



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Bizkarrezur-muina birsortzeko
mikroingurune moldagarria**

*Ane García García, Unai Silván,
José Luis Vilas-Vilela,
Senentxu Lanceros-Mendez eta
Leyre Pérez Álvarez*

211-217 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.05.26>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Bizkarrezur-muina birsortzeko mikroingurune moldagarria

Ane García García^{1,2}, Unai Silván^{2,3}, José Luis Vilas-Vilela¹, Senentxu Lanceros-Mendez²,
Leyre Perez Álvarez^{1,2}

¹Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Fisikoa Saila, ZTF/FCT, UPV/EHU,

²Basque Center for Materials, Applications and Nanostructures, Bizkaiko Zientzia eta
Teknologia Parkea, ³IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Leioa

ane.garcia@bcmaterials.net

Laburpena

Bizkarrezur-muineko lesio traumatikoa eragin sozioekonomiko handia duen egoera neurologikoa da, eta kalte egiten dio eragindako pertsonen bizitza sozialaren, lanaren eta psikologikoaren kalitateari. Tamalez, gaur egun ez dago lesioa behin betiko sendatzeko estrategia eraginkorrik. Lan honetan, bizkarrezur-muineko lesiorako dinamikoki egokitzea den gelatinaz egindako hidrogel bat diseinatzea proposatu da. Bertan, degradazio programatua duten gelatinaz osatutako hidrogel ezberdinak sintetizatu eta karakterizatuko dira. Ondoren, proposatutako hidrogelen propietateak balidatuko dira.

Hitz gakoak: bizkarrezur-muineko lesioa, hidrogela, degradazioa

Abstract

Traumatic spinal cord injury is a neurological condition with a significant socioeconomic impact that affects the quality of life of affected individuals in social, occupational, and psychological aspects. Unfortunately, there is currently no effective recovery strategy for the injury. However, they still face challenges such as high costs and low survival rates after transplantation. In this study, we propose the design of a dynamically adaptive gelatin-based hydrogel for spinal cord injury treatment. Different gelatin-based hydrogels with programmed degradation will be synthesized and characterized. Finally, the proposed hydrogels' properties will be validated.

Keywords: spinal cord injury, hydrogel, degradation

1. Sarrera eta motibazioa

Tamalez, gaur egun ez dago bizkarrezur-muinaren lesioa behin betiko sendatzeko estrategia eraginkorrik. Azken hamarkadan, hainbat iturritako zelula ama mesenkimalak (MSC) proposatu dira lesio honen tratamendurako tresna terapeutiko potentzial gisa. Hala ere, 1.000 saiakuntza kliniko baino gehiago egin diren arren, MSCen erabilera medikoa soilik gaixotasun kopuru mugatu baterako eta herrialde kopuru txiki baterako onartu da. Nerbio-ehun horren birsorkuntza bereziki konplexua da, izan ere, lesio primarioa gertatu eta gutxira, glia-orbaina deritzona eratzen da. Prozesu sekundario horretan, astrozito egoiliarak aktibatzen dira eta matrize estrazelularreko molekulak metatzen dira, besteak beste, kondroitina eta keratan sulfato proteoglikanoak nerbio-birsorkuntzaren inhibitzaile indartsuak (Pinho et al., 2022). Beraz, bizkarrezur-muina konpontzeko edozein estrategiak lehenik glia-orbainaren ingurune inhibitzailea gainditu behar du, eta, ondoren, lesio-kabitatearen barruan bide eroale bat eskaini behar du, kaltearen bi aldeetan dauden neuronak luzatu eta haustura itxi dadila.

Ehun-ingeniaritzan, euskarri-biomaterialak hainbat funtzio betetzen ditu, hala nola, gainazalei atxikimendu-sekuentziak eskaintzea hasierako ainguraketarako, zelulek babespean egon dezaten ingurune tridimentsional bat sortzea, haien sakabanaketa saihestuz, estimulu biofisikoak transmititzea tentsio mekanikoen eta seinale elektrikoen bidez, eta elikagaiak eta seinaleztapen-faktore kimikoak zelulen barnera bideratzea. Hidrogelez osatutako biomaterialek aukera paregabea dutela frogatu da, izan ere, lesioetan sortzen den kabitate zelularrik gabe bete dezakete. Horrez gain, farmazia prestakin espezifikoak ehun jakinetan askatzeko erabil daitezke (Führmann et al., 2017; Ghane et al., 2020), eta mikroingurune elektro- eta magnetoelektrokoak sortzeko aukera ematen dute (Hermenegildo et al., 2019), zelulen estimulu elektro-aktiboa sustatuz eta farmakoen askapenerako sistemak aktibatu eta modulatzeko (Barbosa et al., 2016). Hidrogeletan konposizioa eta gurutzatze-maila kontrolatuz, degradazioaren zinetika eta biokimikoki aktiboak diren hainbat substantzien askapena eta horien erantzun mekanikoa modulatu daitezke.

