

Posada a punt d'un model d'angiogènesi *in vitro* per estudiar l'acció del Plasma Ric en Plaquetes (PRP) en la regeneració de teixits.

Nom de l'estudiant: Irene García Jiménez

Nom del tutor/a: Elisabet Sarri Plans

28/05/19

MEMÒRIA DEL TREBALL FINAL DE GRAU

Curs: 2018-2019

Pàgina d'agraïments

En primer lloc, m'agradaria agrair a la meva tutora la Dra. Elisabet Sarri el suport rebut durant tot el desenvolupament del TFG i per compartir amb mi els seus coneixements i a la Dra. Marta Otero, cap del grup de recerca TR2Lab, per donar-me l'oportunitat de formar part del seu grup i per la confiança depositada en mi.

També m'agradaria donar les gràcies al personal de laboratori de la Uvic-UCC, en especial a la Montserrat Masoliver i a la M^a Cristina Martín, per la predisposició que tenen sempre a ajudar.

I per últim a la meva família, per tot el suport al llarg del grau i en la redacció del TFG, perquè sense ells no hagués estat possible.

Resum / Resumen / Abstract

El PRP s'utilitza com a teràpia regenerativa perquè ajuda a millorar el procés de cicatrització de ferides cròniques de la pell a l'estimular l'angiogènesi, però hi ha alguns casos en els que no funciona. Per aquest motiu, es proposa establir un model d'angiogènesi *in vitro* – en una superfície coberta de gelatina en comptes de Matrigel – en el que poder testar el PRP de pacients amb ferides cròniques cutànies i verificar si funciona. Per fer-ho s'han realitzat assaigs d'angiogènesi amb la línia cel·lular HUVEC, on s'ha estimulat la formació d'estructures tubulars amb factors de creixement alliberats per plaquetes activades (WPr). S'ha observat que quan s'afegeix WPr al 75% en el medi, a les 4 h les cèl·lules s'han alineat i s'han organitzat en cercles formant una xarxa. És encara necessari optimitzar el model d'angiogènesi *in vitro* que hem posat a punt, però s'ha pogut comprovar que no cal tenir una cobertura de superfície en Matrigel per poder realitzar assaigs d'angiogènesi.

Paraules clau: PRP, ferides cròniques cutànies, assaigs d'angiogènesis, HUVEC

El PRP se utiliza como una terapia regenerativa porque ayuda a mejorar el proceso de cicatrización de heridas crónicas de la piel al estimular la angiogénesis, aunque existen casos en los cuales no funciona. Por este motivo, se propone establecer un modelo de angiogénesis *in vitro* – en una superfície cubiert de gelatina en lugar de Matrigel – en el que se pueda testar el PRP de pacientes con heridas crónicas cutáneas y verificar si funciona. Para llevarlo a cabo se han realizado ensayos de angiogénesis con la línea celular HUVEC, donde se ha estimulado la formación de estructuras tubulares con factores de crecimiento liberados por plaquetas activadas (WPr). Se ha observado que cuando se añade WPr al 75% en el medio, a las 4 h las células se han alineado y organizado en círculos formando una red. Aún es necesario optimizar el modelo de angiogénesis *in vitro* que hemos puesto en marcha, aunque se ha podido comprobar que no es necesario disponer de una cobertura de superficie en Matrigel para poder realizar modelos de angiogénesis.

Palabras clave: PRP, heridas crónicas cutáneas, ensayos de angiogénesis, HUVEC

PRP is used as a regenerative therapy as it helps to improve the healing process of chronic skin wounds by stimulating the angiogenesis, although there are cases in which it does not work. For this reason, it is proposed to establish an angiogenesis model *in vitro* – on a surface covered with gelatine instead of Matrigel – in which the PRP of patients with chronic cutaneous wounds can be tested and to verify if it works. Angiogenesis assays have been performed using HUVEC cell line, in which the formation of tubule structures has been stimulated with the use of growth factors released by activated platelets (WPr). It has been seen that 4 h after adding 75% of WPr to the medium, the cells have been able to align and organise in circles forming a net. Even it is still necessary to optimize the angiogenesis model *in vitro* that we have established, it has been verified that it is not necessary to cover the culture surface with Matrigel in order to run an angiogenesis assay.

Keywords: PRP, cutaneous chronic wounds, angiogenesis assay, HUVEC

Índex

Pàgina d'agraïments	2
Resum / Resumen / Abstract	3
1. Introducció	7
1.1. La pell	7
1.1.1. Estructura de la pell	7
1.1.1.1. L'epidermis	7
1.1.1.2. La dermis	8
1.1.1.3. L'hipodermis	10
1.1.2. Envel·liment de la pell	10
1.2. Les ferides	11
1.2.1. Cicatrització normal d'una ferida	11
1.2.1.1. Hemostàsia	11
1.2.1.2. Fase inflamatòria	12
1.2.1.3. Fase de proliferació	13
1.2.1.4. Fase de remodelació	14
1.2.1.5. Rol dels factors de creixement en la reparació tissular	15
1.2.2. Complicacions de la reparació d'una ferida degudes a l'envelliment	16
1.3. Vasos sanguinis de la pell	17
1.3.1. Generació de vasos sanguinis	18
1.3.2. Endoteli	18
1.3.3. La sang	19
1.4. Angiogènesi	20
1.4.1. Tipus d'angiogènesi	20
1.4.1.1. Sprouting angiogenesis	20
1.4.1.2. Intussusceptive angiogenesis	21
1.5. Ferides Cròniques	22
1.5.1. Tractament de ferides cròniques amb PRP	22
1.5.2. Procés d'angiogènesis en la reparació de ferides o regeneració tissular	23
1.6. Models in vitro per a l'estudi de la regeneració de la pell	23
1.6.1. Cultiu de cèl·lules endotelials i models d'angiogènesi in vitro	24
1.6.2. Assaigs de proliferació	24
1.6.3. Assaigs de migració	25

1.6.4.	Assaigs de formació d'estructures tubulars.....	25
2.	Hipòtesis i Objectius	27
3.	Metodologia	28
3.1.	Caracterització de les cèl·lules endotelials	28
3.1.1.	Anàlisi dels descriptors morfològics	28
3.1.2.	Determinació de la taxa de proliferació	29
3.1.3.	Determinació de la capacitat de cobertura de superfície en un model de reparació de ferida.....	29
3.1.4.	Determinació de la secreció de matriu extracel·lular	29
3.2.	Obtenció de PRP.....	29
3.2.1.	Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang humana.....	29
3.2.2.	Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang de porc.....	30
3.2.3.	Preparació de PRPr: Plasma ric en plaquetes amb factors de creixement alliberats per plaquetes	30
3.2.4.	Preparació de WPr: factors de creixement alliberats per plaquetes en una solució tampó	30
3.3.	Estimulació de la formació d'estructures tubulars	30
3.3.1.	Optimització del temps sense sèrum	30
3.3.2.	Optimització del percentatge de PRP necessari per a la formació d'estructures tubulars	30
3.3.3.	Concentració proteica del PRP	31
4.	Resultats i Discussió	32
4.1.	Caracterització de les línies cel·lulars HUVEC i bEND3.....	32
4.1.1.	Anàlisi dels descriptors morfològics	32
4.1.2.	Determinació de la taxa de proliferació	33
4.1.3.	Determinació de la capacitat de cobertura de superfície en un model de reparació de ferida.....	35
4.1.4.	Secreció de la matriu extracel·lular en presència d'àcid ascòrbic	36
4.2.	Obtenció de PRP.....	38
4.2.1.	Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang humana.....	38
4.2.2.	Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang de porc.....	38
4.3.	Assaigs d'angiogènesi.....	39
4.3.1.	Optimització del temps sense sèrum	39
4.3.2.	Estimulació de la formació d'estructures tubulars amb PRPr a partir de sang de porc	40
4.3.3.	Controls	40

4.3.4.	Estimulació formació d'estructures tubulars amb la fracció WPr a partir de sang de porc	41
4.3.5.	Estimulació de la formació d'estructures tubulars amb la fracció WPr a partir de sang humana.....	42
4.3.6.	Concentració proteica del PRPr i PWr	45
5.	Conclusió.....	46
6.	Visió personal i perspectives de futur.....	47
7.	Bibliografia.....	48
7.	Annex de Protocols	50
7.1.	Ànlisi dels descriptors morfològics	50
7.2.	Determinació de la taxa de proliferació.....	51
7.3.	Determinació de la capacitat de cobertura de superfície en un mode de reparació de ferida	51
7.4.	Determinació de la secreció de matriu extracel·lular	52
7.4.1.	Immunofluorescència contra la laminina.....	52
7.4.2.	Composició de dues imatges amb l'ImageJ.....	53
7.5.	Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang humana	53
7.6.	Optimització d'obtenció de PRP amb sang de porc.....	54
7.7.	Preparació de PRPr: Plasma ric en plaquetes amb factors de creixement alliberats per plaquetes.....	54
7.8.	Preparació de WPr: factors de creixement alliberats per plaquetes en una solució tampó	55
7.9	Assaigs d'angiogènesi.....	55
7.9.1.	Optimització del temps sense sèrum	55
7.9.2.	Optimització del percentatge de PRP necessari per a la formació d'estructures tubulars.....	55
7.9.3.	Concentració proteica del PRP	56
7.9.4.	Preparació Tyrode's Buffer.....	56

1. Introducció

Aquest treball de Fi de Grau (TFG) ha estat realitzat dins del grup de recerca TR2Lab, un grup de recerca interdisciplinari i interinstitucional de la Universitat de Vic (UVic), que dirigeix la Dra. Marta Otero Viñas. El TR2Lab fa recerca en l'àmbit de la reparació i la regeneració tissular i té especial interès en les ferides cròniques cutànies. Treballa conjuntament amb la Unitat de Ferides Cròniques de l'Hospital Universitari de la Santa Creu (HUSC) de Vic per tractar aquestes ferides i millorar la qualitat de vida dels pacients. Per aquest motiu aquest treball està emmarcat en la regeneració de la pell

1.1. La pell

La pell és un òrgan complex que recobreix tota la superfície del cos. Proporciona una barrera física entre el cos i l'entorn que protegeix el cos de l'entrada de substàncies químiques i de microorganismes patògens, redueix la pèrdua d'aigua, regulació de la temperatura corporal i forma part del sistema immunitari.

1.1.1. Estructura de la pell

La pell està organitzada en 3 capes: l'epidermis, la dermis i la hipodermis (Figura 1). Aquestes regions difereixen entre elles en gruix, els components cel·lulars i moleculars i els annexos cutanis.

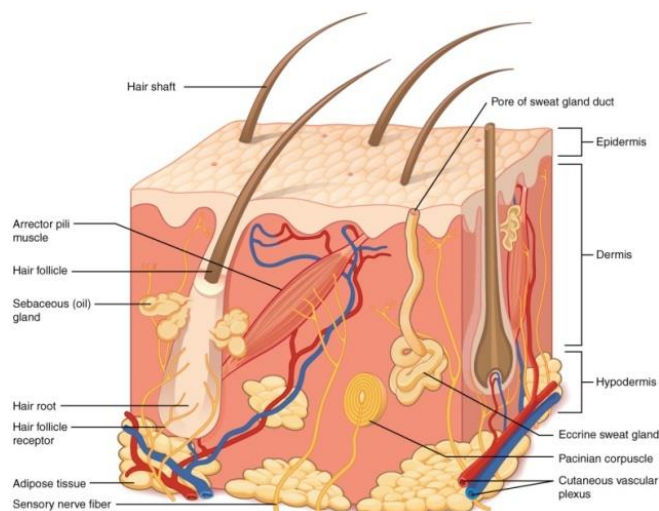


Figura 1. Esquema de l'estructuració de la pell. S'indiquen les 3 capes de la pell, les glàndules, els annexos cutanis, la vasculatura i l'enerveig present a la pell. Font: *Wikimedia Commons*

1.1.1.1. L'epidermis

L'epidermis és la capa més externa de la pell i està formada per teixit epitelial escamós estratificat i queratinitzat. El tipus cel·lular propi de l'epidermis són els queratinòcits (comprenen el 95% de l'epidermis) i produeixen la queratina, una proteïna que protegeix la pell i els teixits subjacents d'abrasions, calor, microbis i agents químics. Depenent de la morfologia i posició dels queratinòcits, se'n distingeixen 5 capes epidermiques:

- Stratum basale: és l'estrat més intern i està format per una capa de queratinòcits cuboïdals i algunes cèl·lules mare que donen lloc a nous queratinòcits. Són essencials per a la renovació epidèrmica.
- Stratum spinosum: format per 8-10 files de queratinòcits. Aquest estrat destaca perquè les unions cèl·lula-cèl·lula són molt fortes, conferint flexibilitat i força a la pell.
- Stratum granulosum: format per 3-5 files de queratinòcits plens de grànuls de queratina. Constitueix la transició entre els estrats metabòlicament actius i els que contenen cèl·lules mortes.
- Stratum lucidum: aquest estrat solament es troba en zones de pell gruixuda com les soles i en els palmells. Consisteix en 4-6 files de queratinòcits morts.
- Stratum corneum: és l'estrat més extern. Està format per 25-30 files de queratinòcits morts (Figura 2).

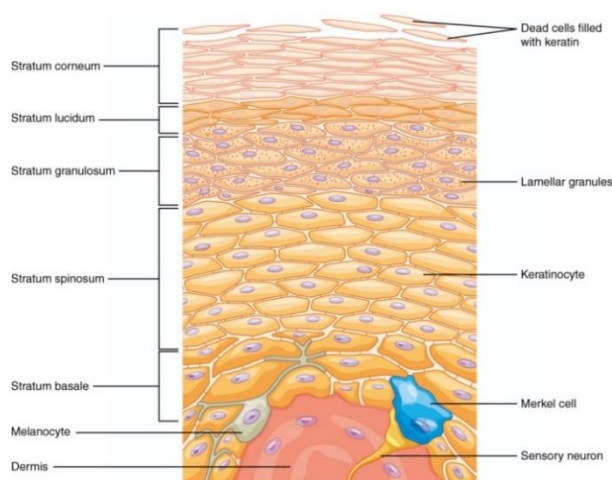


Figura 2. Esquema dels estrats de l'epidermis. S'indiquen els tipus cel·lulars presents a l'epidermis. *Font: Wikimedia Commons*

La pell es troba en renovació constant, es formen noves cèl·lules, migren lentament cap a la superfície i substitueixen les cèl·lules mortes.

Els altres tipus cel·lulars que es troben presents en l'epidermis són els melanòcits, unes cèl·lules productores de melanina, un pigment que protegeix la pell a l'absorbir les radiacions UV del Sol; les cèl·lules de Langerhans, un macròfag que resideixen a la pell; i les cèl·lules Merkel, que detecten les sensacions tàctils.

L'epidermis no conté vasos sanguinis (és avascular) i connecta els fol·licles pilosos i les glàndules sebàcies i sudorípares de la dermis amb l'exterior [1,2,3].

1.1.1.2. La dermis

La dermis és la regió que es troba sota de l'epidermis, és més gruixuda que aquesta i està composta per teixit connectiu. El teixit connectiu és un dels teixits més abundants i té nombroses funcions: s'uneix, fa de suport i dona força a altres teixits; protegeix i aïlla els òrgans interns; emmagatzema energia (teixit adipós) i és on es produeixen la majoria de respostes immunitàries. El teixit connectiu està format principalment per matriu extracel·lular (ECM) i cèl·lules (Figura 3A).

- La matriu extracel·lular és el material que es troba entre les cèl·lules. Cada tipus de teixit connectiu té unes propietats úniques en funció dels materials que componguin la matriu extracel·lular. L'ECM, al seu torn, està composta per substància fonamental i fibres:
 - La substància fonamental és el material que hi ha entre les cèl·lules i les fibres. En el cas de la dermis, la substància fonamental està composta principalment per aigua i molècules orgàniques com els proteoglicans i les glicoproteïnes. Els proteoglicans tenen l'habilitat de retenir molècules d'aigua, de manera que proporcionen una solució aquosa gelificada que permet la difusió de nutrients, la formació de vasos sanguinis i nervis, la migració cel·lular i manté l'ECM hidratada [4].
 - Les fibres de l'ECM tenen com a funció enfortir i donar suport al teixit connectiu. En la dermis el tipus de fibres més comunes són les fibres de col·lagen i les fibres elàstiques. Les fibres de col·lagen són molt fortes i resistents a la tracció, però al no ser rígides, permeten la flexibilitat del teixit. Les fibres elàstiques estan compostes per molècules d'elastina, una proteïna que confereix elasticitat al teixit connectiu.
- Cada tipus de teixit connectiu conté un tipus de cèl·lules del mesènquima que donen lloc a les cèl·lules pròpies que formen el teixit, com el fibroblasts, cèl·lules reticulars, musculars llises secretores, etc. En el cas de la dermis, aquestes cèl·lules immadures són els fibroblasts. Els fibroblasts són el tipus cel·lular més nombrosos de la dermis i s'encarreguen de sintetitzar l'ECM. També hi trobem alguns macròfags residents i adipòcits.

La dermis s'estructura en dues regions – la dermis papil·lar i la reticular – que es diferencien entre elles pel tipus de teixit connectiu que les compon. La dermis papil·lar es troba en contacte amb l'epidermis i està formada per teixit connectiu lax, és a dir, hi ha poques fibres i estan organitzades entre les cèl·lules; mentre que la dermis reticular està formada per teixit connectiu dens, que es caracteritza per contenir moltes més fibres, més gruixudes, fortament empaquetades i hi ha menys cèl·lules que a la dermis papil·lar (Figura 3B).

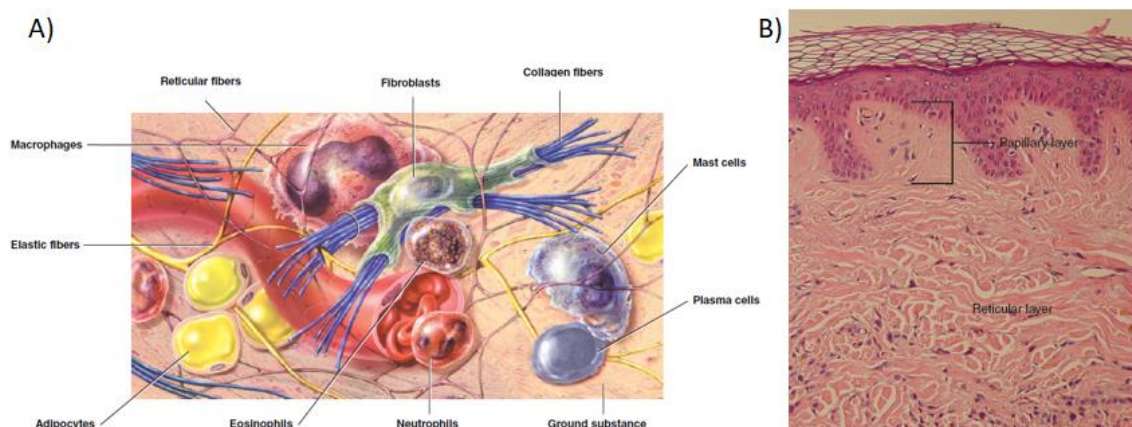


Figura 3. La dermis. A) Cèl·lules i fibres més representatives del teixit connectiu. Font: Figura 4.8. del llibre *Principles of Anatomy and Physiology (modificada)* [2]. B) Tall histològic de la pell on s'aprecia la diferència entre el teixit connectiu de la dermis papil·lar (lax) i el de la reticular (dens). Font: *Wikimedia Commons*

A diferència de l'epidermis, la dermis està altament vascularitzada (en detall a l'apartat 1.3.). També conté vasos limfàtics, terminacions nervioses i annexos cutanis. Els principals annexos cutanis de la pell són els fol·licles pilosos, les glàndules sebàcies i les sudoríferes i, s'originen a la dermis. Els fol·licles pilosos cobreixen tota la superfície del cos a excepció de les soles, els palmells i els llavis. Les glàndules sebàcies estan connectades a l'arrel dels fol·licles pilosos i secreten una substància anomenada seü que contribueix en la impermeabilització de la pell, manté la pell suau i manté el pH aproximadament a 5, fet que evita el creixement de certs bacteris. Les glàndules sudoríferes produeixen la suor i la seva funció principal és regular la temperatura corporal, mitjançant la seva evaporació, procés denominat com termoregulació [2,4].

La dermis és essencial per a la supervivència de l'epidermis. La xarxa de vasos sanguinis serveix com a font de nutrients i permet la proliferació de les cèl·lules de l'estrat basal. A més, la dermis papil·lar forma unes protuberàncies denominades papil·les dèrmiques que es projecten cap a l'epidermis i creen un vincle fort i necessari entre l'epidermis i la dermis, perquè aquesta regió està sotmesa a molt estrès mecànic (principalment de cisallament).

1.1.1.3. L'hipodermis

L'hipodermis és la regió més interna de la pell, es troba per sota de la dermis i per sobre del múscul, tendó o os subjacents. De vegades es considera que no forma part de la pell, sinó del teixit subcutani. Està format per teixit adipós que aïlla elèctricament i tèrmicament el cos; protegeix de l'exterior; i serveix com a emmagatzematge d'energia. També conté vasos sanguinis i terminacions nervioses sensibles a la pressió [1,2,3].

1.1.2. Envelliment de la pell

L'envelliment de la pell sol començar cap als 40 anys i comporta uns canvis que esdevenen en la pèrdua de la seva estructura i funcionalitat. Les alteracions que s'experimenten a cada capa i annexos cutanis de la pell es recullen a la Taula 1.

