin} \times \frac{0.25 \mu\text{l}}{1 \text{ lagin}} = 200 \mu\text{l}$$

$$\text{Dentsitate zelularra disoluzioan} = \frac{40000 \text{ zelula}}{200 \mu\text{l}} = 200000 \text{ zelula/ml}$$

Gehituko den disoluzioaren 1 ml prestatuko dira eta beraz denera 200000 zelula izango dira.

Disoluzio zelularreko zelula kopuruaren kontaketa Newbauerren kamerarekin egin da:

$$\frac{91 \text{ zelula zenbatu}}{4 \text{ karratu}} \times 2 \times 10000 = 455000 \text{ zelula/ml}$$

$$200000 \text{ zelula} \times \frac{1 \text{ ml}}{455000 \text{ zelula}} = 0.44 \text{ ml dugun disoluzio gehitzeko}$$

$$1 \text{ ml} - 0.44 \text{ ml} = 0.55 \text{ ml ingurune gehitzeko}$$

### c) Bosgarren entsegua

Datuak:

-Lagin kopurua= 4

-Lagineko zelula kopurua= 5000 zelula

-Lagineko disoluzio kopurua= 0.25  $\mu\text{l}$

$$4 \text{ lagin} \times \frac{5000 \text{ zelula}}{1 \text{ lagin}} = 20000 \text{ zelula}$$

$$4 \text{ lagin} \times \frac{0.25 \mu\text{l}}{1 \text{ lagin}} = 100 \mu\text{l}$$

$$\text{Dentsitate zelularra disoluzioan} = \frac{20000 \text{ zelula}}{100 \mu\text{l}} = 200000 \text{ zelula/ml}$$

Gehituko den disoluzioaren 1 ml prestatuko dira eta beraz denera 200000 zelula izango dira.

Disoluzio zelularreko zelula kopuruaren kontaketa Newbauerren kamerarekin egin da:

$$\frac{104 \text{ zelula zenbatu}}{4 \text{ karratu}} \times 2 \times 10000 = 520000 \text{ zelula/ml}$$

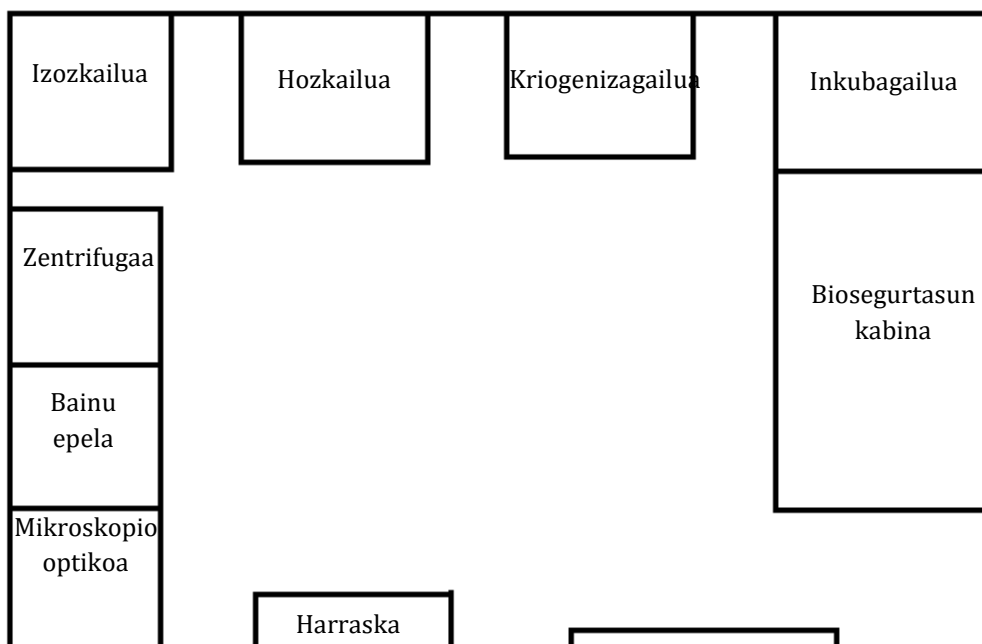
$$200000 \text{ zelula} \times \frac{1 \text{ ml}}{455000 \text{ zelula}} = 0.38 \text{ ml dugun disoluzio gehitzeko}$$

$$1 \text{ ml} - 0.38 \text{ ml} = 0.62 \text{ ml ingurune gehitzeko}$$

## I.2. Planoak



*18.Irudia. 3D- Biploterraren planoak [38].*



*19.Irudia. Kultibo gelaren plano.*