Gainera, ehunen birsorkuntza eragiteko beharrezkoa den ingurune artifizial hori biomaterial iragankorra izan behar da. Biomaterialak degradatu eta birxurgatu egin behar dira, ehun berria sortzen den heinean. Materialaren degradazioak mikroingurunearen propietateen bilakaera jarraitua dakar, eta degradazio-abiadura ehunaren eta gorputzaren kokalekuaren arabera egokitu behar da. Material homogeneo baten degradazioa nekez egokitu daiteke ehun zehatz baten birsorkuntzara.

Horren harira, proiektuaren helburu nagusia geruza anitzeko biomaterial konplexu bat diseinatzea da, geruza bakoitzak degradazio-abiadura desberdina izan dezan, eraikineko osagai bakoitza ehunen hazkundearen eskakizunetara egokitu dadin.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa-lan honen helburu nagusia bizkarrezur-muinaren birsorkuntza-prozesuaren dinamikara egokitzeko gai den hidrogel batez osatutako aldamio dinamiko eta moldakor bat garatzea da.

Lan honetan, bereziki, degradazio espazial eta tenporal espezifikoak duten hidrogelen garapenean zentratu gara, 2 egunetik 30 egunera bitarteko iraupena izango dutenak. Hidrogel hauek substratu, betegarri eta inplante gisa erabili dira, medikuntza birsortzaile pertsonalizatuaren forma berrietan aplikatzeko asmotan.

3. Ikerketaren muina

Lehenengo, gelatina metakrilatoaren (GelMA) sintesia eta karakterizazioa aurkeztu dira. Ondoren, kontzentrazio eta metakrilazio gradu ezberdineko GelMAz osatutako hidrogelak sintetizatu dira. Azkenik, proposatutako hidrogelen erreologia eta degradazioa aztertuko dira, hurrengo pausuetarako haien portaera ulertzeko asmoz.

3.1 Gelatinaren metakrilazioa

Metakrilazio-gradu desberdineko GelMAk sintetizatu dira. Lehenengo, A sintesirako % 10 (p/b) gelatina PBSan disolbatu da 50 °C-tan. Ondoren, anhidrido metakrilikoa (2 ml) gehitzen zaio disoluzioari, eta irabiatzen uzten da 3 h-z. Jarraian, PBS 250 ml gaineratzen dira. Azkenik, lortutako produktua (12-14 kDa-ko mintzak) 40 °C-tan dagoen ur destilatuaren aurka dializatzen da 5 egunez, eta -50 °C-ra eta 0,1 mBar-era liofilizatzen da 48 orduz. Prozedura berdina erabili da B, C eta D sintesietan, anhidrido metakrilikoaren bolumena aldatuz, hain zuzen 10, 20 eta 50 ml erabiliz, hurrenez hurren.

3.3 Hidrogel fotoelkargurutzatuen sintesia

Hidrogel fotoelkargurutzatuen sintesirako, aurretik prestatutako B sintesiko GelMA PBSn disolbatu da hainbat kontzentrazioetan (% 4, % 8, % 10 eta % 20 p/b). Jarraian, disoluzio bakoitzari LAP fotoiniziatzailearen disoluzioa (% 0,1 p/p) eta polietilenglikol diakrilatoa (PEGDA) elkargurutzatzailea gehitu zaizkio. Azkenik, hidrogelak *in situ* fotopolimerizatu dira LEDen UM argipean (405 nm, 5 mW/cm²) 30 segundoz. Prozedura berdina erabili da A, C eta D hidrogelen sintesirako, bakoitzeko soilik % 4 disoluzioa prestatuz.

1. taula. Lortutako hidrogelen konposizioa.