Epidermis	<ul style="list-style-type: none">• Atenuació de les papil·les dèrmiques. Comporta que la pell sigui més susceptible a les forces de cisallament. També comporta la reducció de l'àrea epidèrmica fent que hi hagi menys cèl·lules basals i queratinòcits i, comporta que la pell esdevingui més seca.• Reducció de la població de cèl·lules de Langerhans. Comporta una reducció de la resposta immunitària.• Reducció del nombre de melanòcits metabòlicament actius. Produeix un canvi en la pigmentació de la pell, aquesta sol ser desigual i apareixen taques fosques a la pell, anomenades taques de l'edat, a causa de l'augment en mida d'alguns melanòcits.• S'enrelenteix considerablement la migració de les cèl·lules epitelials des de la làmina basal fins a la superfície epidèrmica, fent que el recanvi de cèl·lules epidèrmiques i la descamació sigui menys efectiva.
Dermis	<ul style="list-style-type: none">• Reducció del nombre de fibres de col·lagen, perquè la taxa de degradació supera la de síntesi a causa de la reducció de la població de fibroblasts. A més, les fibres es trenquen i desorganitzen (estàn més separades i disperses). Això fa que la dermis esdevingui més prima i es redueixi la transferència de nutrients entre la dermis i l'epidermis.

	<ul style="list-style-type: none"> • La desorganització, l'atrofia i la degradació de les fibres elàstiques comporta que la pell sigui més laxa i apareguin arrugues. • La reducció de la concentració de proteoglicans comporta la disminució del contingut aquós de la pell i que la pell es torni més prima i més susceptible a arrugar-se. • La població de macròfags es redueix i la seva capacitat de fagocitosis és menys eficient, fet que la pell sigui més susceptible a infeccions.
Hipodermis	<ul style="list-style-type: none"> • Desapareix el teixit adipós subcutani i la pell esdevé més flàccida.
Glàndules	<ul style="list-style-type: none"> • Reducció del nombre de glàndules sudoríferes. Conduïx a la reducció la producció de suor i l'olor corporal i, dificulta el procés de termoregulació. • Reducció de la mida de les glàndules sebàcies i, consegüentment, de la producció de seü. Conduïx a que la pell esdevingui més seca.
Pèl	<ul style="list-style-type: none"> • Reducció de la densitat de pèl i del seu diàmetre. Juntament amb la reducció de melanòcits funcionals, el pèl esdevé gris.
Nervis	<ul style="list-style-type: none"> • Alteració i reducció de receptors sensorials, disminuint la percepció de la pressió i el dolor.
Vasos sanguinis	<ul style="list-style-type: none"> • Es redueix la quantitat de microvasculatura. Les parets de les artèries es tornen més gruixudes i es fan més rígides, alterant així les funcions de vasoconstricció i vasodilatació i reduint el volum sanguini que transporten. Per altra banda, els capil·lars es tornen menys permeables, fet que dificulta la difusió de nutrients i oxigen. • Desaparició dels loops capil·lars que subministren sang a la dermis. • Els vasos sanguinis que acompanyen els annexos cutanis redueixen el seu diàmetre i poden ser responsables de la disminució de la funció glandular, com la reducció de la producció de suor i seü, com del creixement del pèl.

Taula 1. Canvis dels teixits i dels annexos cutanis associats a l'envelliment de la pell. *Font: elaboració pròpia [1,2,3,4].*

1.2. Les ferides

Una ferida és una lesió corporal que trenca la continuïtat normal dels teixits. Ens referim a ferida cutània a aquella lesió que només afecta la pell (epidermis i dermis)[5].

1.2.1. Cicatrització normal d'una ferida

La cicatrització és el procés natural per reparar i regenerar els teixits que han patit una ferida. És un procés complex i dinàmic en el qual participen molts tipus cel·lulars i es produeixen diversos fenòmens fisiològics com la inflamació, l'angiogènesi, la formació de teixit granulós, la reepitelització, la formació i remodelització de matriu extracel·lular [6,7]. Aquests fenòmens s'encavalquen temporalment i es poden dividir en les següents etapes: hemostàsia, inflamació, proliferació i remodelació [8].

1.2.1.1. Hemostàsia

L'hemostàsia es defineix com la seqüència de respostes que es produeixen de manera local quan es trenca un vas i tenen com a finalitat aturar el sagnat [2]. En aquesta etapa, el tipus

cel·lular crucial són les plaquetes i el component de la matriu extracel·lular més important és el fibrinogen [7].

Les plaquetes són fragments sense nucli de megacariòcits produïts al moll de l'os. Són relativament petites, d'entre 2-4 µm de diàmetre, però molt nombroses, la seva concentració en sang habitual és: 150.000-400.000/µL de sang. Després d'entrar en circulació, aproximadament un terç de la població plaquetària migra a la melsa per ser emmagatzemades per a una posterior alliberació a la circulació sanguínia en cas que es trenqui un vas sanguini.

Hi ha 3 mecanismes per reduir la pèrdua de sang: (1) l'espasme vascular, (2) la formació del tap plaquetari i (3) la coagulació (superposant-se els dos darrers).

- (1) Quan un vas sanguini es trenca, la musculatura llisa de les seves parets es contrau immediatament per reduir la pèrdua de sang en resposta al PDGF alliberat per les plaquetes. Aquesta resposta es denomina espasme vascular.
- (2) Al produir-se una ferida, els vasos es danyen i les fibres de col·lagen subendotelials queden exposades. Les plaquetes s'adhereixen al col·lagen i, juntament amb la trombina, es promou la seva activació. L'activació de les plaquetes provoca que canviïn de morfologia – estenen moltes projeccions de manera que interactuen les unes amb les altres – i la seva desgranulació – l'alliberació de grans quantitats de molècules de senyalització solubles essencials perquè s'iniciï el procés de reparació d'una ferida i que estimulen la coagulació i l'angiogènesi [9]-. Existeixen dos tipus de grànuls:
 - Els grànuls α contenen una gran varietat de proteïnes: factors de coagulació (factor V, VIII, fibrinògen), factors angiogènics i de creixement (angiogenina, VEGF, PDGF, bFGF), antiangiogènics (angiostatina, PF4), proteïnases (MMP2, MMP9) i altres citocines.
 - Els cossos densos o grànuls δ contenen serotonina, Ca²⁺, ADP, ATP, tromboxà A₂ i altres molècules que participen en l'hemostàsia [8].

L'ADP alliberat interacciona amb receptors i estimula les plaquetes fent que aquestes es tornin més enganxoses i reclutin altres plaquetes per formar el tap plaquetari.

- (3) La coagulació és una sèrie complexa de reaccions químiques que té com a finalitat transformar el fibrinogen soluble en insoluble per formar una malla de fibrina. Els punts claus de la cascada de coagulació són la formació de la protrombinasa, enzim necessari per transformar la protrombina en trombina i, la trombina al seu torn converteix el fibrinogen insoluble en fibrina soluble.

El tap plaquetari i la malla de fibrina es combinen per formar el trombus o coàgul sanguini que atura el sagnat, constitueix una font de factors de creixement, forma una barrera per evitar la invasió de microorganismes i serveix com a scaffold provisional per la migració cel·lular necessària per a la curació de la ferida [2,7,10].

1.2.1.2. Fase inflamatòria

La fase inflamatòria comença immediatament després que es produeixi una ferida i sol durar entre 24-48 h. La inflamació és una resposta protectora, davant d'un estímul danyí, on intervien cèl·lules del sistema immunitari, vasos sanguinis i mediadors moleculars. L'objectiu de la inflamació és eliminar el causant del dany cel·lular, eliminar les cèl·lules i teixits necrosats i iniciar el procés de reparació tissular.

En el lloc de la ferida, les cèl·lules malmeses – els fibroblasts, els queratinòcits, les cèl·lules endotelials i els mastòcits – alliberen citocines i quimioquines inflamatòries, agents vasodilatadors, factors que permeten la permeabilització dels vasos i proteases que permeten el reclutament de cèl·lules immunitàries, per mitjà de la trasvasació de neutròfils, limfòcits i monòcits al lloc de la ferida. Els neutròfils són les cèl·lules predominants durant les primeres hores (inclús dies) de la fase inflamatòria. Posteriorment, el nombre de neutròfils disminueix i augmenta la quantitat de macròfags. Aquestes cèl·lules fagocítiques destrueixen els possibles agents infecciosos alliberant grànuls tòxics i fagocitant-los. També sintetitzen MMPs que digereixen l'ECM, promovent així la inflamació; i la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que faciliten l'eliminació de desfets cel·lulars (Figura 4) [7,8,10].

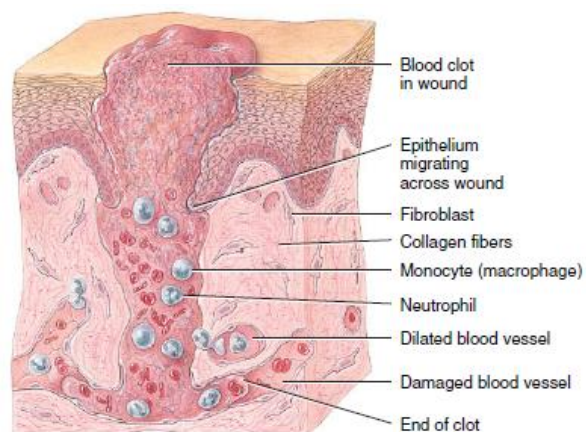


Figura 4. Fase inflamatòria de la curació d'una ferida. S'indiquen els tipus cel·lulars que hi participen. Font: Figura 5.6.C. del llibre *Principles of Anatomy and Physiology* [2].

1.2.1.3. Fase de proliferació

Després de 4 dies comença la fase de proliferació, caracteritzada per la formació de teixit connectiu nou o de teixit de granulació [7].

L'objectiu d'aquesta etapa és disminuir l'àrea de teixit malmès per tal que es tanqui la ferida. Per fer-ho, es crea una barrera permeable (reepitelització), s'estableix un suport sanguini adequat (angiogènesi) i es reforça el teixit malmès (fibroplàsia).

La reepitelització es caracteritza per la cobertura del llit de la ferida per la proliferació dels queratinòcits de les vores de la ferida que migren per tancar la ferida. Un cop s'ha tancat la ferida, els queratinòcits s'estratifiquen i es diferencien per tornar a formar la barrera protectora [8].

L'angiogènesi és un procés coordinat que inclou la proliferació de les cèl·lules endotelials, el trencament i la formació de membrana basal, la formació d'estructures tubulars i el reclutament de cèl·lules perivasculares – cèl·lules amb capacitat contràctil que envolten les cèl·lules endotelials de l'endoteli vascular [5]. Finalment, aquests vasos es recobreixen de cèl·lules musculars llises per a la completa formació dels vasos sanguinis. La nova microvasculatura permet l'arribada d'oxigen, nutrients i cèl·lules immunes a l'estroma [10].

En el procés de fibroplàsia, els fibroblasts proliferen i secreten components de l'ECM com col·lagen, elastina, fibronectina, glicosaminoglicans i proteïnases [8] per formar el teixit de granulació. La formació d'una membrana basal entre l'epidermis i la dermis és essencial per restablir la integritat i la funció del teixit.

El teixit de granulació consisteix principalment en components del coàgul sanguini, fibroblasts i l'ECM de teixit connectiu lax (col·lagen III) sintetitzat per aquests, nous vasos sanguinis en formació i cèl·lules inflamatòries. A causa de la quantitat de vasos sanguinis petits que s'estan formant, el teixit de granulació serà de color vermell clar o rosat i amb una superfície irregular formant petites elevacions en forma de grànuls, motiu pel qual es denomina teixit de granulació (Figura 5) [11].

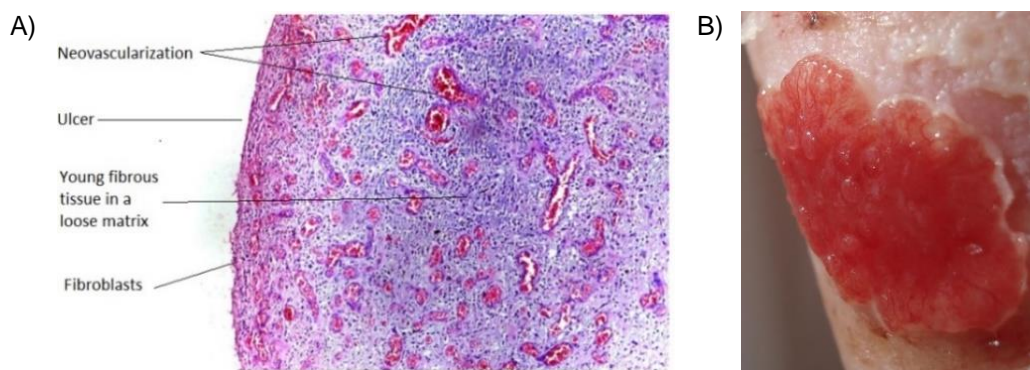


Figura 5. Teixit de granulació. A) Tall histològic del teixit de granulació. B) Vista macroscòpica del teixit de granulació. Font: Wikimedia Commons (modificada)

1.2.1.4. Fase de remodelació

La fase de remodelació comença aproximadament 3 setmanes després que s'hagi produït la ferida i pot durar fins a un any o més. L'objectiu d'aquesta fase és recuperar la màxima resistència a la tracció possible per mitjà de la reorganització i la degradació de l'ECM anterior i formar-ne de nova. Això és possible perquè el teixit de granulació es va substituint per teixit de cicatrització, un teixit connectiu menys cel·lular i vascularitzat i més ric en col·lagen I (més fort que el col·lagen III que trobem al teixit de granulació).

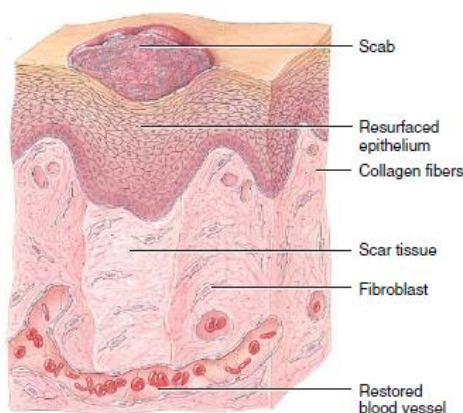


Figura 6. Fase de remodelació de la curació d'una ferida. S'indiquen els tipus cel·lulars que hi participen. Recuperada de: Figura 5.6.D. del llibre Principles of Anatomy and Physiology [2].

Quan ocorre la reepitelització i la ferida es tanca, la migració de queratinòcits s'atura i els fibroblasts secreten MMPs. Les MMPs degraden de mica en mica el teixit de granulació i canvien la composició de l'ECM – el col·lagen tipus III es degrada i se sintetitza del tipus I; es redueix la concentració d'àcid hialurònic i fibronectina de l'ECM; la síntesi i estructuració de l'elastina fa el teixit més elàstic; i hi ha una regressió i maduració de la neovascularatura (Figura 6) [7,10,12,13].

1.2.1.5. Rol dels factors de creixement en la reparació tissular

Els factors de creixement són un tipus de citocines que estimulen la proliferació cel·lular. La unió de factors de creixement als receptors de la superfície cel·lular condueix a l'inici de vies específiques de transducció de senyals que en última instància, generen canvis en l'expressió gènica que condueixen a la síntesi de proteïnes, canvis en l'activitat cel·lular o en la proliferació [9].

Els factors de creixement tenen l'habilitat de millorar la cicatrització d'una ferida per mitjà de diferents mecanismes:

- Els factors de creixements tenen la capacitat d'atreure cèl·lules inflamatòries i fibroblasts a la ferida. Per exemple, VEGF, PDGF i TGF- β atreuen neutròfils a la zona malmesa per evitar l'entrada de patògens.
- Actuen com a mitògens per estimular la proliferació cel·lular.
- Estimulen l'angiogènesi. Com per exemple, VEGF i FGF.
- Participen en la síntesi i degradació de l'ECM. Per exemple, TGF- β promou la síntesi de col·lagen i les fibres d'elastina.
- Estimulen a les cèl·lules que rodegen la ferida perquè sintetitzin citocines i factors de creixement.
- Permeten la migració cel·lular. Per exemple, l'EGF, TGF- α i el FGF en la fase de reepitelització estimulen la migració i la proliferació de les cèl·lules epitelials [6,14].

Per conèixer en més detall el paper dels factors de creixement alliberats per les plaquetes en l'angiogènesi i sobre quines cèl·lules actuen veieu la Taula 2.

Factor	Alliberat per	Acció
TGF-α	Macròfags	Formació del teixit de granulació
	Plaquetes	Estimular la proliferació de cèl. epitelials i fibroblasts
TGF-β	Plaquetes	Quemotaxis
	Neutròfils	Diferenciació dels fibroblasts en miofibroblasts
	Macròfags	Construcció de la matriu de col·lagen i fibres d'elastina
	Fibroblasts	Estimulació de l'angiogènesi Contracció de la ferida Alliberació d'altres factors de creixement Estimulació de MMP
PDGF	Plaquetes	Quemotaxis
	Fibroblasts	Proliferació dels fibroblasts
	Cèl. endotelials	Deposició del col·lagen

	Macròfags Neutròfils	Involucrat en la maduració dels vasos Recluten cèl·lules progenitores endotelials del moll de l'ós Recluten perícits i cèl·lules musculars llises per mantenir les parets dels vasos
VEGF	Plaquetes Neutròfils Queratinòcits Cèl. Endotelials	Estimular l'angiogènesi Neovascularització Controla la proliferació, la morfogènesis, la migració i la supervivència de les cèl·lules endotelials Promou l'allargament i la ramificació dels vasos
TNF-α	Plaquetes	Quemotaxis Alliberació d'òxid de nitrogen Activació d'altres factors de creixement
FGF	Cèl. Endotelials Fibroblasts	Estimulen l'angiogènesi Migració i proliferació de les cèl·lules endotelials Mitogènic pels fibroblasts
EGF	Cèl. endotelials	Migració i proliferació de les cèl·lules endotelials Indueix la formació d'estructures tubulars
HGF	Cèl. Endotelials Plaquetes	Mitògen per cèl·lules endotelials Estimula la secreció de VEGF
bFGF	Cèl. Endotelials	Indueix la proliferació i la formació d'estructures tubulars de les cèl·lules progenitores endotelials Estimula la secreció de VEGF
CTGF	Cèl. Endotelials	Regula la remodelació vascular
SCGF	Cèl. Endotelials	Quemotaxis Incrementa la formació d'estructures tubulars

Taula 2: Factors de creixement alliberats pels grànuls alfa de les plaquetes que participen en l'angiogènesi. S'especifica sobre quin/s tipus cel·lulars i quines funcions porten a terme cada factor de creixement implicat en l'angiogènesi. *Font: elaboració pròpia [8,9,20,21].*

1.2.2. Complicacions de la reparació d'una ferida degudes a l'envelliment

L'envelliment comporta canvis en l'estructura normal de la pell (veieu Taula 1) que compliquen el procés de curació d'una ferida. Les alteracions que s'experimenten a cada etapa del procés de cicatrització es recullen a la Taula 3.

Fase inflamatòria	<ul style="list-style-type: none"> • Si la pell te una irrigació deteriorada i arriba poca sang a la lesió cutània, s'agreguen menys plaquetes per formar el coàgul i se secreten menys factors de creixement necessaris per la reparació de ferides. • Es redueix la permeabilitat dels vasos del voltant de la ferida, reduint així la trasvasació de neutròfils, limfòcits i monòcits. • Disminueix la capacitat fagocítica dels macròfags.
Fase de proliferació	<ul style="list-style-type: none"> • Els queratinòcits, els fibroblasts i les cèl·lules endotelials presenten una resposta proliferativa reduïda, alterant la reepitelització, a la formació de teixit

	<p>de granulació i l'angiogènesi respectivament.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Es redueix la secreció de factors angiogènics (FGF, VEGF, TGF-β), afectant el procés d'angiogènesi que també es redueix. • La producció de col·lagen es redueix, consegüentment, afecta la deposició de teixit connectiu. • Hi ha una sobreexpressió de MMPs i una reducció dels seus inhibidors. Tot i que les MMPs són necessàries per al procés d'angiogènesi (l'ECM s'ha de degradar per formar els nous vasos), si s'elimina molta ECM, s'altera la migració dels queratinòcits durant la reepitelització.
Fase de remodelació	<ul style="list-style-type: none"> • Hi ha una reducció de la síntesi de col·lagen I. Com aquest col·lagen exerceix força perquè es tanqui la ferida, el seu dèficit fa que ferida romangui més temps oberta i sigui susceptible a patir infeccions.

Taula 3. Complicacions en el procés de cicatrització associades a l'envelliment. Font: elaboració pròpia [3].

1.3. Vasos sanguinis de la pell

La pell rep un suport sanguini abundant a partir de la vasculatura que hi ha a la dermis i l'hipodermis. La vasculatura de la pell està formada per arterioles, capil·lars i vènules i que tenen com a objectiu assegurar la nutrició del teixit i els annexos cutanis [15]. Les arterioles (10-100 μm de diàmetre) i les vènules (10-200 μm) presenten una paret gruixuda i resistent de teixit connectiu, moltes capes de cèl·lules musculars llises – que es pot contraure (vasoconstricció) o relaxar (vasodilatació) per regular el flux i la pressió sanguínia – i una única capa de cèl·lules endotelials, anomenada endoteli, que està separada de la resta de capes externes per la làmina basal. Les quantitats de teixit connectiu i muscular de les parets dels vasos varien segons el diàmetre i la funció del vas, mentre que el revestiment endotelial sempre és el mateix. Els capil·lars (10-100 μm) són els vasos més primers i simples, presenten una sola capa de cèl·lules endotelials rodejada per la làmina basal i pels perícits – són unes cèl·lules del teixit connectiu amb capacitat contràctil que formen una capa discontinua al voltant de l'endoteli (Figura 7) [16,17].