Sintesia/Lagina	Kontzentrazioa (%)	Metakrilazio gradua (MG, %)
A	4	10
B	4	

B	8	32
B	10	
B	20	
C	4	35
D	4	41

Behin hidrogelak sortuta, hauen propietateak karakterizazio-teknika desberdinen bitartez aztertu dira: erresonantzia magnetiko nuklearra (EMN), degradazioa eta erreologia. Lehenik eta behin, lortutako gelatina metakrilatuaren egitura kimikoa eta lortutako metakrilazio graduak aztertzeko asmoz, EMN erabili zen. Horretarako, Bruker Avance 500 MHz-ko espektrometroa erabili zen eta GelMA laginak 20 mg/mL-ko kontzentrazioan karakterizatu ziren 45°C-tan. Metakrilazio gradua determinatzeko asmoz, barne estandarraren metodoa erabili zen 3-(trimetilsilil)-1-azido propanesulfonikoko sodio gatz (TSP) erabiliz. TSP seinalea 0 ppm-tan agertzen da eta 9 protoiri dagokio (H_{TSP}). Gelatina-deribatuen metakrilazio gradua kalkulatzeko 1. ekuazioa erabili zen non desplazamendu kimiko handiena (5,6 ppm) duen gailurraren integrala bakarrik erabili zen, protoi (H_M) bati dagokiona (Claaßen et al., 2018).

$$MG\ GelM\ (\%) = \frac{9}{TSP} \frac{(TSP) [mmol]}{(la\ ina)[\]} \quad (1)$$

Lortutako materialen azterketa erreologikoak ebaluatzeko, neurketa guztiak TR-Instruments HR20-erreometro batean egin dira, 20 mm-ko xafla paraleloak erabiliz 25°C-tan. Laginen propietate erreologikoak aztertu ziren maiztasuna 0,01etik 500 rad/s-ra aldatuz, deformazioa % leian mantenduz.

Azkenik, laginen degradazioa aztertzeko asmoz, hidrogelak fosfato tanpoi gatz-disoluzioan murgildu ziren pH = 7,4 eta 37°C-tan. Denboran zehar izandako masa-galerak 2. ekuazioa erabiliz kalkulatu ziren, non P_0 hidrogelen hasierako pisua den eta P_t d_∞-an.

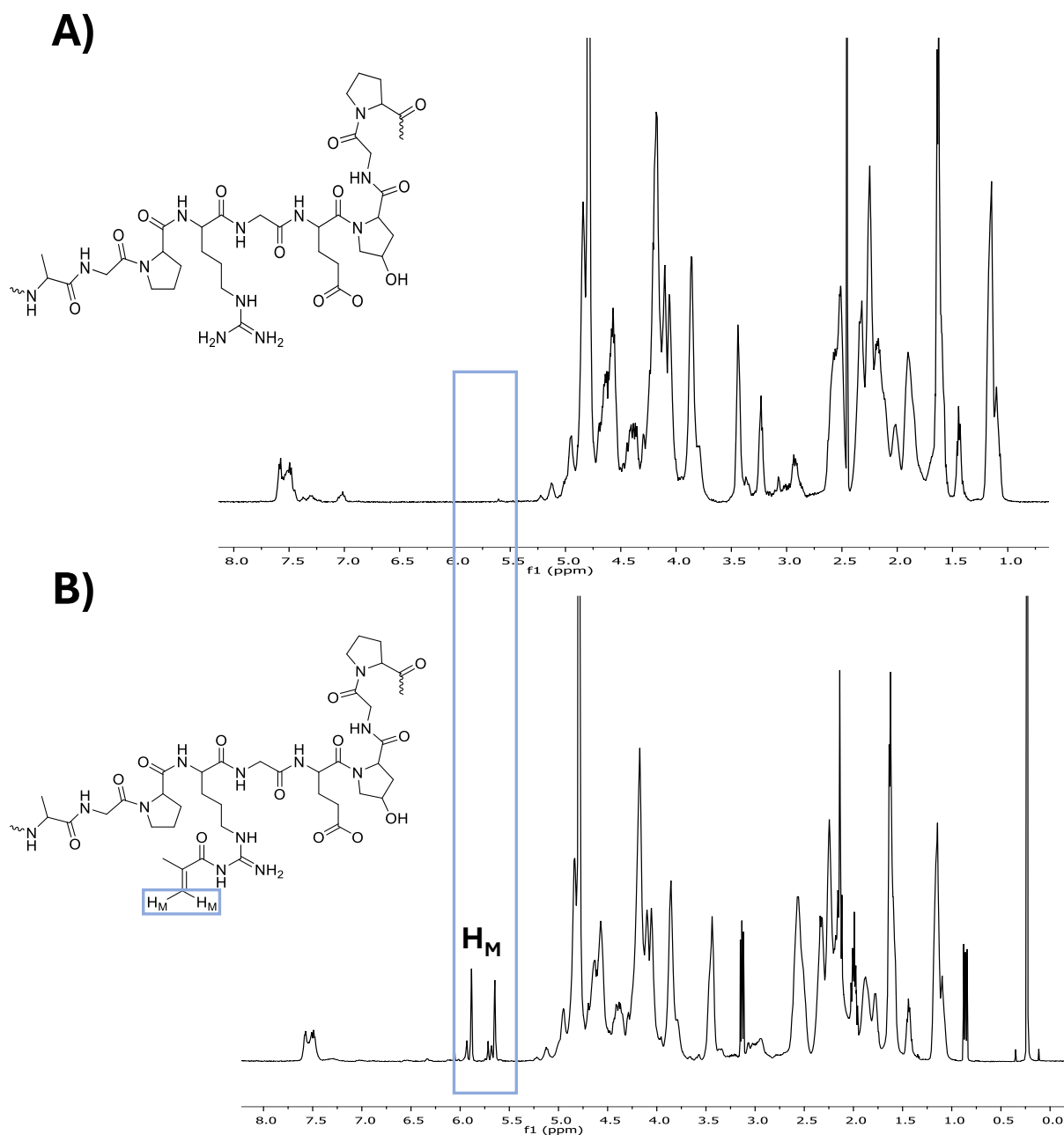
$$as\ al\ ra\ (\%) = \frac{0 -}{\quad} \quad 100 \quad (2)$$

3.4 Emaitzak

3.4.1 Erresonantzia magnetiko nuklearreko espektroskopia (EMN)

Erresonantzia magnetiko nuklearra polimeroaren eraldaketa arrakastaz eman dela baieztatzeko eta metakrilazio gradua zehazteko erabili zen. 1. irudian, gelatina eta gelatina metakrilatoaren ¹H-EMN espektroak erakutsi dira, polimeroaren metakrilazio egokia berretsiz. Izan ere, 5,6 eta 4,7 ppm (H_M) artean metakrilato taldeei dagozkien gailurrak baitaude.

1. irudia. A) Gelatina eta B) gelatina metakrilatuaren ^1H -EMN espektroak 45°C -tan.

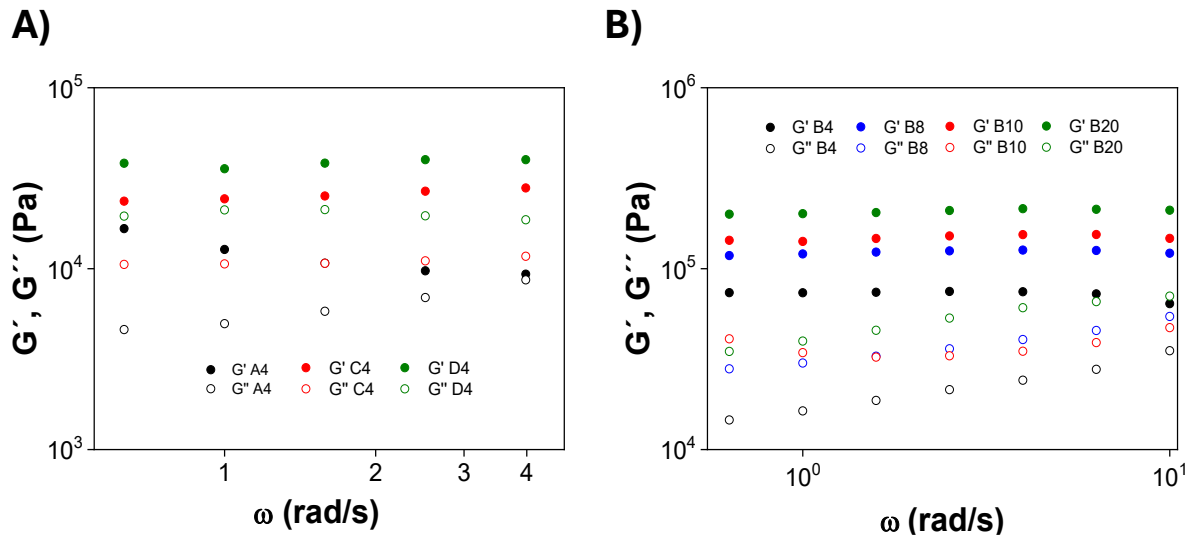


Desplazamendu kimiko handiena duen seinaleak gelatina deribatuaren metakrilazio gradua adierazten du. Desplazamendu txikiena duen seinalea, berriz, ez da kuantifikazioetarako erabili, metakrilamida taldeen eta metakrilazioaren bidez eraldatutako hidroxiprolinaren nahasketa bat delako [(Claaßen et al., 2018)]. Gainerako seinaleak gelatina osatzen duten aminoazido ezberdinei dagozkie. Azkenik, lortutako metakrilazio graduak 1. taulan biltzen dira.