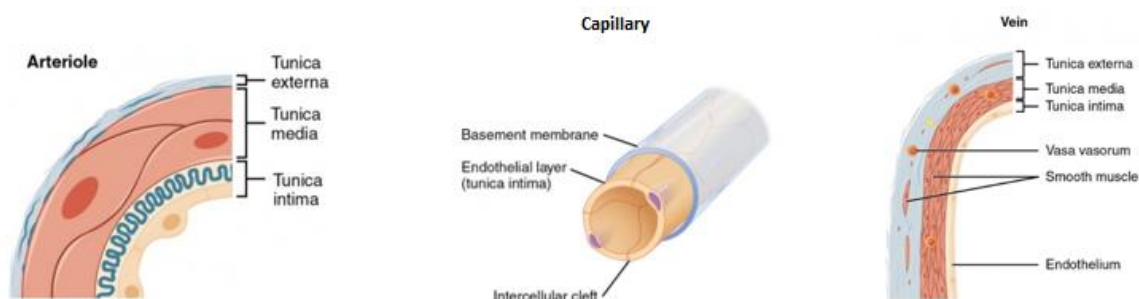


Figura 7. Tipus de vasos sanguinis de la pell. Arteriola (esquerra), capil·lar (centre) i vènula (dreta). Font: Lumen learnin [34].

Seguint la direcció del flux sanguini, la sang oxigenada i rica en nutrients arriba a la pell per mitjà d'arterioles de l'hipodermis i la dermis. Les arterioles porten la sang als capil·lars, els quals formen una xarxa de microvasculatura anomenada llit vascular, responsables de l'intercanvi de gasos i de nutrients. Finalment, la sang desoxigenada i amb substàncies de

rebuig flueix des dels capil·lars cap a les vènules [17]. Això és possible perquè les arterioles que subministren sang a la pell es ramifiquen cap amunt per formar dos plexes de vasos en anastomosis. El plexe més profund es troba entre la unió de l'hipodermis i la dermis i es coneix com el plexe cutani; el plexe més superficial es troba entre la dermis reticular i la papil·lar i es coneix com el plexe subpapil·lar o superficial. El plexe subpapil·lar subministra sang a la dermis papil·lar formant loops en cada papil·la dèrmica; mentre que el plexe cutani subministra sang a l'hipodermis, la dermis reticular, els fol·licles pilosos i les glàndules sebàcies i sudorípares. El drenatge venós s'organitza també amb plexes molt semblants al de les arterioles (Figura 8) [18].

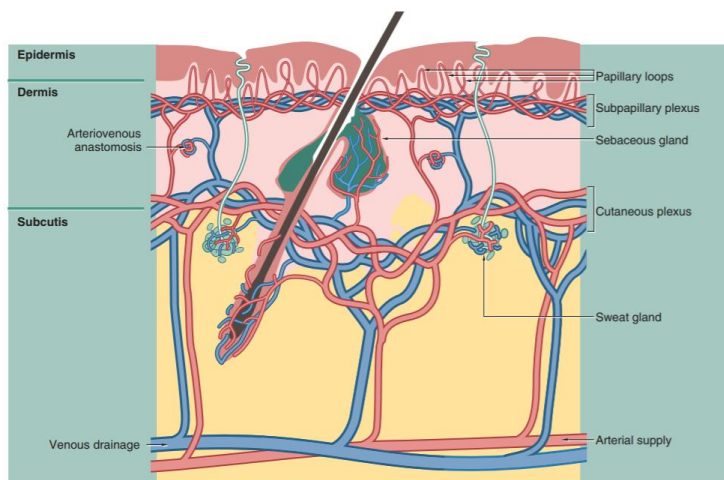


Figura 8. Circulació de la pell. Es mostren els plexes cutani i subcutani i els loops papil·lars. Els vasos vermells transporten sang oxigenada i els blaus sang desoxigenada. Font: Figura 9.8. del llibre *Weather's Functional Histology* [18].

1.3.1. Generació de vasos sanguinis

La vasculogènesi és la formació de vasos sanguinis *de novo*, és a dir, la formació de vasos sanguinis en un lloc on prèviament no hi ha de preexistents. Solament ocorre durant el desenvolupament embrionari i es formen a partir d'angioblasts. La vasculogènesi és un procés dinàmic dirigit per factors de creixement que implica la diferenciació de les cèl·lules mare mesodèrmiques en angioblasts, la migració dels angioblasts per formar blood islands on els angioblasts es diferencien en cèl·lules endotelials.

Existeixen altres tipus de creixement vascular com l'angiogènesi, que s'explica en detall a l'apartat 1.4.; l'arteriogènesi, que és la formació d'arteries; la venogènesi, que és la formació de venes; i la limfangiogènesi, que és la formació de vasos limfàtics [16].

1.3.2. Endoteli

L'endoteli no és un mer revestiment dels vasos sanguinis i limfàtics, sinó que realitza diverses funcions transcendents per l'organisme:

- Funció transportadora de l'endoteli: l'endoteli és una barrera selectiva que regula el pas de molècules i cèl·lules des de la sang a teixits subjacents.

- Manteniment del to vascular: l'endoteli produeix substàncies vasodilatadores i vasoconstrictores que regulen el to vascular, el reclutament i l'activitat de les cèl·lules inflammatòries, i regulen la trombosi.
- Producció d'òxid nítric (NO): NO, prostaciclina, endotelina i el factor hiperpolaritzant derivat de l'endoteli (EDHF) són uns vasoactivadors poderosos d'acció local alliberats per les cèl·lules endotelials, que afecten en la funció i l'estructura de la musculatura vascular llisa. La producció constitutiva de NO manté els vasos sanguinis en un estat de vasodilatació [19]. També evita l'activació, la unió i l'agregació plaquetària quan l'endoteli està intacte [7].
- Producció d'endotelina: l'endotelina és un potent vasoconstrictor que estimula la proliferació cel·lular i incrementa la síntesi de col·lagenasa, prostaglandina i PDGF.
- Funció protectora: les cèl·lules endotelials juguen un paper principal en la defensa de l'organisme i en les respostes inflammatòries. Regulen la mobilització de leucòcits cap als teixits en sintetitzar molècules d'adhesió – E-selectina, P-selectina, molècula d'adhesió intramolecular 1 (ICAM-1), molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars (VCAM) i factor activador de plaquetes (PAF)– que uneixen als leucòcits a l'endoteli. Recluten neutròfils, eosinòfils, limfòcits T, monòcils i cèl·lules natural killer (NK).
- Funció metabòlica: les cèl·lules endotelials exerceixen accions paracrines i endocrines significatives a la musculatura llisa dels vasos sanguinis o en els elements sanguinis circulants, com les plaquetes i els leucòcits. Els factors de creixement que produeixen participen en respostes immunitàries i inflammatòries, la trombosi i l'angiogènesi.
- Manteniment de l'homeòstasi i la coagulació: les cèl·lules endotelials i les cèl·lules musculars llises vasculars expressen proteïnes que participen directament en el manteniment de l'homeòstasi, la coagulació, l'angiogènesi, l'adhesió dels leucòcits a les parets dels vasos, la regulació del to vascular, etc. Les proteïnes de coagulació que circulen pel torrent sanguini i els seus receptors que es troben al llarg de l'endoteli, estan altament controlats per regular i iniciar una resposta de coagulació en cas que es malmeti un vas [19,20,21].

1.3.3. La sang

La sang és un teixit connectiu líquid que consisteix en cèl·lules suspeses en una matriu extracel·lular líquida. La sang és més densa i viscosa que l'aigua, la seva temperatura és de 38° i té un pH lleugerament alcalí (entre 7.35-7.45).

La sang està formada per dos components: (1) el plasma sanguini, la matriu extracel·lular líquida que conté substàncies dissoltes i, (2) els elements formes, que correspon a les cèl·lules sanguínies. Si se centrifuga una mostra sanguínia, les cèl·lules (que són més denses) baixen al fons del tub, mentre que el plasma (que és menys dens) forma una capa a la part superior del tub. Els elements formes constitueixen el 45% de la sang i el plasma sanguini el 55%. Normalment, més del 99% dels elements formals són eritròcits i, l'1% restant són leucòcits i plaquetes. Els limfòcits són menys denses que els eritròcits i formen una capa molt prima entre el plasma sanguini i la fracció dels eritròcits (Figura 9) [2].

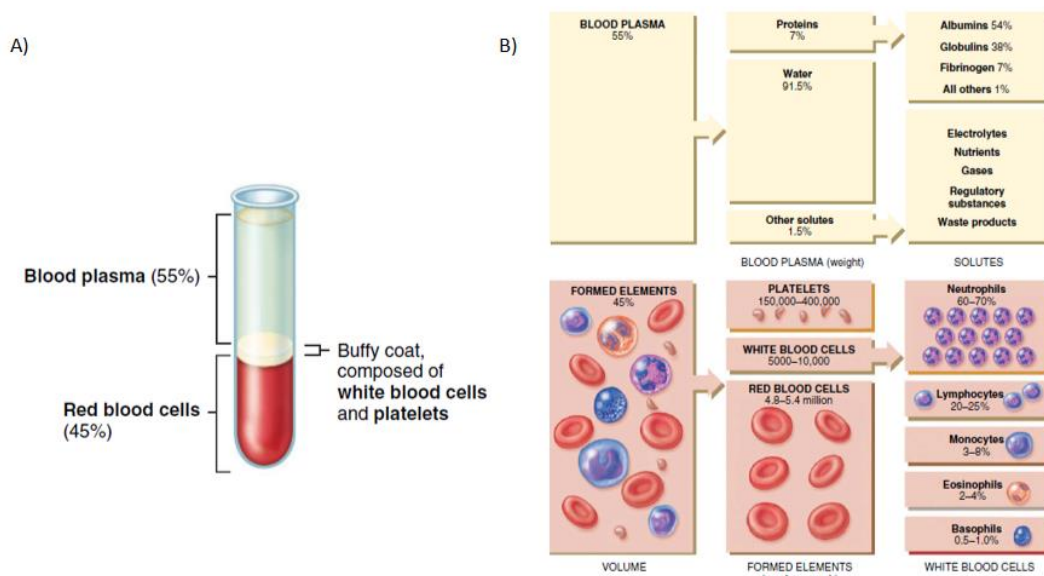


Figura 9. Components de la sang. A) Aparència de la sang centrifugada. B) Components de la sang. Font: Figura 19.1. del llibre *Principles of Anatomy and Physiology* [2].

1.4. Angiogènesi

La formació de vasos sanguinis a partir de vas preexistent es coneix com el procés d'angiogènesi o neovascularització. Aquest fenomen ocorre de manera natural al llarg de la vida d'una persona, aquesta estigui sana o malalta. Es produeix per primer cop durant la formació del fetus i continua durant la vida adulta. Tots els teixits metabòlicament actius del cos es troben com a molt a un 100 µm d'un capil·lar sanguini. Els capil·lars es necessiten en tots els teixits per intercanviar nutrients i metabòlits per difusió facilitada.

En els darrers 40 anys, ha augmentat l'interès a entendre i controlar el procés d'angiogènesi pel seu elevat valor terapèutic. L'estimulació de l'angiogènesi es pot utilitzar per tractar malalties isquèmiques del cor, malalties arterials perifèriques i en la reparació de ferides. Per altra banda, disminuir o inhibir el procés d'angiogènesi es podria utilitzar per tractar el càncer, l'artritis reumatoide, entre altres malalties.

En condicions normals i en una persona sana, els vasos creixen i es retrauen segons les necessitats funcionals dels teixits. Per una banda, l'exercici estimula l'angiogènesi en el múscul esquelètic i en el cor i, en el teixit adipós quan es guanya pes. Mentre que la falta d'exercici i la pèrdua de pes fomenta la regressió dels vasos [7,16].

1.4.1. Tipus d'angiogènesi

S'han descrit dues formes d'angiogènesi: sprouting angiogenesis i intussusceptive angiogenesis. Es creu que totes dues ocorren en tots els teixits i òrgans d'un individu durant la seva vida adulta.

1.4.1.1. Sprouting angiogenesis

La sprouting angiogenesis s'inicia en teixits on es detecten una concentració baixa d'oxigen (condicions d'hipòxia) i com a resposta s'inicia la formació de vasos, per tal de satisfer les

necessitats metabòliques de les cèl·lules parenquimatoses. La majoria de cèl·lules parenquimatoses responen a un ambient d'hipòxia produint VEGF i PDGF. Les cèl·lules endotelials que estan exposades a nivells més elevats de VEGF i PDGF s'anomenen tip cells. Les tip cells guien i lideren el desenvolupament d'un nou capil·lar a través de la matriu extracel·lular. Les tip cells tenen uns fil·lopodis que secreten uns enzims proteolítics (MMPs) que degrada l'ECM que les envolta. A més, aquests fil·lopodis permeten la migració de les tip cells i alhora, les cèl·lules endotelials del vas preexistent (stalk cells) proliferen causant l'elongació del nou capil·lar. Les dues tip cells s'uneixen i formen un lumen per on fluirà la sang oxigenada. Quan s'ha restablert els nivells d'oxigen normals, els nivells de VEGF i PDGF disminueixen i tornen a un estat basal. Per últim, la maduració i estabilització del capil·lar requereix el reclutament dels perícits i la deposició de l'ECM (Figura 10) [7,16].

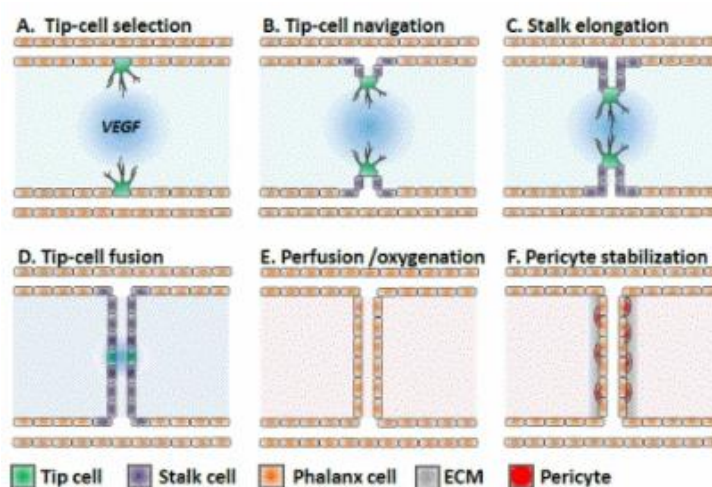


Figura 10. Sprouting angiogènesis. Se'n distingeixen aquestes fases: la degradació enzimàtica de la membrana basal dels capil·lars, la proliferació i la migració dirigida de les cèl·lules endotelials, la tubulogènesi, la fusió dels vasos i l'estabilització dels perícits. Font: Figura 1.4. del llibre *Angiogenesis* [16].

1.4.1.2. Intussusceptive angiogenesis

La intussusceptive angiogenesis també es coneix com a splitting angiogenesis perquè la paret d'un vas s'estén cap a l'interior (lumen) i causa que un vas únic es divideix en dos. Es creu que aquest tipus d'angiogènesi és més ràpid i eficient en comparació amb l'sprouting angiogenesis perquè es basa en la reorganització de les cèl·lules endotelials existents i no requereix la proliferació o migració de cèl·lules endotelials. Aquesta forma d'angiogènesi es produeix al llarg de la vida, però duu a terme un paper rellevant durant el desenvolupament vascular de l'embrió [16].

La intussusceptive angiogenesis es porta a terme en 4 fases:

1. Les parets oposades del capil·lar estableixen una zona de contacte.
2. Es reorganitzen les unions de les cèl·lules endotelials i es perfora la bicapa del vas per permetre l'entrada de factors de creixement i cèl·lules al lumen vascular.
3. Es forma una separació cel·lular a la zona de contacte que separarà els dos nous vasos. Aquesta separació cel·lular es envaïda per perícits i miofibroblasts, que sintetitzen i depositen fibres de col·lagen.

4. Finalment, s'acaba de formar la paret que separa els dos nous vasos sense alterar la nova estructura vascular (Figura 11) [22].

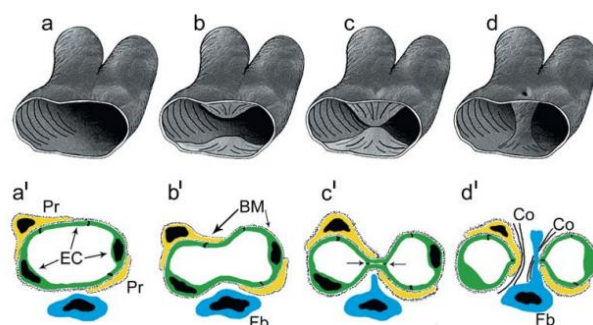


Figura 11. Representació tridimensional de la generació d'un nou segment vascular per mitjà de la intussusceptive angiogènesis. La seqüència d'imatges inferior mostra els tipus cel·lulars que hi participen (Pr: pericit, EC: cèl·lula endotelial, Fb: fibroblasts, Co: col·lagen). Font: Figura 1 de l'article Djonov et. Al. "Vascular remodelin by intussusceptive angiogenesis" [22].

1.5. Ferides Cròniques

Ja hem vist els efectes de l'envelliment en els processos de cicatrització. Ara ens centrem en les ferides que es cronifiquen sense aconseguir la cicatrització i els factors que contribueixen en aquesta cicatrització. La cicatrització d'una ferida sol ser un procés ràpid i eficient, però hi ha certs factors com l'edat i certes patologies associades a l'envelliment – com problemes cardiovasculars o la diabetis –, provoquen que aquesta curació es compliqui [8]. Es considera que una ferida ha esdevingut crònica quan la seva cicatrització no es produeix dins del període esperat, normalment unes 12 setmanes, segons la seva etiologia i localització [23,24].

En estudiar les ferides cròniques, s'ha vist que (1) solen tenir pocs factors de creixement actius, ja sigui perquè queden atrapats en la fibrina de l'ECM, són degradats per proteases que hi ha al lloc de la ferida, s'ha reduït la seva producció i alliberació, o una combinació de totes aquestes causes; (2) hi ha un desequilibri entre el nombre de proteïnases i els seus inhibidors, la qual cosa complica la cicatrització perquè es degrada ECM de manera anormal; i (3) un gran nombre de fibroblasts en les ferides cròniques es troben en senescència, fet que complica que responguin als estímuls dels factors de creixement i la síntesi d'ECM quedi afectada. Tots aquests escenaris compliquen la reparació tissular i, consegüentment, la seva cicatrització [25,26].

Les ferides cròniques disminueixen la qualitat de vida dels pacients, perquè requereixen tractaments de manera continuada, un alt percentatge de pacients senten dolor i, de vegades, la seva mobilitat es redueix. Per aquest motiu, la curació de les ferides ha esdevingut un repte mèdic. S'han proposat diferents mètodes per promoure la cicatrització de ferides que inclouen la teràpia gènica, reemplaçar teixits, l'ús de factors de creixement recombinants i tractaments basats en cèl·lules, l'ús de PRP, entre d'altres [27]. Aquest treball s'emmarca en l'ús de PRP com a teràpia per estimular la curació de les ferides.

1.5.1. Tractament de ferides cròniques amb PRP

El plasma ric en plaquetes (PRP) es defineix com la porció de la fracció plasmàtica que conté una concentració de plaquetes per sobre del nivell basal, aproximadament 1.000.000

plaquetes/mL de plasma i entre 3-5 vegades més concentració de factors de creixement, no té eritròcits i pot contenir leucòcits [7].

El PRP constitueix una teràpia alternativa que promou la regeneració del teixit, perquè quan es produeix l'agregació plaquetària, aquestes s'activen i alliberen factors de creixement, citocines, molècules d'adhesió i lípids que:

- Promouen i modulen el creixement de nous capil·lars (angiogènesi).
- Regulen la migració i la proliferació de queratinòcits, fibroblasts i cèl·lules endotelials.
- Limiten la inflamació.
- Tenen activitat immunoreguladora dels neutròfils i monòcits.
- Accelera la reepitelització de les ferides cròniques.

La preparació de PRP és bastant senzilla i econòmica, si ho comparem amb altres teràpies regeneratives. A més, és una tècnica pràcticament no invasiva, perquè solament cal extraure sang al pacient, fet que redueix considerablement el risc d'infecció o de rebuig pel sistema immunitari. Per aquests motius, és una teràpia que està guanyant molta força i s'està utilitzant per tractar diferents condicions clíniques com les úlceres, les cremades, dany muscular i en malalties dels ossos, per facilitar la recuperació del teixit després de la cirurgia [26,27,28,29,30].

1.5.2. Procés d'angiogènesis en la reparació de ferides o regeneració tissular

La neovascularització és un component essencial durant tot el procés de cicatrització d'una ferida. Els vasos sanguinis contribueixen a restablir l'hemostàsia inicial, redueixen la pèrdua de sang i estableixen una matriu provisional (formació del teixit de granulació). Les citocines derivades del coàgul sanguini i els factors de creixement recluten les tipologies cel·lulars necessàries per al procés de reparació. En aquest punt, s'ha establert un microambient provisional per a la formació i regeneració de nous vasos sanguinis, que garanteix la perfusió de nutrients a la ferida i restableix els nivells d'oxigen, fet que potencia la proliferació cel·lular i la regeneració del teixit. [7,31].