3.4.2 Hidrogelen azterketa erreologikoa

Sintetizatutako hidrogelen portaera mekanikoa eta estrukturala ulertzeko, materialaren azterketa erreologikoa egin zen. Esperimentu honetan, hidrogelen portaera biskoelastikoa ezaugarritu zen, elastikotasun modulua (G' , ●) eta likatasun modulua (G'' , ○) aztertuz ingurune tenperaturaren.

2. irudia. Gelatina metakrilatuaren hidrogelen elastikotasun modulua (G' , ●) eta likatasun modulua (G'' , ○) A) metakrilazio graduaren arabera, kontzentrazioa % 4 izanik, eta B) kontzentrazioaren arabera, metakrilazio gradua % 32 izanik.



Ezkerreko grafikoan ikus daitekeen bezala (2. irudia A), kontzentrazio guztietan elastikotasun modulua (G') likatasun modulua (G'') baino altuagoa da, beraz, materialek solido biskoelastikoen portaera erakusten dute. Gainera, kontzentrazioa handitu ahala, elastikotasun modulua handitzen dela ikus daiteke. Emaita horrek gelatinaren kontzentrazioa handitzean propietateak hobetzen direla adierazten du, hidrogel erresistenteagoak eta elastikoagoak lortuz. Hala ere, portaera horrek, egingo diren 3D inprimaketak zaildu ditzake.

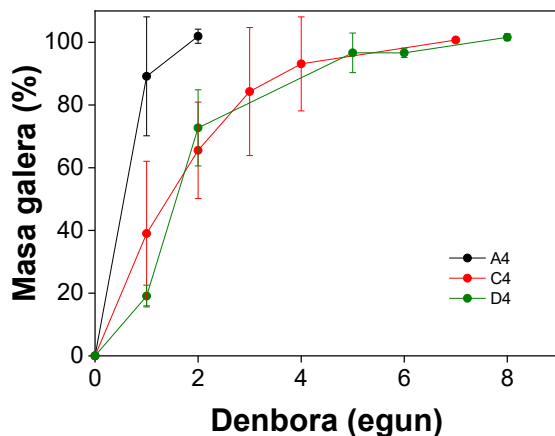
Eskuineko grafikoan (2. irudia B) berriz ere hidrogel guztiek portaera solidoa ($G' > G''$) erakusten dute. Kasu honetan, kontzentrazio berdinak ditugu baina metakrilazio gradua handitu ahala, elastikotasun modulu handiagoak lortzen direla behatu da. Igoera hori, bi kasuetan, gurutzamendua areagotzearen ondorioa da, hau da, kontzentrazioa baita metakrilazio gradua handitzerakoan, gurutzaketa handiagoa lortzen da, eta beraz, portaera elastiko handiagoa.

3.4.3 Hidrogelen degradazioa

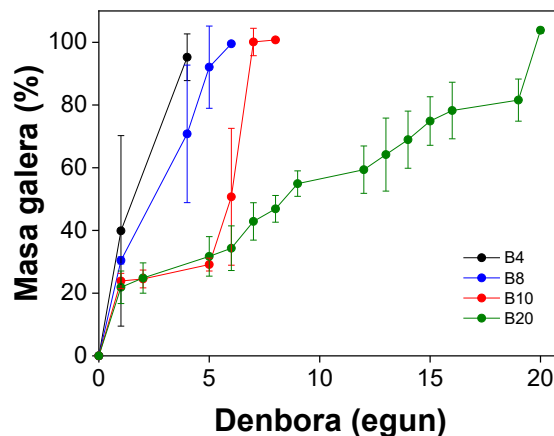
Lan honetan zehar aipatu den bezala, helburu garrantzitsuenetariko bat degradazio ezberdineko hidrogelak lortzea da. Helburu hori lortzeko, kontzentrazioekin eta metakrilazio graduekin jolastuda, eta honako emaitza hauek lortu dira.

3. irudia. Gelatina metakrilatuaren hidrogelen degradazioa denboran zehar A) metakrilazio graduaren arabera, kontzentrazioa % 4 izanik, eta B) kontzentrazioaren arabera, metakrilazio gradua % 32 izanik.

A)



B)



3. irudian (A) ikus daitekeen moduan, B sintetiko lorturiko kontzentrazioekin degradazio abiadura ezberdineko lau hidrogelak lortu dira. Emaita honekin, kontzentrazioa degradazioarekin guztiz lotuta dagoela baieztatu da, hau da, zenbat eta kontzentrazio handiagoa izan, degradazio-denbora luzeagoa lortu da. Hori hidrogel bakoitzaren gurutzatze-mailagatik gertatzen da, hau da, gurutzatze-maila handitzen den heinean, kate polimerikoak lotuago daude, eta, beraz, nekez hausten eta degradatzen dira. Gauza bera gertatzen da 3. irudiarekin (B), non metakrilazio graduak gora egin ahala, degradazio-denborak gora egiten du, gurutzatze-mailak altuagoa izanik.

4. Ondorioak

Lan honetan kontzentrazioak eta metakrilazio graduak hidrogelen propietateetan duten eragina aztertu da. Lortutako emaitzak aztertuta, ondorioztatu daiteke metakrilazio-maila eta kontzentrazioa egokituz, propietate mekaniko ezberdinak eta degradazio-denbora desberdinak dituzten hidrogelak lor daitezkeela. Aurkikuntza horiei esker, hidrogelak aplikazio zehatzetara egokitu daitezke, hala nola ehunen ingeniariatzara edo farmakoen askapen kontrolatura, non propietate horiek funtzionaltasun optimoa bermatzeko funtsezkoak diren.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Lan honetan prestatutako nahasketen karakterizazio sakon bat egin da. Hala ere, argi dago oraindik lan asko dagoela egiteko. Lehenik eta behin, karakterizazio fisiko eta morfologikoaren azterketa gehiago egin daitezke hidrogelen egitura hobeto ulertzeko. Ondoren, hidrogelen inprimagarritasuna frogatu behar da, hau da, 3D inprimaketak egin behar dira parametro guztiak optimizatuz. Azkenik, aldamioren hidrogel desberdinen askapen-azterketa egingo da, eta, horrekin batera, zelulen biziraupenaren, proliferazioaren, morfologiaren eta diferentziazioaren efektuen analisia ere burutuko da, haien zیتotoxikotasuna eta biobateragarritasuna egiaztatzeko.

6. Erreferentziak

Barbosa, J., Correia, D. M., Gonçalves, R., Ribeiro, C., Botelho, G., Martins, P., & Lanceros-Mendez, S. (2016). Magnetically Controlled Drug Release System through Magnetomechanical Actuation. *Advanced Healthcare Materials*, 5(23), 3027–3034. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600591>

- Claaßen, C., Claaßen, M. H., Truffault, V., Sewald, L., Tovar, G. E. M., Borchers, K., & Southan, A. (2018). Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls. *Biomacromolecules*, 19(1), 42–52. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01221>
- Führmann, T., Anandakumaran, P. N., & Shoichet, M. S. (2017). Combinatorial Therapies After Spinal Cord Injury: How Can Biomaterials Help? In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 6, Issue 10). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601130>
- Ghane, N., Beigi, M. H., Labbaf, S., Nasr-Esfahani, M. H., & Kiani, A. (2020). Design of hydrogel-based scaffolds for the treatment of spinal cord injuries. In *Journal of Materials Chemistry B* (Vol. 8, Issue 47, pp. 10712–10738). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0tb01842b>
- Hermenegildo, B., Ribeiro, C., Pérez-Álvarez, L., Vilas, J. L., Learmonth, D. A., Sousa, R. A., Martins, P., & Lanceros-Méndez, S. (2019). Hydrogel-based magnetoelectric microenvironments for tissue stimulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 1041–1047. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.023>
- Pinho, A. G., Cibrão, J. R., Lima, R., Gomes, E. D., Serra, S. C., Lentilhas-Graça, J., Ribeiro, C., Lanceros-Mendez, S., Teixeira, F. G., Monteiro, S., Silva, N. A., & Salgado, A. J. (2022). Immunomodulatory and regenerative effects of the full and fractioned adipose tissue derived stem cells secretome in spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 351. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.113989>

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau (Grant No. PID2022-138572OB-C42) MCIN/AEI/10.13039/501100011033, FEDER-UE eta Eusko Jaurlaritzako Osasun Sailak (erref.2024333042) finantzatutako ikerketa proiektua da.