Durant la reparació d'una ferida, en condicions normals i en una persona sana, els vasos sanguinis creixen a un ritme desorbitat i produeixen una xarxa de vasos sanguinis funcional i no funcionals 2 o 3 vegades més densos i desorganitzats que en el teixit normal. Aquest creixement massiu de vasos sanguinis està principalment regulat pels factors proangiogènics VEGF-A, PDGF i bFGF. Amb el temps, els vasos no funcionals regressen per mitjà de l'apoptosi i els funcionals maduren fins que s'assoleix la densitat vascular de la pell normal i sense lesions [6].

La interrupció del procés d'angiogènesi condueix a trastorns en la cicatrització de la ferida o a la seva cronificació. Aquest fenomen fisiopatològic normalment el veiem quan hi ha una insuficiència venosa, a les úlceres dels peus diabètics o en persones que pateixen arterioesclerosi [31].

1.6. Models in vitro per a l'estudi de la regeneració de la pell

En la regeneració de la pell, els teixits que es regeneren són diversos i existeixen diferents models *in vitro* pel seu estudi. Nosaltres ens centrem en la regeneració dels capil·lars i exposem a continuació uns quants models habitualment usats en aquests estudis.

1.6.1. Cultiu de cèl·lules endotelials i models d'angiogènesi *in vitro*

Com ja s'ha descrit a l'apartat 1.4, perquè es produeixi angiogènesi, les cèl·lules endotelials han de proliferar, migrar i formar estructures tubulars. Tots aquests esdeveniments es poden estudiar *in vitro*. El desenvolupament d'assaigs d'angiogènesi ha permès el descobriment de molècules proangiogèniques i antiangiogèniques.

Els assaigs *in vitro* permeten estudis ràpids i quantitius, però s'han de considerar com primeres aproximacions que han de ser confirmades *in vivo*. Les proves *in vivo* requereixen molt més temps i són més difícils de quantificar, però donada la complexitat de les interaccions que ocorren entre múltiples tipologies cel·lulars necessàries per formar vasos sanguinis funcionals, totes les troballes *in vitro* s'han de confirmar directament en l'animal [16,32].

La majoria d'assaigs amb cèl·lules endotelials s'utilitzen cèl·lules endotelials de la vena umbilical humana (HUVEC) o cèl·lules endotelials aòrtiques bovines (BAEC), perquè són cèl·lules relativament fàcils d'extraure de vasos sanguinis grans [16]. En aquest estudi treballarem amb una línia immortalitzada de HUVEC, que en ser una línia embrionària tenen molta més capacitat de proliferació que les BAEC, i amb una línia de cèl·lules endotelials de ratolí (bEND3), concretament de vasos del sistema nerviós.

Les cèl·lules endotelials són heterogènies: existeixen diferències entre els vasos sanguinis grans i els petits; diferències entre espècies; dels òrgans, l'hoste o el tumor del qual provenen; i inclús diferències dins del mateix òrgan. A més, les cèl·lules endotelials que s'utilitzen en els assaigs estan en un estat de proliferació constant, mentre que les cèl·lules endotelials dels vasos del cos no proliferen, solen estar en repòs. Aquesta alta taxa de proliferació permet obtenir el volum cel·lular necessari per realitzar els experiments. Se sol suposar que aquestes cèl·lules conserven les característiques fisiològiques normals que exhibeixen *in vivo*, però això no és sempre així, ja que normalment les cèl·lules *in vitro* guanyen o perden atributs, fenomen que es coneix com a desdiferenciació cel·lular [16].

1.6.2. Assaigs de proliferació

Les cèl·lules endotelials proliferen per proporcionar el nombre de cèl·lules necessàries per al desenvolupament de capil·lars. Existeixen molts mètodes per mesurar l'efecte de molècules proangiogèniques i antiangiogèniques sobre la proliferació cel·lular. Els més utilitzats són:

- Recomptes cel·lulars directes: les cèl·lules es poden comptabilitzar utilitzant un hemocitòmetre i un microscopi invertit o utilitzant altes dispositius semblants (comptador electrònic de Coulter, càmera de Neubauer, etc.).
- La síntesi d'ADN: s'utilitzen nucleòtids marcats radioactivament i segons la quantitat radioactiva que presentin les cèl·lules podem saber la quantitat d'ADN sintetitzat. També existeixen mètodes similars no radioactius.

- L'activitat metabòlica cel·lular: normalment se sol fer per mitjà d'un assaig colorimètric (assaig MTT) on els enzims mitocondrials de les cèl·lules vives redueixen el MTT i l'absorbància es llegeix mitjançant un espectrofotòmetre.

Tant els mètodes que analitzen la síntesi d'ADN com l'activitat metabòlica no són completament fiables, per això és millor utilitzar més d'un mètode per determinar la taxa de proliferació cel·lular.

S'ha vist que per provar les possibles molècules proangiogèniques sovint és necessari reduir l'estimulació pròpia del sèrum del medi de cultiu, perquè generalment és més efectiu provar molècules antiangiogèniques en cèl·lules que tenen una taxa substancial de proliferació [16,32]. De manera que abans de procedir a l'experiment, es redueix la concentració de sèrum en el medi o s'utilitza directament un medi que no en contingui.

1.6.3. Assaigs de migració

En l'sprouting angiogenesis, les cèl·lules endotelials degraden l'ECM i migren al llarg d'un gradient químic establert per factors de creixement proangiogènics. Existeixen diversos assajos en els quals es mesura la migració de les cèl·lules endotelials en resposta a un factor que indueix o inhibeix l'angiogènesi. La tècnica més utilitzada per avaluar la seva migració és una modificació de l'assaig de la càmera de Boyden clàssica: les cèl·lules endotelials es col·loquen sobre un filtre permeable sobre el medi de cultiu on es troba el factor que es vol testar; les cèl·lules podran migrar en resposta a aquell factor. Aquest mètode és altament sensible a nivells baixos de factors quimiotàctics i altament reproducible en comparació amb altres assaigs de migració [16,32].

El wound healing assay és un altre mètode simple per estudiar la migració cel·lular *in vitro* que imita la migració cel·lular que es produeix durant la curació d'una ferida *in vivo*. Aquesta tècnica consisteix a crear una "ferida" a la monocapa del cultiu, realitzar un seguiment per imatges al principi i a diferents intervals del procés de migració per tancar la ferida i, comparar les imatges per quantificar la taxa de migració cel·lular [33].

1.6.4. Assaigs de formació d'estructures tubulars

Un cop les cèl·lules endotelials han proliferat i migrat cap a un estímul propiciat per un factor de creixement proangiogènic, aquestes han de formar estructures tubulars amb lumen per on circularà el flux sanguini. Les cèl·lules endotelials semblen capaces de formar estructures tubulars espontàniament quan han tingut temps per dipositar components de la matriu extracel·lular. La formació de tubs es pot millorar si es cobreixen les superfícies de les plaques de cultiu amb fibrina o col·lagen. Les estructures tubulars que es formen sobre aquest coating són bastant fidels als que es formen *in vivo* i la formació de les tight junctions es poden confirmar per microscòpia electrònica [32].

Actualment, els assaigs de tubulogènesi més populars impliquen cultivar HUVEC o BAEC amb Matrigel (Figura 12). El Matrigel és una barreja complexa de proteïnes de la làmina basal dels epitelis (laminina, col·làgen IV, entactina, proteoglicans, etc.) que causa la formació d'estructures tubulars en 24 h. Però, s'ha vist que cèl·lules que no tenen un origen endotelial, com fibroblasts o cèl·lules de carcinomes i glioblastomes, formen tubs. Aquest fet planteja la

qüestió de si es formen tubs amb lumen reals o solament s'alienen cèl·lules una al costat de l'altre [16,32].

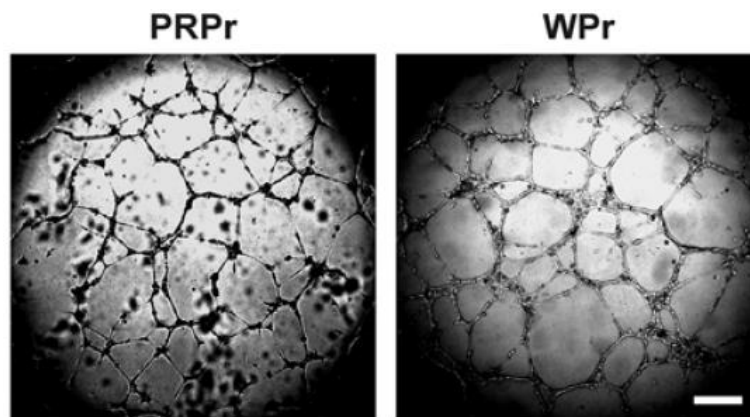


Figura 12. Assaig d'angiogènesi amb HUVEC en Matrigel. PRPr i WPr són dues maneres d'obtenir els factors de creixement alliberats per les plaquetes del PRP. Per més informació consultar l'apartat 3.2. *Font: Figura 1 de l'article Etulain et. Al. "An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties" [27].*

2. Hipòtesis i Objectius

La unitat de ferides de l'Hospital Universitari de la Santa Creu de Vic (HUSC) ha optat des de fa uns anys per l'ús del PRP com a tractament de ferides cròniques en pacients d'edats avançades. Revisions recents de la Cochrane, la teràpia amb PRP millora la cicatrització de les úlceres en el peu associades a pacients que pateixen diabetis, però no s'ha pogut determinar que funcioni en ferides cròniques d'altres etiologies [35].

Tenint en compte que el procés d'angiogènesi és imprescindible perquè un ferida es curi el grup de recerca TR2Lab ha iniciat una línia de recerca basada en l'estudi de l'efecte dels factors que conté el PRP sobre l'angiogènesi.

La hipòtesi que es planteja en aquest treball és la següent: "Establir un assaig d'angiogènesi in vitro pot donar un valor pronòstic en el tractament de ferides amb PRP".

D'aquesta manera, es podrà estudiar in vitro si el plasma d'aquests pacients té la capacitat d'estimular l'angiogènesi i ajudar en el procés de cicatrització de les ferides cròniques. Si aconseguim que aquest estudi tingui un valor pronòstic podrem evitar que, si el tractament no funciona, s'extregui sang setmanalment de pacients amb una fragilitat alta.

L'objectiu principal d'aquest Treball de Fi de Grau és establir un model d'angiogènesi in vitro amb el que poder testar el plasma de pacients que pateixen úlceres de diferents etiologies.

Per poder aconseguir establir el model d'angiogènesi, s'han d'assolir els següents objectius específics:

- Expandir i mantenir d'una línia de cultiu primari de cèl·lules endotelials humanes (HUVEC) i de ratolí (bEND3).
- Caracterització de les dues línies cel·lulars per mitjà d'estudis dels paràmetres morfològics, determinació de la taxa de creixement i la seva capacitat de migració.
- Estimulació de les cèl·lules endotelials perquè secretin la seva pròpia matriu extracel·lular. L'ECM és un factor clau perquè es produeixi l'angiogènesi, ja que permet que les cèl·lules endotelials migrin i fa d'"scaffold" perquè formin estructures tubulars.
- Estudiar l'ECM sintetitzada per mitjà de tècniques d'immunofluorescència. S'utilitzarà un anticòs primari contra la lamina, perquè és un dels components majoritaris de l'ECM.
- Per preparar el PRP, s'ha d'aïllar la fracció plasmàtica de la sang. Per tant, es necessita optimitzar de la velocitat i el temps de centrifugació adients per aïllar la fracció corresponent al PRP.
- Com els factors de creixement que contenen les plaquetes en els grànuls α participen i potencien l'angiogènesi, es vol activar les plaquetes que es troben en el PRP perquè els alliberin. Depenent del procediment que es segueixi per obtenir els factors de creixement, aquests rebran el nom de PRPr o WPr.
- Afegir PRPr o WPr en el medi i determinar el percentatge adient per estimular les cèl·lules endotelials per què formin estructures tubulars.
- Monitoritzar i analitzar el procés de formació d'estructures tubulars a partir d'imatges preses amb un microscopi invertit.

3. Metodologia

La línia cel·lular HUVEC ens la van facilitar l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM). La línia cel·lular bEND3 ens la va facilitar l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). La sang de porc prové de l'escorxador Mafriges S.A. i la sang humana d'una persona voluntària del personal sanitari de l'Hospital Universitari de la Santa Creu (HUSC) de Vic.

En tots els assajos que es descriuen a continuació, abans de cultivar les cèl·lules, hem tractat la superfície dels pous de cultiu per tal de millorar l'adherència. S'ha fet un "coating" amb 0.2% de gelatina de pell bovina en PBS amb un període d'incubació de 2 h.

3.1. Caracterització de les cèl·lules endotelials

L'objectiu d'aquest estudi és conèixer les línies cel·lulars amb les que es treballa. Per fer-ho es realitza (1) un estudi morfològic, (2) s'analitza la taxa de proliferació, (3) la capacitat de migració i (4) la capacitat que tenen les cèl·lules perquè secretin la seva pròpia matriu extracel·lular.

Com es sospita que la línia cel·lular bEND3 ha perdut les característiques i propietats que la defineixen com a cèl·lula endotelial; es farà un anàlisi comparatiu dels resultats obtinguts entre les dues línies per comprovar-ho.

3.1.1. Anàlisi dels descriptors morfològics

S'ha determinat l'àrea, el perímetre, la circularitat ($4\pi \cdot \frac{\text{àrea}}{\text{perímetre}^2}$) i el diàmetre de Feret (distància màxima entre dos punts del perímetre) de 40 cèl·lules endotelials (tant HUVEC com bEND3) adherides a la superfície de cultiu, per cada condició experimental estudiada utilitzant el programari obert ImageJ (accessible a: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) (veure el punt 7.1. de l'Annex de Protocols). Les dades obtingudes s'han descarregat amb format .csv i s'ha calculat la mitjana dels valors amb RStudio.

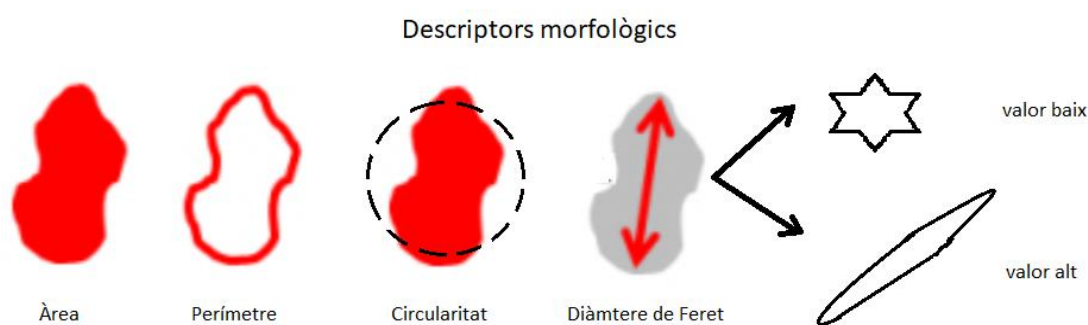


Figura 13. Dibuix explicatiu dels descriptors morfològics. L'àrea és la superfície que cobreix la figura, el perímetre és el contorn de la figura, la circularitat indica com de rodona és una figura i el diàmetre de Feret la distància entre els dos punts més allunyats de la figura. Quan la circularitat és baixa, el diàmetre Feret ens ajuda a definir la forma de la cèl·lula. Font: elaboració pròpia.

Aquests descriptors indiquen com de rodona és una cèl·lula (circularitat propera a 1), o si la forma de la cèl·lula és irregular i allunyada de la rodona (circularitat propera a 0), o bé si és més allargada (diàmetre Feret més llarg) o més estrellada (diàmetre Feret més curt).

3.1.2. Determinació de la taxa de proliferació

A partir de cèl·lules sembrades en pous de 2 cm² (al 50 % de confluència) es va fer una seguiment durant 3-4 dies (depenent de la línia cel·lular), fins que la monocapa és 100% confluent, i un recompte diari manual de diversos camps a 10X (veure el punt 7.2. de l'Annex de Protocols).

3.1.3. Determinació de la capacitat de cobertura de superfície en un model de reparació de ferida

S'ha realitzat per mitjà d'un assaig anomenat "scratch", que consisteix en fer un raspall amb una punta de pipeta quan la monocapa del cultiu està 100% confluent. Posteriorment, es fa un seguiment de la cobertura de la superfície a partir de les cèl·lules de la vora. Aquest model experimental pot reproduir la reparació de superfícies intraluminals dels vasos sanguinis malmesos (veure punt 7.3. de l'Annex de Protocols).

3.1.4. Determinació de la secreció de matriu extracel·lular

La secreció de matriu extracel·lular per formar la làmina basal és una característica típica de les cèl·lules epitelials i per tant, de les cèl·lules endotelials. Per aquest assaig, quan el cultiu està 100% confluent, s'afegeix àcid ascòrbic al medi durant 7-8 dies per afavorir la secreció de col·lagen, un component principal de la làmina basal [36] (veure punt 7.4. de l'Annex de Protocols).

S'ha determinat la presència de laminina, un component de la làmina basal, a l'espai extracel·lular per immunofluorescència indirecta utilitzant un anticòs primari rabbit- α -laminina i un secundari goat- α -rabbit unit al fluoròfor N-488. El fluoròfor N488 s'excita amb llum blava (488 nm) i emet llum verda (541 nm) [37] (veure punt 7.4.1. de l'Annex de Protocols). Es fotografien les preparacions amb un microscopi de fluorescència i es processen les imatges amb l'ImageJ (veure punt 7.4.2. de l'Annex de Protocols).

3.2. Obtenció de PRP

Tai i com s'ha descrit a l'apartat 1.5.1. el PRP és una teràpia alternativa que s'està emprant per curar ferides cròniques. S'ha vist que estimula l'angiogènesi [5,6,7,8,11,16,17,27] i, consegüentment, afavoreix la cicatrització de les ferides. Per aquesta raó, s'ha utilitzat PRP per estimular la formació d'estructures cel·lular en un cultiu de cèl·lules endotelials in vitro.

3.2.1. Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang humana

El HUSC ens ha facilitat uns frotis de 3 fraccions de la sang: limfòcits (L), la part superior del plasma (1/3) i la inferior (2/3). S'ha realitzat un recompte amb l'ImageJ per determinar si aquell plasma és PRP (veure punt 7.5. de l'Annex de Protocols).

Etulain et. Al., Bertrand-Duchesne et. Al. i Martínez et. Al., han descrit tres maneres diferents de preparar factors de creixement alliberats per les plaquetes a partir de PRP: PRPr, WPr i PPr [27,38,9].

3.2.2. Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang de porc

En els protocols descrits per Etulain et. Al., Bertrand-Duchesne et. Al. i Martínez et. Al. s'aïllen factors de creixement a partir de sang humana. Com també utilitzem sang de porc i aquesta presenta una densitat diferent a la humana degut a la presència d'un estabilitzant afegit des de l'escorxadador d'origen, s'ha hagut d'optimitzar la velocitat i el temps de centrifugació per separar les 3 fraccions de la sang (veure Protocol X). Però al no aconseguir una fracció de PRP neta (hi havia eritròcits), es va decidir utilitzar Ficol, un reactiu que crea un gradient de densitat que facilita la separació de les 3 fraccions de la sang i, alhora, fa de barrera física entre els eritròcits i les plaquetes (veure punt 7.6. de l'Annex de Protocols).

3.2.3. Preparació de PRPr: Plasma ric en plaquetes amb factors de creixement alliberats per plaquetes

El "Platelet Rich Plasma released" (PRPr) s'obté després de causar la coagulació del PRP amb Ca^{2+} . Es centrifuga, de manera que no té fibrina ni plaquetes, i s'obté una solució conté els factors de creixement que ja hi havia a la sang i els plaquetaris alliberats durant la coagulació (veure punt 7.7. de l'Annex de Protocols).

3.2.4. Preparació de WPr: factors de creixement alliberats per plaquetes en una solució tampó

El "Washed Platelet released" (WPr), primerament s'aïllen les plaquetes del PRP i es resuspenen en una solució tampó per activar-les posteriorment amb Ca^{2+} perquè alliberin els factors plaquetaris (veure punt 7.8. de l'Annex de Protocols). De manera que el WPr són factors de creixement alliberats per les plaquetes en una solució tampó.

3.3. Estimulació de la formació d'estructures tubulars

Per desenvolupar un model d'angiogènesi in vitro i poder estudiar la capacitat dels diferents PRP per estimular la formació d'estructures tubulars, s'han hagut de seguir els següents passos: optimització del temps que ha d'estar el cultiu amb un medi sense sèrum i el percentatge de PRP necessari per la formació d'estructures tubulars.

3.3.1. Optimització del temps sense sèrum

El sèrum estimula la proliferació cel·lular. Per reduir l'estimulació pròpia del sèrum i que la resposta que tinguin les cèl·lules durant els assaigs d'angiogènesi es deguin a l'efecte del PRP (veure el punt 7.9.1. de l'Annex de Protocols).

3.3.2. Optimització del percentatge de PRP necessari per a la formació d'estructures tubulars

S'han afegit diferents concentracions de PRP en el medi i s'ha realitzat un seguiment amb microimatges del cultiu a diferents temps. També, s'ha realitzat un estudi curós de cada imatge presa, on s'ha fet un recompte manual del nombre d'alineaments i nombre de cèl·lules per alineament (veure punt 7.9.2. de l'Annex de Protocols).

3.3.3. Concentració proteica del PRP

Com els factors de creixement són proteïnes, s'ha quantificat la concentració absoluta de proteïnes dels diferents PRP mesurant la seva absorbància amb un espectrofotòmetre (veure punt 7.9.3. de l'Annex de Protocols).

4. Resultats i Discussió

4.1. Caracterització de les línies cel·lulars HUVEC i bEND3

Les HUVEC són una línia cel·lular de cèl·lules endotelials dels vasos del cordó umbilical humà i les bEND3 són cèl·lules endotelials dels vasos del sistema nerviós de ratolí.

4.1.1. Anàlisi dels descriptors morfològics

Les cèl·lules de la línia cel·lular HUVEC, a simple vista tenen una morfologia molt homogènia: són bastant poligonals, tenen una mida entre el rang 12-20 μm i no presenten prolongacions citoplasmàtiques (Figura 14 fila superior). Tot i així, en regions de poca confluència (~50%), presenten una forma lleugerament més allargada que en les zones de molta confluència (~100%) on la seva morfologia és més quadrada (Figura 14).

Les cèl·lules de la línia cel·lular bEND3, a simple vista tenen una morfologia poc homogènia, perquè tot i que la gran majoria tenen forma allargada i presenten prolongacions citoplasmàtiques, solen tenir-ne en diferent nombre i mida (Figura 14 fila inferior).

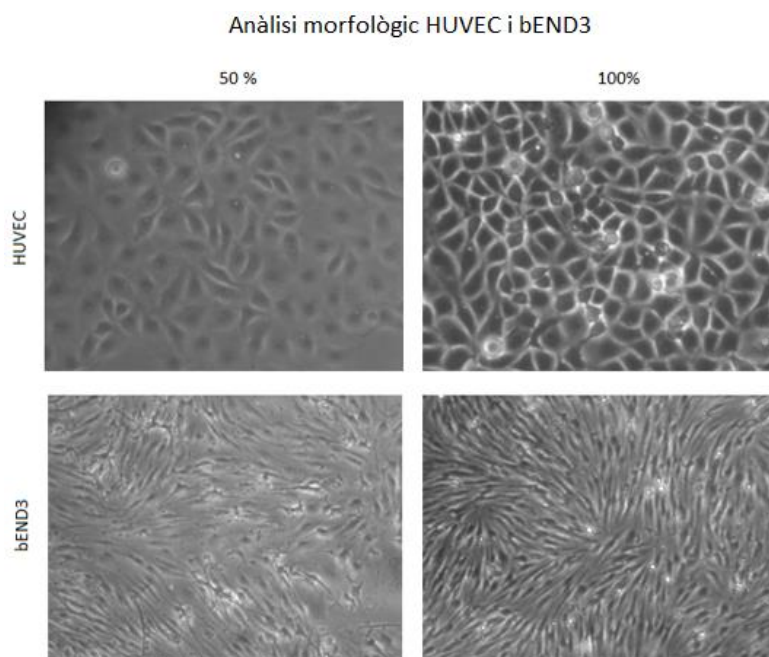


Figura 14. Cultiu de HUVEC i bEND3 a diferents confluències. Cèl·lules sembrades en un coating de gelatina 0.2% a una confluència aproximada del 50% i 100%. Microscopi invertit objectiu 10X. Font: *elaboració pròpia*.

Segons l'anàlisi dels descriptors morfològics realitzat digitalment amb l'ImageJ, les HUVEC són petites, ja que comprenen una àrea mitjana de 0.103 px i un perímetre de 1.146 px; i presenten una morfologia més aviat poligonal però sense ser un cercle perfecte, coincidint amb un valor de circularitat proper a 1 i un valor baix de diàmetre de Feret (Taula 4). A més, com més alta és la confluència més petita és l'àrea que comprenen i més circulars són les cèl·lules.

Per altra banda, les bEND3 tenen una àrea bastant homogènia, sent el valor de la desviació estàndard baix (Taula 4); però el seu perímetre és bastant desigual, amb un valor de 1,578 px de desviació estàndard i, això es deu a la diferència del nombre i la mida de les prolongacions

citoplasmàtiques que hi ha entre aquetes cèl·lules. El valor tant baix de circularitat mitjana i tant alt del diàmetre de Feret (Taula 4) corroboren que les bEND3 presenten una morfologia bastant fusiforme. Tal com ocorre amb les HUVEC, les bEND3 conforme la monocapa és més confluent les cèl·lules són més petites en mida, però per contra també es tornen més allargades.

		Descriptors morfològics				
		Àrea	Perímetre	Circularitat	Feret	
HUVEC	50%	\bar{X}	0,103	1,456	0,621	0,578
		σ	0,366	0,342	0,159	0,157
	100%	\bar{X}	0,069	1,018	0,819	0,384
		σ	0,019	0,138	0,062	0,056
bEND3	50%	\bar{X}	0,309	4,375	0,202	1,856
		σ	0,210	1,578	0,079	0,737
	100%	\bar{X}	0,161	3,284	0,194	1,602
		σ	0,046	0,717	0,049	0,360

Taula 4. Paràmetres morfològics de les HUVEC i les bEND3 (en píxels "px"). S'ha utilitzat el processador d'imatges ImageJ i pels estudis estadístics (\bar{X} , σ) l'RStudio. Les imatges analitzades s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu 10X. N=40. Font: elaboració pròpia.

Aquest estudi reflexa les clares diferències que hi ha entre les dues línies cel·lulars. Les HUVEC són bastant més petites que els bEND3, amb una àrea mitjana de 0,103 px i 0,309 px respectivament. Que les HUVEC tenen una morfologia més homogènia que les bEND3, per això el valor de la desviació estàndard del perímetre mitjà són molt baixos respecte el de les bEND3 (Taula 4). I les HUVEC presenten una forma molt més arrodonida (circularitat: 0,621 px; Feret: 0,578 px) i les bEND3 més allargada (circularitat: 0,202 px; Feret: 1,856 px).

4.1.2. Determinació de la taxa de proliferació

Les HUVEC, a simple vista, sembla que cada 24 h doblen la densitat cel·lular. Si ens fixem en la Figura 15, a les primers 24 h la monocapa presenta una confluència del 20-30%, a les 48 h és del 50-60% i a les 72 h un 85-90%. Quan la monocapa és molt confluent, la velocitat de proliferació es redueix, per això no es veuen gaires diferències entre les 72 i 96 h.

Taxa de proliferació HUVEC

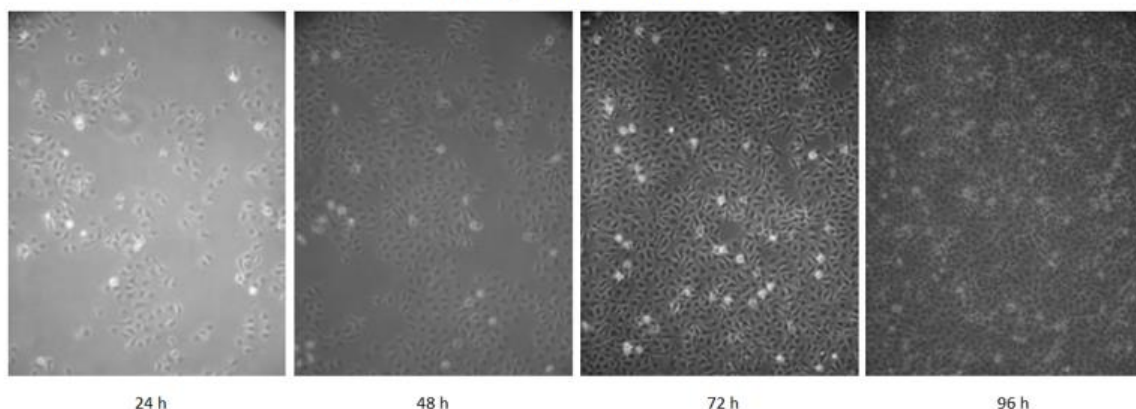
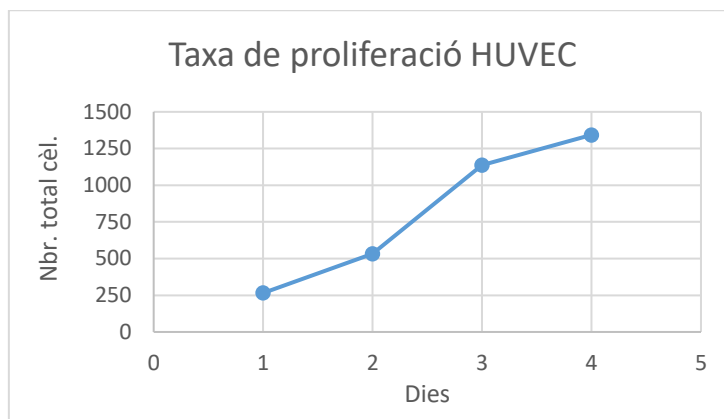


Figura 15. Taxa de proliferació de les HUVEC. HUVEC sembrades a la mínima densitat en un coating de gelatina 0.2%. Imatges del cultiu a diferents temps 24, 48, 72 i 96 h. Microscopi invertit objectiu: 10X. Font: elaboració pròpia.

En el recompte cel·lular (Gràfic 1), es veu com a les primeres 72 h la proliferació cel·lular és exponencial i que en aquets punt, es comença a reduir. Això succeeix perquè quan el cultiu es troba al voltant del 20% de confluència, les cèl·lules entren en la fase exponencial del cicle de creixement, on en cada divisió les cèl·lules doblen el seu nombre. Sobre el 75% de confluència, la velocitat de creixement comença a disminuir perquè s'han consumit la majoria dels nutrients del medi, s'han acumulat els productes de rebuig i perquè les cèl·lules estableixen contacte cèl·lula-cèl·lula i s'envien senyals inhibidores que aturen la proliferació. Aleshores, es diu que les cèl·lules han entrat en la fase de Plateau.



Gràfic 1. Taxa de proliferació de les HUVEC. Recompte cel·lular realitzat de forma manual a diferents temps 24, 48 i 72 h. Es representa el nombre mitjà de tots els recomptes realitzats. Les imatges analitzades s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu 10X. N=5. Font: elaboració pròpia.

Les bEND3, a simple vista, en les primeres 48 h no s'aprecia gairebé creixement (Figura 16). A les 24 h la confluència és del ~10-15% i a les 48 h d'un ~20-25%. Però a les 72 h es veu que la població cel·lular s'ha duplicat i el mateix succeeix al temps 96 h.

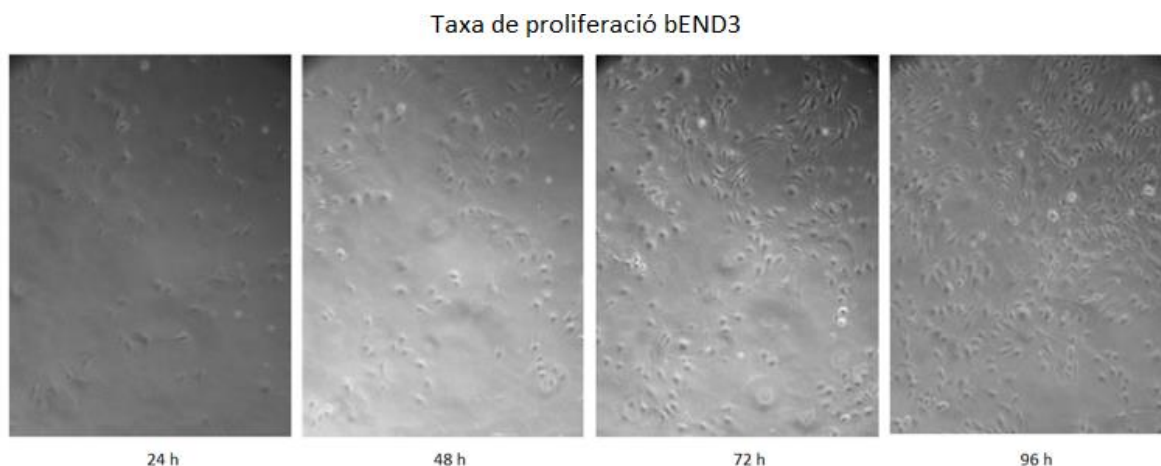
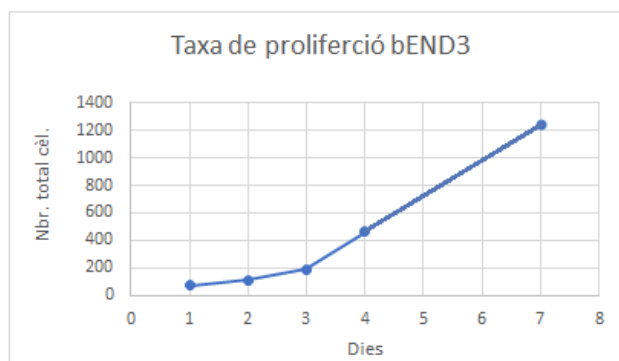


Figura 16. Taxa de proliferació de les bEND3. bEND3 sembrades a la màxima sonfluència en un coating de gelatina 0.2%. Imatges del cultiu a diferents temps 24, 48, 72 i 96 h. Microscopi invertit objectiu 10X. Font: elaboració pròpia.

El retard que experimenten les cèl·lules durant les primeres 48 h es reflexa en el recompte cel·lular representat en el Gràfic 2. La transició entre la fase d'adaptació al medi i l'entrada a la fase exponencial ocorre entre les 48-72 h i, a partir d'aquest moment el creixement és exponencial. Al temps 168 h, la monocapa presentava la màxima confluència. Com no es tenen

dades dels temps 120 i 144 h, no sabem en quin moment les bEND3 disminueixen la seva taxa de proliferació i entren a la fase de Plateau.



Gràfic 2. Taxa de proliferació de les bEND3. Recompte cel·lular realitzat de forma manual a diferents temps 24 h, 48 h, 72 h, 96 h i 168 h. Es representa el nombre mitjà de tots els recomptes realitzats. Les imatges analitzades s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu 10X. N=5. Font: elaboració pròpia.

Segons aquest estudi, les HUVEC tenen una velocitat de proliferació més elevada que les bEND3, perquè arriben a la màxima confluència en menys temps (96 h i 168 h respectivament). També es podria dir que les HUVEC presenten una millor capacitat d'adaptació al medi, perquè a les 24 h ja comencen a proliferar i les bEND, en canvi, necessiten 72 h per adaptar-se i començar a proliferar.

4.1.3. Determinació de la capacitat de cobertura de superfície en un model de reparació de ferida

Les HUVEC aparentment no presenten capacitat de migració, perquè tal com es veu a la Figura 17, l'àrea del raspat (mireu els valors de la Taula 5) es redueix perquè les cèl·lules del límit proliferen en la direcció a tancar-la.

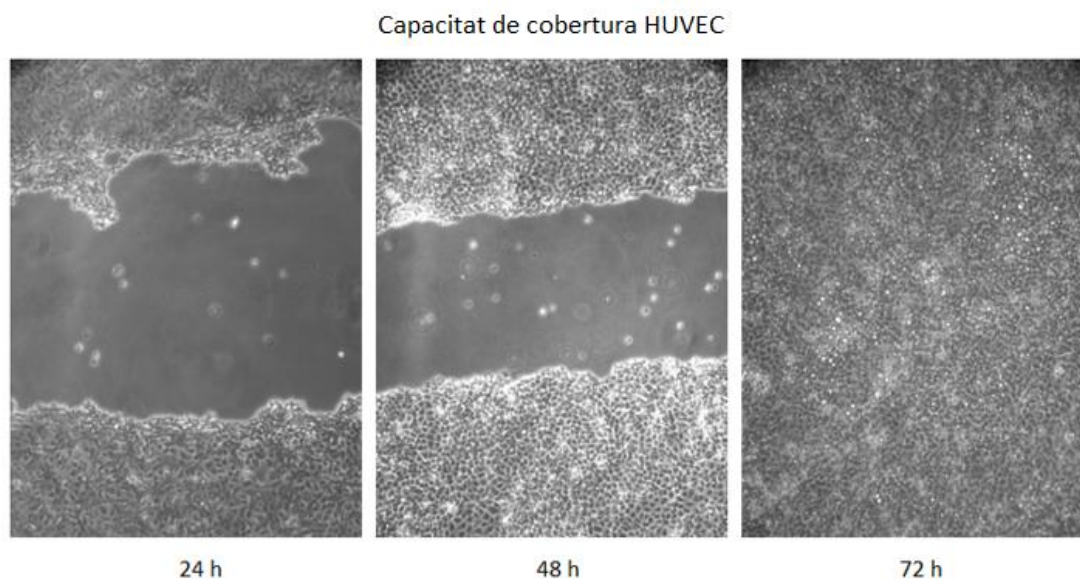


Figura 17. Capacitat de cobertura de superfície de les HUVEC a diferents temps (0, 24 i 48 h). Cèl·lules sembrades a màxima confluència en un coating de gelatina 0.2%. Microscopi invertit objectiu 10X. Font: elaboració pròpia.

Àrea del raspat HUVEC			
	Dia-0	Dia-1	Dia-2
\bar{X}	69,72	38,89	0

Taula 5. Àrea mitjana del raspat a diferents temps (0, 24 i 48 h). Les imatges analitzades s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu 10X. Software: ImageJ. N=5. Font: elaboració pròpia.

Les bEND3 sembla que tenen certa capacitat de cobertura, perquè al temps 24 h de la Figura 18 es veuen algunes cèl·lules en el centre del raspat. Probablement, l'àrea del raspat (mireu els valors de la Taula 6) es redueix tant per la proliferació de les cèl·lules del límit com la de les cèl·lules que han migrat.

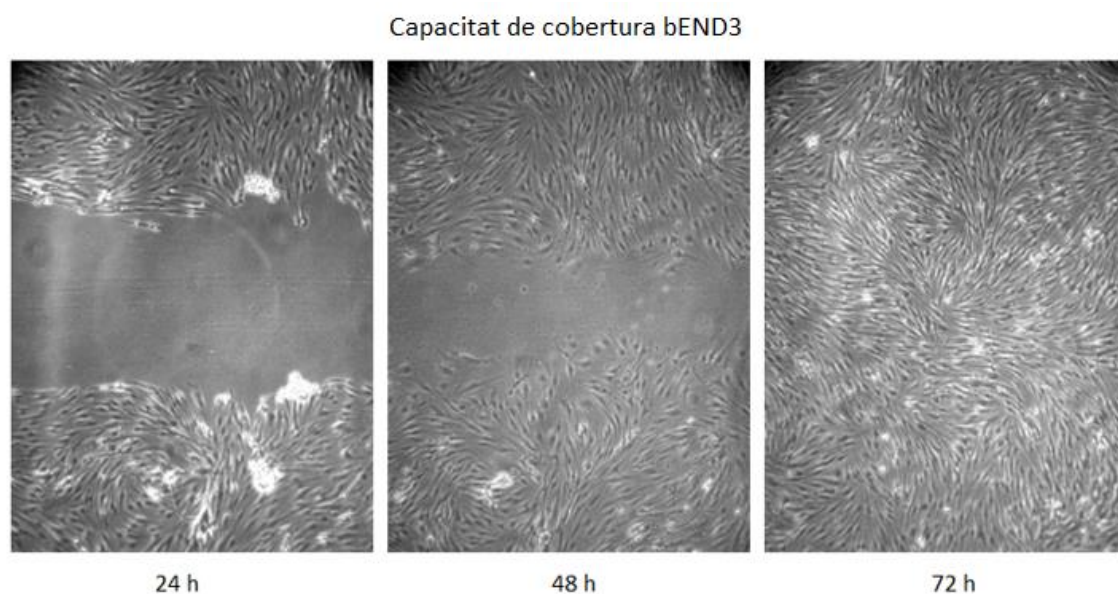


Figura 18. Capacitat de cobertura de superfície de les bEND3 a diferents temps (0, 24 i 48 h). Cèl·lules sembrades a màxima confluència en un coating de gelatina 0.2%. Microscopi invertit objectiu 10X. Font: elaboració pròpia.

Àrea del raspat bEND3			
	Dia-0	Dia-1	Dia-2
\bar{X}	53,3	23,9	0

Taula 6. Àrea mitjana del raspat a diferents temps (0, 24 i 48 h). Les imatges analitzades s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu 10X. Software: ImageJ. N=5. Font: elaboració pròpia.

Tot i que ambdues línies han aconseguit cobrir completament el raspat, les bEND3 mostren una millor capacitat de migració perquè han reduït més del doble l'àrea del raspat en 24 h (l'àrea s'ha reduït 2,23 vegades), mentre que les HUVEC no han aconseguit reduir l'àrea del raspat a la meitat (l'han reduït 1,79 vegades).

4.1.4. Secreció de la matriu extracel·lular en presència d'àcid ascòrbic

En la preparació d'immunofluorescència amb la línia cel·lular HUVEC cultivada de 7 a 10 dies al 100% de confluència en presència d'àcid ascòrbic per afavorir la secreció de matriu extracel·lular, s'ha detectat presència de laminina com es pot veure a la Figura 19. Aquests

cossos verds, creiem que reflecteixen la presència de laminina intracel·lular en cèl·lules que no s'han eliminat al fer els rentats de la descel·lularització i al fixar-la al paraformaldehid després han romàs en la preparació. Si ens fixem detalladament en la segona imatge de la Figura 19, al fons es veu l'esquelet de les cèl·lules en cultiu. Com les cèl·lules mortes s'han tenyit molt, emeten una intensitat de fluorescència elevada (334 nm), i les del fons poca (112 nm). És possible que la fluorescència de les cèl·lules no eliminades interfereixin amb la fluorescència del fons de la preparació i no podem veure si s'ha produït laminina.

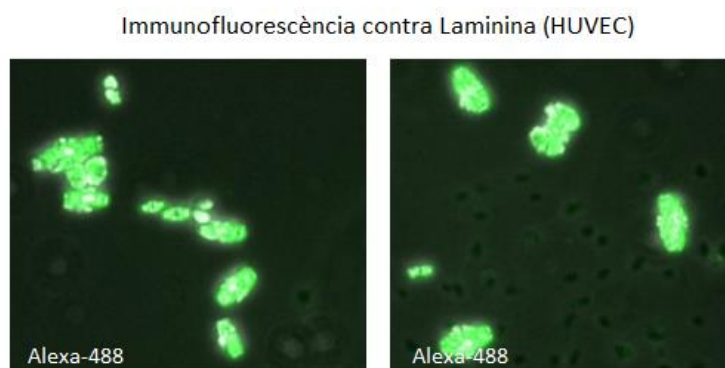


Figura 19. Preparació d'immunofluorescència contra la laminina amb les HUVEC. En verd s'indica la laminina que han estat capaces de secretar les HUVEC durant 7 dies. Fluoròfor Alexa-488. Microscopi de fluorescència: Leica DM8. Objectiu: 20 X. Software: ImageJ. Font: elaboració pròpia.

Segons les imatges de la Figura 20, s'ha detectat presència de laminina (marcat en verd) majoritàriament just al costat del nucli en les cèl·lules de la línia bEND3. Això ens fa pensar que les cèl·lules han produït laminina, però que no han estat capaces de secretar-la i, per tant, es troba emmagatzemada dins les cèl·lules, probablement a l'aparell de Golgi, que té habitualment aquesta localització. Tot i que a la imatge del centre es detecta la presència de laminina en l'espai que hi ha entre els nuclis.

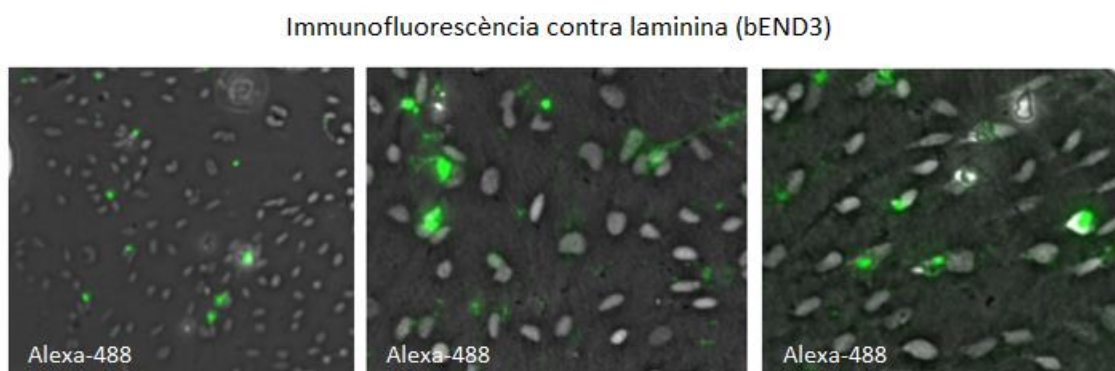


Figura 20. Preparació d'immunofluorescència contra la laminina amb les bEND3. En verd s'indica la laminina que han estat capaces de secretar les bEND3 durant 7 dies. Fluoròfor: Alexa-488. Microscopi de fluorescència: Leica DM8. Objectiu: 10X (esquerra), 20 X (mig i dreta). Software: ImageJ. Font: elaboració pròpia.

A l'haver descel·lularitzat abans de fer la immunofluorescència, es creu que la possible matriu extracel·lular secretada s'ha malmès i, consegüentment, s'ha perdut informació. Solament es pot saber que les cèl·lules han produït laminina però no si han estat capaces de secretar-la.

Després d'haver estudiat i caracteritzat ambdues línies cel·lulars, la que presenta unes característiques més semblants a les cèl·lules endotelials són les HUVEC. Per aquest motiu, els assaigs d'angiogènesi solament es faran amb les HUVEC.

4.2. Obtenció de PRP

4.2.1. Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang humana

El recompte de plaquetes en sang i de les fraccions corresponents al plasma i als limfòcits un cop centrifugada, es recullen a la Taula 7. S'ha vist que conforme augmenta la velocitat de centrifugació en la preparació del plasma se redueix la quantitat de plaquetes al plasma (fraccions 1/3 i 2/3, tal i com s'indica a l'esquema) i, consegüentment, augmenta la seva concentració a la fracció dels limfòcits (fracció L) (Taula 7). També s'aprecia que en la majoria de les preparacions la fracció del plasma 1/3 té més nombre de plaquetes que 2/3.

Recompte de plaquetes de mostres sanguínies humanes

	sang	1500 L	1500 1/3	1500 2/3	2500 L	2500 1/3	2500 2/3	3500 L	3500 1/3	3500 2/3
PACIENT-1	34	132	85	49	159	23	12	125	7	12
PACIENT-2	38	258	187	96	364	13	12	148	14	6
PACIENT-3	59	133	168	55	417	16	6	206	18	22

Taula 7. Recompte de plaquetes en sang i de les fraccions del plasma i els limfòcits. S'han analitzat mostres sanguínies de 3 pacients al prepara un frotis de cada fracció (plasma: 2/3 i 1/3; i limfòcits: L) i de la pròpia sang sense centrifugar. De cada preparació s'ha fet el recompte de 5 camps diferents. Aquesta taula recull els valors mitjans dels recompte. Les imatges que s'han analitzat s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu de 40X. Software: ImageJ. N=5. Font: elaboració pròpia.

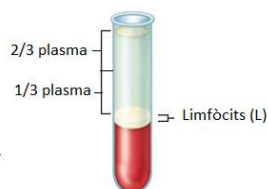


Figura 21. Fraccions de la sang utilitzades pel recompte de plaquetes. Font: Figura 19.1. del llibre *Principles of Anatomy and Physiology* (modificada)

Per valorar quina de les 3 velocitats utilitzades per centrifugar la sang és la més idònia per obtenir PRP, es comparen els valors de la fracció del plasma 1/3 – perquè és la fracció del plasma amb més nombre de plaquetes – i els de la sang. Aleshores, es veu com el plasma centrifugat a 1500 g conté de 3-4 cops més volum de plaquetes que la sang i, per tant, es podria considerar PRP.

4.2.2. Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang de porc

Al centrifugar la sang de porc a 180 g durant 10 minuts – velocitat proposada per Etulain et. al. [27] – per preparar PRP (Figura 22A) no s'ha obtingut una fracció de plasma neta, hi ha molts eritròcits i limfòcits presents. Per aquesta raó, es va decidir centrifugar a la mateixa velocitat però afegir Ficol, perquè és un reactiu que crea un gradient de densitat que facilita la separació de les 3 fraccions de la sang i, alhora, fa de barrera física entre els eritròcits i les plaquetes, de manera que ens assegurem obtenir una fracció plasmàtica neta (Figura 22B).

Donat l'èxit de centrifugar la sang de porc amb Ficol, s'ha utilitzat per centrifugar la sang i obtenir PRP per preparar els diferents alliberats de factors de creixements per les plaquetes (PRPr i WPr).

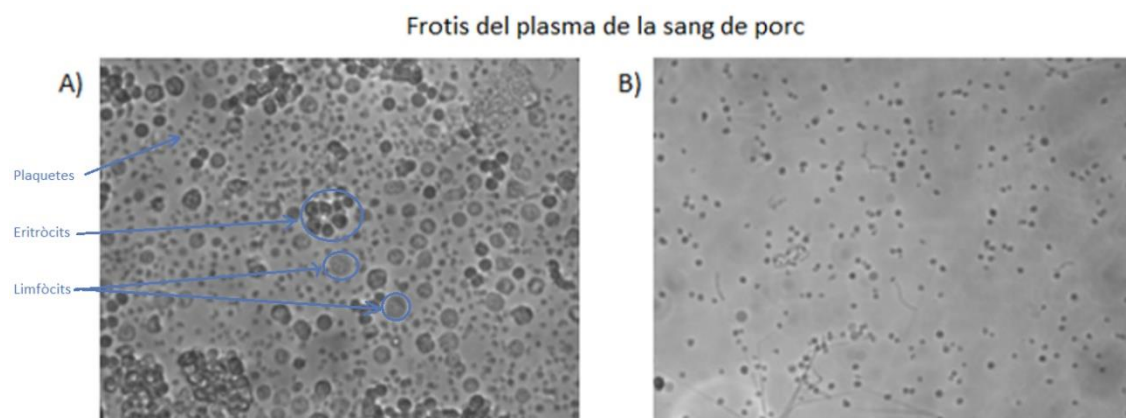


Figura 22. Frotis del plasma de la sang de porc. Fraccions plasmàtiques de sang centrifugada a 180 g durant 10 minuts sense Ficol (A) i amb Ficol (B). Microscopi invertit objectiu 10X. Font: elaboració pròpia.

4.3. Assaigs d'angiogènesi

En els assaigs d'angiogènesi, després d'afegir PRPr o WPr al medi esperem que les cèl·lules comencin a alinear-se una darrera l'altre i que acabin descrivint un cercle. Aleshores, també esperem que les cèl·lules es repleguin sobre si mateixes per formar una estructura tubular (formació el lumen).

4.3.1. Optimització del temps sense sèrum

Les HUVEC després d'estar 4 h en un medi sense sèrum no presenten cap canvi morfològic aparent. En canvi, a les 6 h d'estar en un medi amb sèrum les HUVEC presenten una morfologia lleugerament diferent, més allargada i, aquest canvi és més notable conforme passen més temps en un medi sense sèrum (Figura 23). Com en els assaigs d'angiogènesi no ens interessa que el canvi morfològic que experimentin les cèl·lules es degui a la falta de sèrum en el medi. Les cèl·lules s'incubaran en un medi sense sèrum un període de 4 h abans de procedir amb l'assaig.

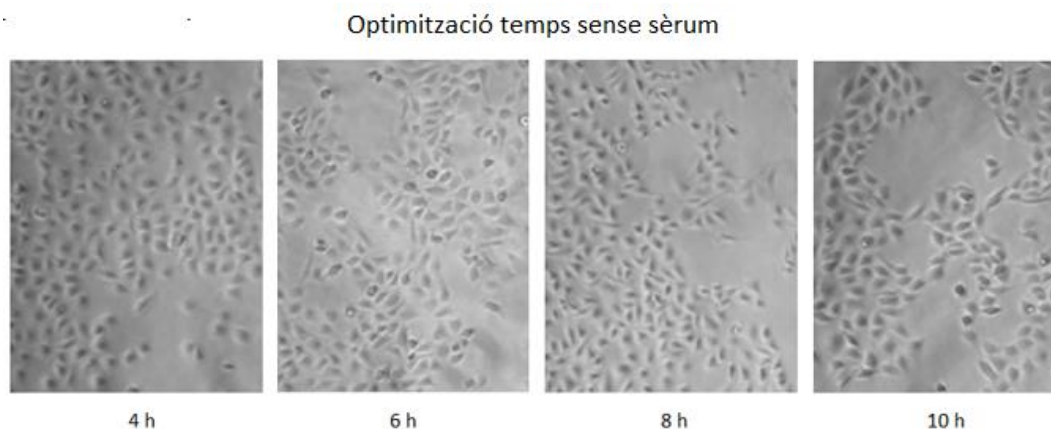


Figura 23. Imatges del cultiu a diferents temps d'estar en un medi sense sèrum. Temps 4, 6, 8 i 10 h. Línia: HUVEC. Microscopi invertit objectiu 10X. Font: elaboració pròpia.

4.3.2. Estimulació de la formació d'estructures tubulars amb PRPr a partir de sang de porc

A les 4 h d'haver afegit PRPr al medi, es va formar una malla de fibrina (Figura 24) que ens impossibilitava fer un seguiment del possible procés d'angiogènesi que es produís a la placa. Per aquest motiu, no s'ha emprat PRPr en assaigs d'angiogènesi posteriors.

La formació d'aquesta malla de fibrina no ens va sobtar perquè el PRPr té plasma i factors de creixement i de coagulació. Com un dels components del plasma és el fibrinogen, quan s'han activat les plaquetes i han alliberat el contingut dels seus grànuls, els factors de coagulació alliberats han transformat el fibrinogen a fibrina i, consegüentment, s'ha format aquesta malla (Figura 24). A més, aquesta malla de fibrina es col·loca sobre la superfície de les ferides per millorar el seu procés de curació.

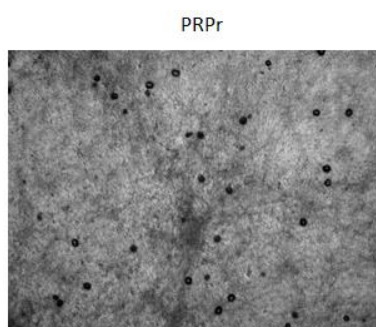


Figura 24. Assaig d'angiogènesi amb PRPr. A les 4 h d'haver addicionat PRPr al medi s'ha format una malla de fibrina. Microscopi invertit objectiu 10X. Font: elaboració pròpia.

4.3.3. Controls

En el control C1 (Figura 25), - en absència de factors de creixement-, les cèl·lules a les 2 i 4 h d'haver iniciat l'assaig d'angiogènesi, presenten un lleuger canvi en la seva morfologia, són una mica més allargades. A les 6 h, es pot veure com algunes cèl·lules han desenvolupat petites prolongacions citoplasmàtiques. Aquests canvis morfològics eren d'esperar, perquè les cèl·lules porten bastantes hores amb un medi sense sèrum.

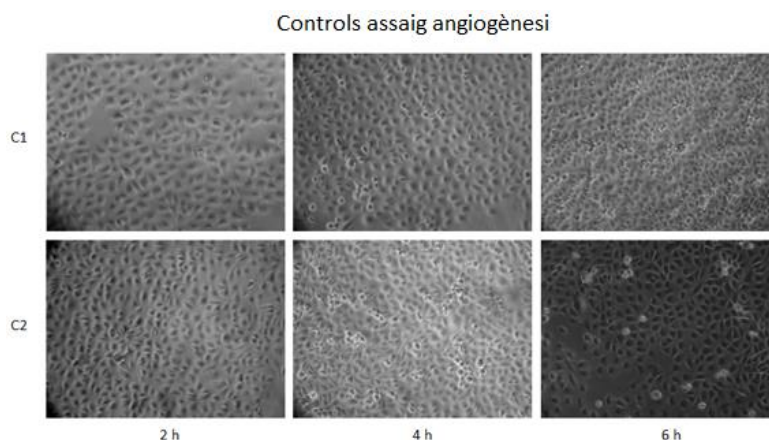


Figura 25. Controls assaigs d'angiogènesi. C1: medi sense sèrum. C2: $\frac{1}{2}$ medi sense sèrum + $\frac{1}{2}$ Tyrode's. Seguiment a diferents temps: 2, 4 i 6 h. Aquests temps corresponen a l'inici de l'assaig d'angiogènesi, però les cèl·lules ja portaven 4 h en un medi sense sèrum. Microscopi invertit objectiu: 20X. Font: elaboració pròpia.

En el control C2 (Figura 25), no es veu cap canvi aparent en les cèl·lules aquest control és molt important, perquè com el WPr és Tyrode's buffer amb factors de creixement, ens permet descartar que els canvis que es produeixen en els assaigs d'angiogènesi estan influenciats per la presència de Tyrode's al medi.

4.3.4. Estimulació formació d'estructures tubulars amb la fracció WPr a partir de sang de porc

Si mirem la Figura 26, a simple vista quan solament hi ha WPr al medi (condició 100%), les cèl·lules comencen a alinear-se però a les poques hores comencen a morir (~4 h). A la condició del 75% de WPr en el medi, les cèl·lules responen al WPr perquè han aconseguit alinear-se i organitzar-se en cercles. A la condició 50% de WPr, les cèl·lules també s'alineen, però dona la sensació que hi ha menys nombre d'alineaments. Mentre que la condició del 25% de WPr, sembla que tingui cap efecte sobre les cèl·lules, ja que no s'aprecien alineaments.

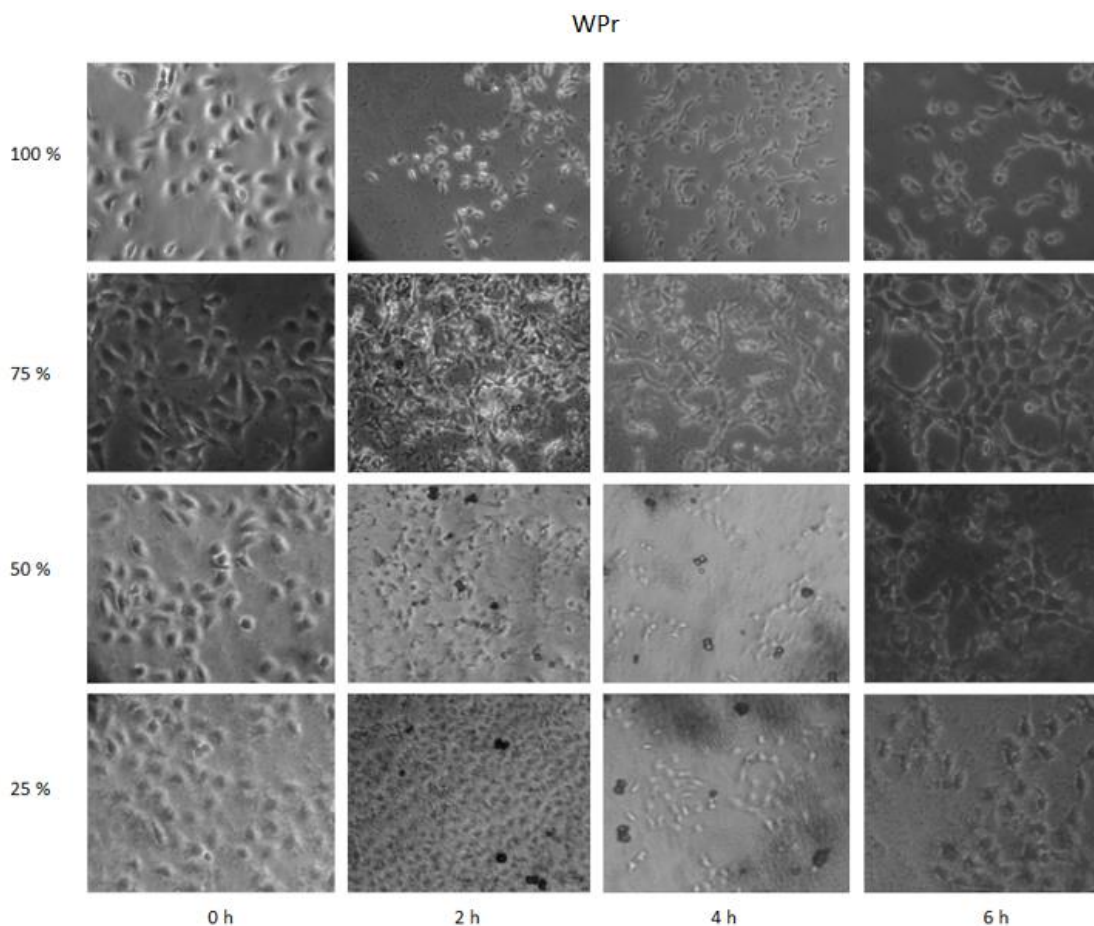


Figura 26. Assaig d'angiogènesi amb WPr obtingut a partir de sang de porc. S'han establert 4 condicions diferents: 100%, 75%, 50% i 25% de WPr en el medi i s'ha analitzat la resposta que tenen les cèl·lules davant l'estímul provocat pel WPr durant el temps (2, 4 i 6h després d'haver afegit WPr al medi). La primera columna (temps 0 h) representa mostra l'estat de les cèl·lules després d'haver estat 4 h amb un medi sense sèrum. *No es mostra el seguiment dels controls que es descriuen al punt 7.8 de l'Annex de Protocols. Microscopi invertit objectiu 20X. N=3. Font: elaboració pròpia.

Segons el recompte d'alineaments recollits a la Taula 8, les HUVEC comencen a respondre a l'efecte del WPr a les 2 h de trobar-se present al medi, és a dir, comencen a visualitzar-se

alineaments. A les 4 h, l'efecte és molt més notable, principalment a la condició 75%, perquè s'han arribat a comptar una mitjana de 27 alineaments/foto. També s'aprecia una bona resposta en la condició del 50%. A les 7 h, l'efecte del WPr en la condició 75% és més o menys la mateixa; en el 100% s'aprecia que el nombre d'alineaments ha disminuït, perquè les cèl·lules han començat a morir a causa de la sobreestimulació del WPr i per la falta de medi; en el 50% s'ha doblat el nombre d'alineaments; i sembla que el WPr ha començat a tenir efecte en la condició 25%.

Recompte alineaments

		Nbr. Alineaments/foto	\bar{X} Cèls/alineament
2 h	12,5%	-	-
	25%	-	-
	50%	-	-
	75%	2	4
	100%	1	5
4 h	12,5%	-	-
	25%	-	-
	50%	4	5
	75%	27	5
	100%	17	5
7 h	12,5%	-	-
	25%	2	3
	50%	5	4
	75%	13	5
	100%	5	4

Taula 8. Estudi dels alineaments de les HUVEC en l'assaig d'angiogènesi amb WPr a partir de la sang de porc. Presenta els valors mitjans dels 3 estudis d'angiogènesi realitzats. S'han analitzat 4 camps diferents de cada condició al llarg del temps de cada estudi d'angiogènesi. Aquelles caselles que presenten un – significa que no s'han albirat alineaments. Les imatges analitzades s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu 20X. Font: elaboració pròpia.

4.3.5. Estimulació de la formació d'estructures tubulars amb la fracció WPr a partir de sang humana

Si mirem la Figura 27, es veu que les cèl·lules tenen una bona resposta l'estímul del WPr tant en la condició 100%, 80% i 75%, perquè s'aprecien molts alineaments i fins i tot, s'organitzen en cercles. En la condició 100%, a les 2h es comencen a veure alineaments. A les 4 h n'hi ha més alineament i alguns han acabat formant un cercle. A les 6 h ja no es veuen alineaments, les cèl·lules han reduït la seva mida i que hagin programat la seva mort (han entrat en apoptosi). A les 8 h ja es veuen cèl·lules trencades. Les condicions 80% i 75% mostren bastants alineaments a les 2 h d'estar en contacte amb el WPr, inclús s'aprecien algunes cèl·lules alineades formant cercles. A les 4 i 6 h, pràcticament totes les cèl·lules estan alineades formant cercles. A les 8 h, les cèl·lules ja no estan organitzades en cercles i s'aprecien pocs alineaments. A més, també s'aprecia que les cèl·lules han disminuït en mida.

A la condició 60% WPr, s'aprecia algun alineament puntual. A les 4 i 6 h, hi ha més alineaments i es comencen a veure cèl·lules alineades formant un semicercle. A les 8 h, ja no es veu pràcticament cap alineament i les cèl·lules han disminuït en mida.

A la condició del 50%, a les 2 h n'hi ha algun alineament puntual. A les 4 i 6 h, han augmentat el nombre d'alineaments, però en aquest cas, no s'arriben a veure alineaments organitzats en cercles.

A la condició 25% a les 2 h, no s'aprecia cap canvi aparent en les cèl·lules. A les 4 h, sembla que presenten una morfologia una mica més allargada i n'hi ha algun alineament puntual. A les 6 i 8 h s'aprecia algun alineament més, però es podria dir que les cèl·lules no tenen una bona resposta a aquesta concentració de WPr.

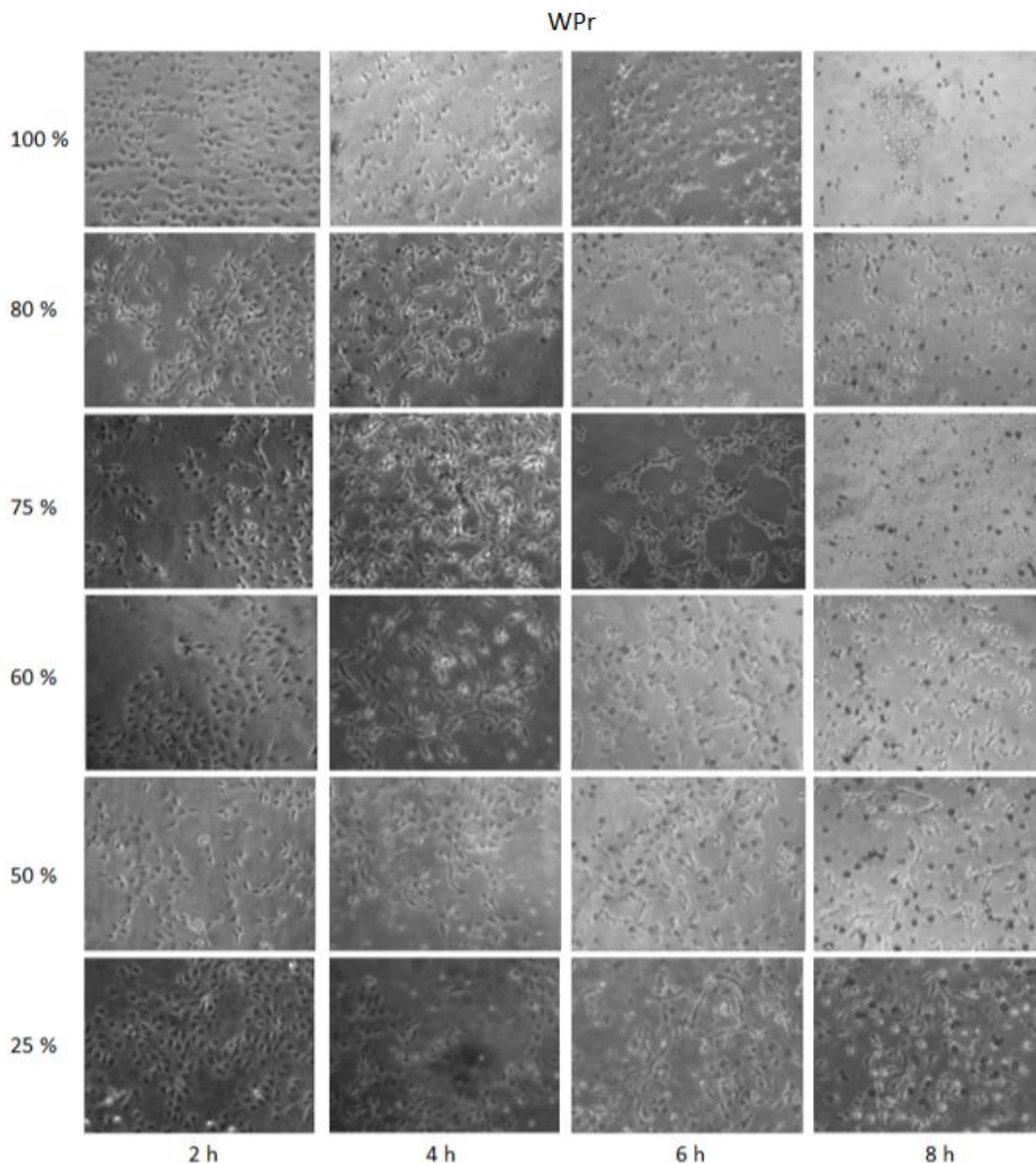


Figura 27. Assaig d'angiogènesis amb WPr obtingut a partir de sang humana. S'han establert 6 condicions diferents: 100%, 80%, 75%, 60%, 50% i 25% de WPr en el medi i s'ha analitzat la resposta que tenen les cèl·lules davant l'estímul provocat pel WPr durant el temps (2, 4, 6 i 8 h després d'haver afegit WPr al medi). *No

es mostra el seguiment dels controls que es descriuen al punt 7.8 de l'Annex de Protocols ni el temps 0 h (després de la incubació de 4 h sense sèrum). N=2. Microscopi invertit objectiu 20X. Font: elaboració pròpia.

Segons el recompte d'alineaments recollits a la Taula 9, en totes les condicions, les HUVEC comencen a respondre a l'efecte del WPr a les 2 h de trobar-se present al medi. A les condicions 75, 80 i 100% hi ha un gran nombre d'alineaments tenint en compte el poc temps que porta el WPr al medi. A les 4 h, l'efecte és molt més notable, totes les condicions tenen un gran nombre d'alineaments i també ha incrementat el nombre de cèl·lules per alineament. A les 6 h, el nombre d'alineaments i de cèl·lules per alineament també ha incrementat, menys en el cas del 100%, que ja no s'aprecien alineaments. A les 8 h, hi ha hagut una disminució general del nombre d'alineaments. Tot i que és molt notable en les condicions 80 i 75%, pràcticament no hi ha alineaments.

Recompte alineaments			
	Nbr. Alineaments/foto	\bar{X} Cèls/alineament	
2 h	25%	3	3
	50%	6	4
	60%	8	5
	75%	11	5
	80%	17	5
	100%	7	5
4 h	25%	5	4
	50%	7	4
	60%	9	4
	75%	10	4
	80%	15	5
	100%	7	3
6 h	25%	5	5
	50%	10	4
	60%	9	5
	75%	17	6
	80%	12	6
	100%	-	-
8 h	25%	5	4
	50%	11	4
	60%	3	3
	75%	2	3
	80%	1	3
	100%	-	-

Taula 9. Estudi dels alineaments de les HUVEC en l'assaig d'angiogènesi amb WPr a partir de sang humana. Presenta els valors mitjans dels 3 estudis d'angiogènesi realitzats. S'han analitzat 4 camps diferents de cada condició al llarg del temps de cada estudi d'angiogènesi. Aquelles caselles que presenten un – significa que no s'han albirat alineaments. Les imatges analitzades s'han pres amb un microscopi invertit amb l'objectiu 20X. Font: elaboració pròpia.

Tant en els assaigs d'angiogènesi amb sang de porc com amb sang humana s'han vist respostes molt similars:

- Pel que fa a la confluència de la monocapa, en regions on la confluència és superior al 80% es detecten pocs alineaments. Això es podria deure que les cèl·lules no tenen tanta llibertat de moviment al estar unes al costat de les altres. Quan la confluència es

del 50-75% s'han detectat bastants alineaments amb una mitjana de cèl·lules 5-6 cèl·lules/alineament, tot i que s'han arribat a veure de fins 10 cèl·lules/alineament. Quan la confluència es inferior al 50% també es detecten alineaments, però en menys mesura i de menys cèl·lules/alineament, normalment 3 cèl·lules/alineament. Una possible explicació seria que al estar les cèl·lules més separades, no estableixen els contactes cèl·lula-cèl·lula necessaris per alinear-se.

- Pel que fa al temps des de que s'ha afegit WPr al medi s'ha vist que conforme passa el temps els alineaments presenten més nombre de cèl·lules, però aquestes cèl·lules són més petites, principalment nucli i sembla que comencin a entrar en apoptosi. Té sentit que això ocorri, perquè els factors de creixement estimulen la formació d'estructures tubulars i perquè es formin necessiten estar alineades. Que les cèl·lules entrin en apoptosi es pot deure a la sobrestimulació causada pel WPr.
- Pel que fa al percentatge de WPr, com més WPr hi ha al medi més alineaments i amb major nombre de cèl·lules es detecten. També, conforme més WPr hi ha al medi més aviat es comencen a detectar alineaments.
- També en tots dos assaigs, tot i filtrar el WPr abans d'afegir-ho al medi, a les 2 h en el cas del WPr obtingut de la sang de porc i a les 4 h del de sang humana, apareixen uns cossos negres estranys en el medi. Aquests cossos estranys no es deuen a una contaminació del medi sense sèrum ni del Tyrode's, perquè no s'aprecien en els controls (Figura 24). Així que l'explicació més probable de la formació d'aquests cossos és que alguns factors de creixement o fragments romanents de plaquetes del WPr s'hagin agregat.

El estudi morfològic realitzat a l'apartat 4.1. és molt important perquè ens ha permet conèixer la morfologia de la línia cel·lular HUVEC i així, detectar amb més precisió els canvis morfològics que pateixen les cèl·lules en resposta a substàncies proangiogèniques com el WPr.

4.3.6. Concentració proteica del PRPr i PWPr

Segons la Taula 10, el PRPr otingut a partir de sang de porc és la preparació de factors de creixements que més contingut proteic té, perquè és el que en la lectura d'absorbància té un valor més alt. Això es deu, a que el PRPr a part de contenir els factors de creixement alliberats per les plaquetes també conté proteïnes plasmàtiques. Mentre que el WPr al ser factors de creixement en Tyrode's la lectura d'absorbància dona un valor de concentració proteica més baix. Es pot observar que el WPr obtingut a partir de sang humana té una concentració de proteïnes lleugerament superior que el de porc.

Abs			
	PRPr (porc)	WPr (porc)	WPr (humà)
1/250	0,464	0,103	0,529

Taula 10. Valors absorbància PRPr i WPr. S'ha calculat la concentració de proteïnes del PRPr i WPr de porc i el WPr de amb un espectrofotòmetre utilitzant una longitud d'ona 280 nm (UV), espectre al que absorbeixen llum les proteïnes. *Font: elaboració pròpia.*

5. Conclusió

Al caracteritzar les línies cel·lulars HUVEC i bEND3, hem pogut determinar que les HUVEC són les cèl·lules més adients per realitzar assaigs d'angiogènesi, perquè la seva morfologia i disposició en l'espai – quan proliferen es col·loquen unes al costat de les altres, mantenint sempre el contacte – són les pròpies de l'endoteli vascular.

Tot i que en el model d'angiogènesi no hem pogut testar el PRP de pacients amb ferides cròniques, si que hem pogut testar l'efecte dels factors de creixement alliberats per plaquetes aïllades a partir de PRP.

Hem demostrat que podem realitzar assaigs d'angiogènesi sense la necessitat d'una cobertura de Matrigel en la superfície – com es proposa en la majoria de bibliografia disponible – perquè les cèl·lules han aconseguit alinear-se i organitzar-se en cercles, que és la disposició prèvia que adquireixen les cèl·lules abans de formar estructures tubulars amb lumen.

Hem optimitzat el model d'obtenció de PRP amb el màxim nombre de plaquetes possible que s'utilitza ara a la Unitat de cures de l'Hospital Universitari de la Santa Creu de Vic (HUSC).

6. Visió personal i perspectives de futur

Trobo que és un projecte amb molt de potencial, perquè hi ha una necessitat de curar les ferides cròniques de la pell que disminueixen molt la qualitat de vida de les persones. Per aquest motiu, com a perspectives de futur proposo que aquest projecte:

- Optimitzi el temps que ha d'estar el WPr en el medi per tal d'estimular al màxim la formació d'estructures tubulars i minimitzar la mort cel·lular. Potser seria bo deixar el WPr un període reduït de temps i després afegir medi de cultiu amb poc sèrum per poder seguir la formació d'estructures cel·lulars i evitar la mort cel·lular.
- També proposo fer un banc de dilucions del PRPr i a partir d'aquí fer assaig d'angiogènesi amb diferents percentatges d'aquella dilució. Així s'aconseguiria evitar la producció de la malla de fibrina i disposar d'un altre preparat de factors de creixement alliberats per plaquetes, que a més, ha donat molts bons resultats segons moltes publicacions recents. Una altra possibilitat seria intentar retirar la malla a l'hora de fer un seguiment de la morfologia a l'estructuració de les cèl·lules.
- I per últim proposo continuar amb l'estimulació de matriu extracel·lular, perquè si s'aconseguís produir-ne es podrien realitzar assaigs d'angiogènesi sobre aquesta matriu, perquè l'ambient en el que es realitzaria l'assaig s'aproparia molt més a com es produeix el procés d'angiogènesi *in vivo*. I en la mateixa línia, afegiria els factors alliberats pel plasma pobre en plaquetes (PPP) – és una altra forma de preparar PRP – perquè és ric en fibrinogen, von Willebrand factor (VWF) i fibronectina, components que formen una scaffold semisòlida que ajuden a la re-epitelització i l'angiogènesi durant la curació d'una ferida *in vivo*.

7. Bibliografia

- [1] Khavkin, J., & Ellis, D. A. (2011). Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics*, 19(2), 229-234.
- [2] Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2017). *Principles of Anatomy and Physiology*. (15th ed.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- [3] Gosain, A., & DiPietro, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World journal of surgery*, 28(3), 321-326.
- [4] Thakur, R., Batheja, P., Kaushik, D., & Michniak, B. (2009). Structural and biochemical changes in aging skin and their impact on skin permeability barrier. In *Skin Aging Handbook* (pp. 55-90). William Andrew Publishing.
- [5] Bia, F. J., Brady, J. P., Brady, L. W., Christy, N. P., Cruse, J. M., Henry, J. B.,... Whitcomb, D. (1987). *Diccionario de medicina: enciclopedia ilustrado*. Madrid: S.A. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA.
- [6] DiPietro, L. A. (2016). Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of leukocyte biology*, 100(5), 979-984.
- [7] Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2018). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706.
- [8] Conde, E. (2017). Validación de un nuevo método de obtención de plasma rico en plaquetas para su aplicación en úlceras cutáneas crónicas (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- [9] Martínez, C. E., Smith, P. C., & Palma Alvarado, V. A. (2015). The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Frontiers in physiology*, 6, 290.
- [10] Gonzalez, A. C. D. O., Costa, T. F., Andrade, Z. D. A., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing-A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91(5), 614-620.
- [11] Häkkinen, L., Larjava, H., & Koivisto, L. (2011). Granulation tissue formation and remodeling. *Endodontic Topics*, 24(1), 94-129.
- [12] Olczyk, P., Mencner, Ł., & Komosinska-Vassev, K. (2014). The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed research international*, 2014.
- [13] Arroyo, A. G., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular research*, 86(2), 226-235.
- [14] Greenhalgh, D. G. (1996). The role of growth factors in wound healing. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 41(1), 159-167.
- [15] Bongard, O., & Bounameaux, H. (1993). Clinical investigation of skin microcirculation. *Dermatology*, 186(1), 6-11.
- [16] Adair, Thomas H., and Jean-Pierre Montani. "Angiogenesis." Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. Vol. 2. No. 1. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
- [17] Bentov, I., & Reed, M. J. (2015). The effect of aging on the cutaneous microvasculature. *Microvascular research*, 100, 25-31.
- [18] Young, B., Heath, J. W., Stevens, A., Lowe, J. S., Wheater, P. R., & Burkitt, H. G. (2000). *Wheater's functional histology: A text and colour atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- [19] Galley, H. F., & Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia*, 93(1), 105-Harding, 20023.
- [20] Sumpio, B. E., Riley, J. T., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(12), 1508-1512.

- [21] Universidad de Vigo (2003). Atlas de histología vegetal y animal. Recuperat de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/endotelial.php>
- [22] Djonov, V., Baum, O., & Burri, P. H. (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and tissue research*, 314(1), 107-117.
- [23] Šitum, M., Kolic, M., Redzepi, G., & Antolic, S. (2014). Chronic wounds as a public health problem. *Acta medica Croatica*, 68(Suplement 1), 5-7.
- [24] Singh, S., Young, A., & McNaught, C. E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 35(9), 473-477.
- [25] Harding, K. G., Morris, H. L., & Patel, G. K. (2002). Healing chronic wounds. *Bmj*, 324(7330), 160-163.
- [26] Cancela A.M., Lana J.F., Annichino-Bizzachi J.M., Belangero W.D., Luzo Â.C.M. (2014) Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) in Treating Chronic Wounds. In: Lana J., Andrade Santana M., Dias Belangero W., Malheiros Luzo A. (eds) Platelet-Rich Plasma. Lecture Notes in Bioengineering. Springer, Berlin, Heidelberg
- [27] Etulain, J., Mena, H. A., Meiss, R. P., Frechtel, G., Gutt, S., Negrotto, S., & Schattner, M. (2018). An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties. *Scientific reports*, 8(1), 1513.
- [28] Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B., & Rodeo, S. A. (2009). Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American journal of sports medicine*, 37(11), 2259-2272.
- [29] Lacci, K. M., & Dardik, A. (2010). Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *The Yale journal of biology and medicine*, 83(1), 1.
- [30] Roubelakis, M.G., Trohatou, O., Roubelakis, A. et al. *Stem Cell Rev and Rep* (2014) 10: 417. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9494-8>
- [31] Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2017). Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research*, 58(1-2), 81-94.
- [32] Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., & Akhtar, N. (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical chemistry*, 49(1), 32-40.
- [33] Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. In *Cell Migration* (pp. 23-29). Humana Press.
- [34] Structure and Function of Blood Vessels. (s.d.) Recuperat de: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/structure-and-function-of-blood-vessels/>
- [35] Martinez-Zapata, Maria José, et al. "Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 5 (2016).
- [36] Murad, S., Grove, D., Lindberg, K. A., Reynolds, G., Sivarajah, A., & Pinnell, S. R. (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), 2879-2882.
- [37] BD Biosciences (2015). *Fluorochrome/Laser Reference Poster*. Recuperat de: https://www.bdbiosciences.com/documents/multicolor_fluorochrome_laser_chart.pdf
- [38] Bertrand-Duchesne, M. P., Grenier, D., & Gagnon, G. (2010). Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *Journal of periodontal research*, 45(1), 87-93.
- [39] Vlodavsky, I. (1999). *Current Protocols in Cell Biology: Unit 10.4 Preparation of extracellular matrices produced by cultured corneal endothelial and PF-HR9 endodermal cells*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

7. Annex de Protocols

7.1. Ànlisi dels descriptors morfològics

1. Arrossegat la imatge que es vol processar per carregar-la a l'ImageJ (Figura 1A).
2. Analyze → Tools → ROI Manager: s'obrirà una finestra com la que es veu a la Figura 1B.
3. Seleccionar l'eina per treballar amb polígons (l'eina que s'indica en verd a la Figura 1A).
4. Resseguir el contorn de cada una de les cèl·lules que es vulguin analitzar (Figura 2). En el nostre cas, s'han estudiat 40 cèl·lules de cada línia.
5. Cada cop que es ressegueix el contorn d'una cèl·lula, prémer add del panell ROI Manager indicat a la Figura 1B.
6. Un cop s'ha dibuixat el contorn de les cèl·lules que es vol estudiar, prémer show all.
7. Tornant al panell principal de l'ImageJ (Figura 1A): Analyze → Set measurements: seleccionar area, shape descriptors, perimeter i Feret's diameter.
8. Analyze → Measure. En una nova finestra sortiran els valors dels paràmetres morfològics, descarregar-los en format .csv.

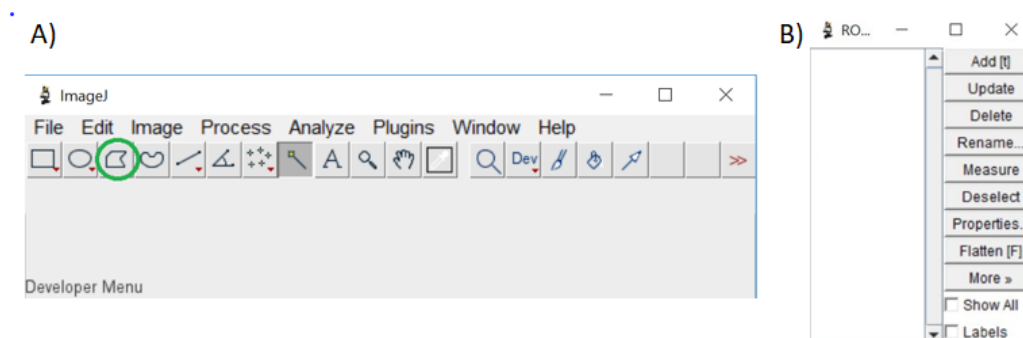


Figura 1. Barra d'eines de l'ImageJ. A) El cercle verd indica l'eina per treballar amb polígons que s'utilitza per resseguir el contorn de les cèl·lules. B) Finestra del ROI Manager.

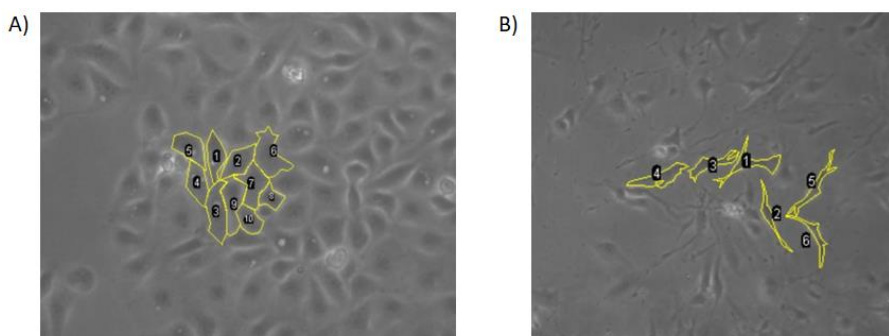


Figura 2. Estudi morfològic amb l'ImageJ. En groc es veu el contorn de les cèl·lules seleccionades. A) HUVEC. B) bEND3.

7.2. Determinació de la taxa de proliferació

1. Sembrar el pou a una confluència baixa (~15%).
2. Realitzar una foto amb un microscopi invertit cada 24 h a diferents camps del pou amb l'objectiu 10X fins que la monocapa sigui 100% confluent.
3. Fer un recompte manual del nombre de cèl·lules de cada fotografia i calcular el valor mitjà (Figura 3).

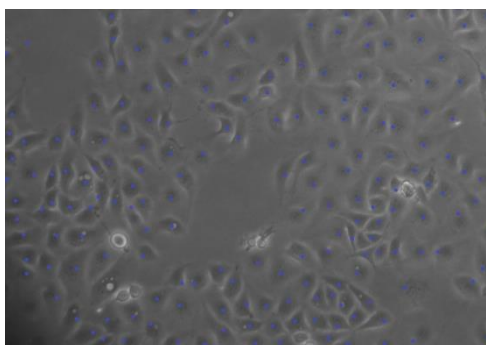


Figura 3. Exemple de recompte manual del nombre de cèl·lules d'un camp. Línia: HUVEC. Objectiu: 10X.

Recorda: si el medi canvia de color cap a taronja-groc (s'acidifica), renovar la meitat del medi amb medi fresc. Solament canvieu la meitat del medi, per no afectar la taxa de proliferació cel·lular amb l'addició de nous nutrients.

7.3. Determinació de la capacitat de cobertura de superfície en un mode de reparació de ferida

1. Quan la monocapa de cultiu està 100% confluent, amb una punta de pipeta de 10 μ L fer un raspat.
2. Seguiment de la cobertura de la ferida amb un microscopi invertit.
3. Analitzar la capacitat de cobertura calculant l'àrea de les imatges amb l'ImageJ (Figura 4) seguint el protocol descrit al punt 7.1. de l'Annex de Protocols.

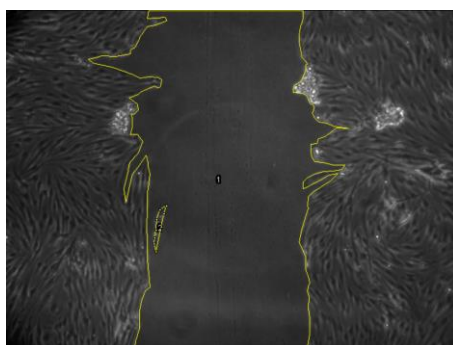


Figura 4. Exemple de com es calcula l'àrea del raspat de la monocapa. En aquest cas concret, s'han calculat dos àrees, la total del raspat i dues cèl·lules que estaven juntes i separades de la vora (cercle groc petit identificat com a 2). Aleshores, s'ha de restar a l'àrea del raspat (identificada com a 1) totes les àrees de les cèl·lules que no es trobi a la vora del raspat per esbrinar l'àrea total del raspat. Línia: bEND3, Objectiu: 10X.

7.4. Determinació de la secreció de matriu extracel·lular

El protocol descrit a continuació s'ha adaptat d'un protocol descrit a *Current Protocols in Cell Biology* [39].

1. Esterilitzar uns cubres amb Etanol al 70%. Deixar-los assecar i col·locar un a cada pou de la placa de 24 pous. *Col·loquem aquest cubres, perquè serà el suport on creixeran les cèl·lules i, posteriorment, es portarà a terme l'immunofluorescència.*
2. Fer el coating amb gelatina al 0.2%. Si s'utilitza una placa de 24 pous, afegir 0.5 mL de gelatina i incubar la placa durant 2 h.
3. Aspirar la gelatina que no s'ha solidificat i fer dos rentats amb 0.5 mL de PBS.
4. Sembrar la placa de cultiu.
5. Quan la monocapa del cultiu sigui 100% confluent, afegir 50 mg/mL d'àcid ascòrbic en PBS estèril al medi. *Recorda: esterilitzar la solució d'àcid ascòrbic 50 mg/mL en PBS, perquè estarà en contacte amb cèl·lules.*
6. Durant els pròxims 8 dies, afegir 50 mg/mL d'àcid ascòrbic en PBS estèril al medi cada 1-2 dies. *Recorda: prepara la solució d'àcid ascòrbic 50 mg/mL en PBS cada cop que s'afegeixi al medi, perquè l'àcid ascòrbic s'oxida fàcilment. O bé, pots fer alíquotes, guardar-les a -20°C i utilitzar una nova cada cop.*
7. Fer un seguiment amb microimatges amb un microscopi invertit de la deposició d'ECM.

7.4.1. Immunofluorescència contra la laminina

Treballar a una cabina de flux laminar

1. Aspirar el medi i rentar dos cop amb 0.5 mL de PBS.
2. Descel·lularització: afegir 0.5 mL de solució de lisi Triton X-100 + NH₄OH a cada pou. Incubar la placa a temperatura ambient (25°) durant 3-5 minuts.
3. Retirar la solució de lisi i rentar dos cops amb 0.5 mL de PBS.

Passar a treballar a la campana d'extracció de gasos

4. Fixació: 0.5 mL de Paraformaldehid 3.7%. Incubar la placa a temperatura ambient (25°) durant 15 minuts.
5. Retirar el paraformaldehid. Utilitzar el contenidor de no halogenats.
6. Rentar 2 cops amb 0.5 mL de PBS. Descartar el PBS al contenidor de no halogenats, perquè té restes de paraformaldehid.

Treballar amb una cambra fosca

7. Bloqueig: gota de 10 µL 1% BSA en PBS/cubre. Incubar els cubres a temperatura ambient durant 35 minuts.
8. 3 rentats seqüencials en PBS. Entre rentat i rentat retirar l'excés de PBS dels cubres.
9. Incubació amb l'anticòs primari (rabbit- α -laminina): gota de 10 µL d'Ab 1ari/cubre. 1h a temperatura ambient.
10. 3 rentats seqüencials en PBS. Entre rentat i rentat retirar l'excés de PBS dels cubres.
11. Incubació amb l'anticòs secundari (N488 goat- α -rabbit): gota de 10 µL d'Ab 2ari/cubre. 45 minuts a temperatura ambient.
12. Rentats seqüencials: 2 amb PBS i l'última amb H₂O destil·lada. Entre rentat i rentat retirar l'excés de PBS dels cubres.

13. Muntatge de la preparació: preparar el cubre per visualitzar-lo amb el microscopi de fluorescència. Utilitzar un mounting medium especial per fluorescència.

7.4.2. Composició de dues imatges amb l'ImageJ

1. Arrossegat la imatge que es vol processar per carregar-la a l'ImageJ.
2. Image → Color → Arrange Channels: s'obre una finestra com la que es veu a la Figura 5A. Les dues imatges inferiors (new), clics sobre el 1 i selecciona grays, en el 2 selecciona green. La imatge 1 és la corresponent al contrast de fases i la 2 a la fluorescent. Pulsar OK.
3. Imatge → Color → Merge channels: s'obre una finestra com la que es veu a la Figura 5B, en el desplegable C2 (green) selecciona la foto que vols sobreposar. Pulsar OK i es crea una imatge sobreposada.
4. Si es vol ajustar el contrast: Image → Adjust → Brightness/Contrast: i ajustar a plaer.

Recorda: com es treballa amb imatges amb format lif. S'ha d'instal·lar prèviament el *Plugin Bio-Formats* a l'ImageJ.

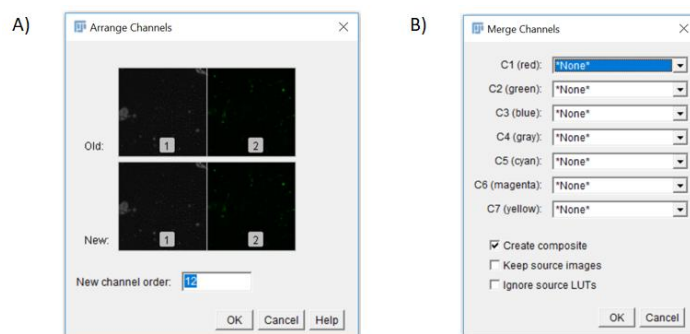


Figura 5. Finestres d'ImageJ per crear una composició d'imatges. A) Finestra corresponent a l'Arrange Channels. B) Finestra corresponent al Merge Channels.

7.5. Optimització d'obtenció de PRP a partir de sang humana

1. Arrossegat la imatge del frotis de PRP que es vol processar per carregar-la a l'ImageJ (Figura 6).
2. Process → Subtract background → el valor que s'utilitza depèn de cada imatge.
3. Image → Type → 8 bit. Pas necessari perquè per utilitzar la funció treshold la imatge ha d'estar en aquest format.
4. Image → Adjust → Treshold → B&W.
5. Process → Binary → Fill in holes. *Solament cal quan s'analitzen les fotos corresponents a la fracció dels limfòcits, perquè quan es canvia el treshold formen cercles. Amb aquesta funció omplim el seu interior i es més senzill per fer el recompte.*
6. Process → Binary → Watershed. Aquesta funció identifica els límits de cada partícula i permet que aquelles que estan en contacte es comptin com a dues partícules diferents.
7. Analyze → Analyze particles → establir el rang. En el nostre cas és 20-150. Amb el límit inferior 20, es discriminen les partícules petites que puguin haver i no siguin plaquetes, i amb el límit superior 15 ens assegurem que no compti els limfòcits en els imatges de corresponents a la fracció L.

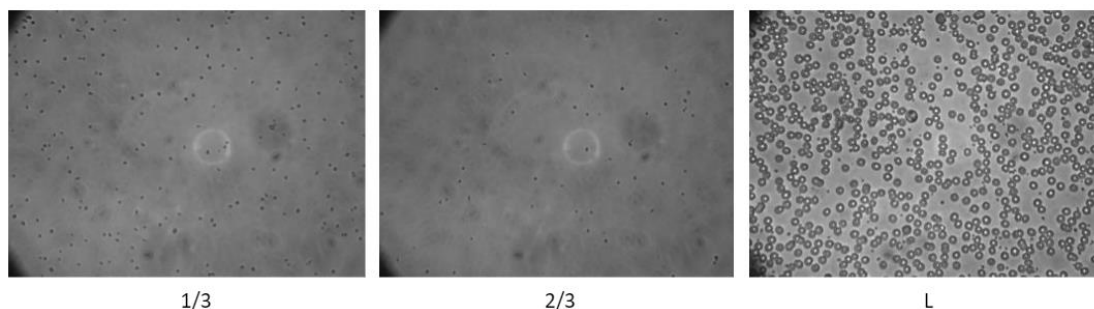


Figura 6. Exemple de microimatge de cada una de les fraccions analitzades pel recompte de plaquetes.
1/3: part superior del plasma, 2/3: part inferior del plasma, L: limfòcits.

7.6. Optimització d'obtenció de PRP amb sang de porc

1. Afegir 10 mL de sang de porc en tubs falcon de 15 mL de fons cònic.
2. Centrifugar els tubs a diferents velocitats de centrifugació (200, 400, 600, 900, 2000, 2800 i 3500 g) combinant diferents temps de centrifugació (10, 20 i 40 minuts).
3. Fer un frotis del plasma de cada condició descrita al punt 2 i visualitzar-ho sota un microscopi invertit.

Com no s'obtenia una fracció plasmàtica neta, perquè hi havia presència d'eritròcits. Es va decidir utilitzar Ficol i centrifugar a les velocitats descrites per Etulain et. Al., Bertrand-Duchesne et. Al. i Martínez et. Al. per obtenir PRP (200 g durant 10 minuts).

7.7. Preparació de PRPr: Plasma ric en plaquetes amb factors de creixement alliberats per plaquetes

1. En un tub de 15 mL de fons cònic, afegir 10 mL de sang. Si treballem amb sang de porc, afegir 4 mL de Ficol i amb l'ajut d'un pipeta Pasteur de vidre afegir lentament 6 mL de sang.
2. Centrifugar la sang a 200 g durant 10 minuts. Després de centrifugar es diferencien les 3 fraccions: el que es coneix com el PRP i on es troben les plaquetes (fracció superior, normalment de color blanc), la fracció dels limfòcits (fracció del mig, normalment molt prima i de color groc) i la fracció de les cèl·lules vermelles (fracció inferior, és de color vermell i és la fracció de més volum).
3. Recuperar la fracció corresponent al PRP. Agafar una alíquota d'100 μ L i fer un recompte amb la Càmera de Neubauer per saber quantes plaquetes hi ha.
4. Afegir 220 μ L de CaCl_2 / mL de PRP de la solució stock CaCl_2 1 M. Amb aquest pas, es provoca l'activació de les plaquetes perquè secretin factors de creixement.
5. Deixar formar el coàgul durant 40 minuts a 37°C.
6. Centrifugar els tubs a 900g durant 10 minuts. D'aquesta manera, el coàgul s'arrossega al fons del tub i es facilita la recuperació del sobrenedant.
7. Recuperar el sobrenedant i centrifugar-lo a 900 g durant 10 minuts.
8. Recuperar el sobrenedant. Aquest correspon al que es coneix com el PRPr. Aliquotar el PRPr en tubs d'1.5 ml i congelar a -80°C fins al seu ús.

Recorda: esterilitzar el PRPr abans d'aliquotar-ho, perquè posteriorment estarà en contacte amb cèl·lules. Esterilitzar amb un filtre de 0.2 μ m.

7.8. Preparació de WPr: factors de creixement alliberats per plaquetes en una solució tampó

1. Repetir els punts 1 i 2 de la preparació del PRPr.
2. Recuperar la fracció corresponent al PRP i centrifugar-la a 900 g durant 10 minuts.
3. Guardar el sobrenedant a -80°C. Aquest sobrenedant equival al que es coneix comunament com a plasma.
4. Resuspendre el pellet de plaquetes amb Tyrode's buffer (veieu la seva preparació al protocol 8 de l'Annex). Afegir el mateix volum de buffer que el que s'ha descartat de sobrenedant.
5. Centrifugar a 900 g durant 10 minuts. Descartar el sobrenedant i repetir el punt 4.
6. Afegir 220 µL de CaCl₂ de la solució stock 1 M per cada mL de PRP. Amb aquest pas, es provoca l'activació de les plaquetes perquè secretin factors de creixement.
7. Deixar la suspensió de plaquetes durant 40 minuts a 37°C.
9. Centrifugar a 900 g durant 10 minuts. Al fons del tub cònic de 15 mL queden les plaquetes "buides".
10. Recuperar el sobrenedant . Aquest correspon al que es coneix com el WPr. Aliquotar el WPr en tubs d'1.5 ml i congelar a -80°C fins al seu ús.

Recorda: esterilitzar el WPr abans d'aliquotar-ho, perquè posteriorment estarà en contacte amb cèl·lules. Esterilitzar amb un filtre de 0.2 µm.

7.9 Assaigs d'angiogènesi

7.9.1. Optimització del temps sense sèrum

1. Quan el cultiu presenti una confluència del 70%, aspirar el medi, fer dos rentats amb PBS i afegir medi sense sèrum.
2. Incubar el cultiu a diferents temps: 2, 4, 6, 8 i 24 h amb medi sense sèrum.
3. Aspirar el medi sense sèrum, fer dos rentats amb PBS i afegir medi sense sèrum.
4. Analitzar la viabilitat de les cèl·lules als diferents temps d'estar amb una medi sense sèrum i la seva resposta davant del sèrum (si comencen a proliferar o no).

7.9.2. Optimització del percentatge de PRP necessari per a la formació d'estructures tubulars

1. Fer el coating amb gelatina al 0.2%. Si s'utilitza una placa de 24 pous, afegir 0.5 mL de gelatina i incubar la placa durant 2 h.
2. Aspirar la gelatina que no s'ha solidificat i fer dos rentats amb 0.5 mL de PBS.
3. Sembrar la placa de cultiu.
4. Quan el cultiu es trobi a un 70% de confluència, procedir amb l'assaig d'angiogènesi.
5. Aspirar el medi i fer dos rentats amb 0.5 mL de PBS.
6. Afegir medi de cultiu sense sèrum i incubar la placa durant 4 h.
7. Passades les 4 h fer 3-4 fotos de cada pou.
8. Aspirar el medi i fer dos rentats amb 0.5 mL de PBS.
9. Afegir en cada pou la condició corresponent:
 - Control-1 (C1): medi amb sèrum.
 - Control-2 (C2): medi sense sèrum.

- Control-3 (C3): 250 µL medi sense sèrum + 250 µL de Tyrode's Buffer (consultar punt 7.10.1. de l'Annex de Protocol per veure la seva preparació).
- 100% PRPr/WPr: 500 µL PRPr/WPr.
- 80% PRPr/WPr: 400 µL PRPr/WPr + 100 µL medi sense sèrum.
- 75% PRPr/WPr: 375 µL PRPr/WPr + 125 µL medi sense sèrum.
- 60% PRPr/WPr: 300 µL PRPr/WPr + 200 µL medi sense sèrum.
- 50% PRPr/WPr: 250 µL PRPr/WPr + 250 µL medi sense sèrum.
- 25% PRPr/WPr: 125 µL PRPr/WPr + 125 µL Tyrode's Buffer + 250 µL medi sense sèrum.
- 12.5% PRPr/WPr: 62.5 µL PRPr/WPr + 187.5 µL Tyrode's Buffer + 250 µL medi sense sèrum.

Recorda: Fer duplicats de cada condició.

10. Fer un seguiment amb microimatges amb un microscopi invertit a diferents temps: 2 h, 4 h, 6 h 20 h d'haver afegit el PRPr/WPr en el medi.
11. Amb qualsevol visualitzador d'imatges, analitzar manualment el nombre d'alineaments s'han produït. S'estén per alineament quan 3 cèl·lules o més segueixen la mateixa direccionalitat (Figura 7).

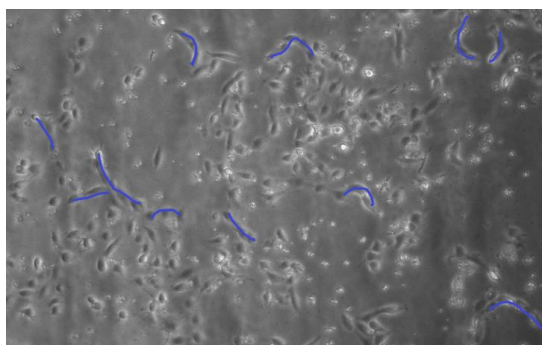


Figura 7. Exemple de recompte d'alineaments. Línia: HUVEC. Objectiu: 10X.

7.9.3. Concentració proteica del PRP

1. Preparar un banc de dilucions dels diferents PRP.
2. Calcular l'absorbància a 280 nm – absorbància a la que les proteïnes absorbeixen la llum ultraviolada (UV).
3. Diluir les mostres fins que el valor d'absorbància ja no canviï.

7.9.4. Preparació Tyrode's Buffer

- SOLUCIÓ 1: Preparar 30 mL NaCl (139 mM)+ KCl (3 mM)+ NaHCO₃ (17mM) 10X: dissoldre 2.437 g de NaCl, 0.067 g KCl i 0.428 g de NaHCO₃ en 30 mL d'aigua destil·lada.
- SOLUCIÓ 2: Preparar 200 mL Glucosa 12 mM: dissoldre 0.54 g Glucosa en 200 mL d'aigua destil·lada.
- Afegir 25 mL de la solució 1 a la solució 2 i oxigenar-les amb l'agitador magnètic durant 5 minuts.

- SOLUCIÓ 3: Preparar 30 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (3 mM) + $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1 mM): dissoldre 0.1323 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ i 0.061 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 30 mL d'aigua destil·lada.
- Afegir 25 mL solució 3 a la barreja del punt 3.
- Calcular el pH. Ha d'estar al voltant de 7.4.

Recorda:

- *Esterilitzar el PPPr abans d'aliquotar-ho, perquè posteriorment estarà en contacte amb cèl·lules. Esterilitzar amb un filtre de 0.2 μm .*
- *Incubar el Tyrode's Buffer 1 h abans del seu ús per equilibrar el pH.*
- *És aconsellable preparar aquest buffer abans d'utilitzar-se, ja que al contenir glucosa és susceptible a que hi creixin fongs amb el pas del temps.*