

Desarrollo de un sensor de glucosa no invasivo debido a sus propiedades dieléctricas

Alicia García Giménez

Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales

Tutor: Eduardo Fernández Jover
Instituto de Bioingeniería

Contenido

Resumen	2
Palabras clave	2
Introducción	2
Antecedentes y objetivos.....	5
Materiales y métodos.....	9
Cultivo celular	9
Cultivo celular primario	10
Contaje celular.....	12
Cultivo celular en matriz de colágeno.....	13
Impresión 3D de los cultivos.....	14
Condiciones de esterilidad.....	15
Medidas	15
Resultados	18
Discusión.....	32
Conclusiones y proyección futura	33
Bibliografía.....	34



Resumen

La diabetes es un trastorno metabólico a nivel global en la que la mayor parte de la población afectada debe regularse periódicamente a lo largo del día los niveles de glucosa en sangre. Con la intención de mejorar la calidad de vida de estas personas se ha intentado desarrollar un sensor de glucosa no invasivo. En este caso, la funcionalidad del sensor se centra en el estudio de la concentración de glucosa por medio de la relación entre la permitividad y la concentración de glucosa, utilizándose para este fin la tecnología de las frecuencias de microondas. En el presente trabajo se intentará ayudar a descubrir y caracterizar la relación existente entre la permitividad y la concentración de glucosa por medio del estudio de soluciones de células en medios con diferente concentración de glucosa, así como con cultivos celulares en monocapa. Para ello se utilizará un conector coaxial y dos resonadores distintos. Los datos obtenidos así como las conclusiones se detallarán a lo largo del presente trabajo.

Abstract. Diabetes is a global disease that requires the individual to measure periodically throughout the day their blood glucose levels. Non-invasive blood glucose monitoring systems have been made in order to improve the life quality of these people. In this case the functionality of the sensor is centered on the study of the glucose concentration on blood. For this reason it is important to characterize the relationship between permittivity and glucose concentration using the technology of microwave frequencies. In this paper we will try to discover and characterize the relationship between the permittivity and the glucose concentration through the study of cell solutions in mediums with different glucose concentration. This porpoise is going to be studied in monolayer cell cultures as well. A coaxial cable and two different resonators are used. The data and the conclusions obtained are detailed throughout this work.

Palabras clave

Glucosa, caracterización dieléctrica, permitividad, frecuencia resonante, cultivo celular, monitor de glucosa no invasivo.

Introducción

La diabetes es una patología metabólica que se basa en una hiperglucemia, es decir, altos niveles de glucosa en sangre. Esto se debe a que la insulina no es capaz de internalizar la glucosa que da lugar a energía en el interior celular. Una hiperglucemia crónica está asociada con una gran variedad de patologías y daños en órganos importantes como el corazón, vasos

sanguíneos, ojos, nervios y riñones (American Diabetes Association, 2004). Debido a esto, una falta de control de los niveles de glucosa en sangre deriva en una cetoacidosis o en el síndrome hiperosmolar no cetósico, que pueden llegar a ser mortales. Las complicaciones a largo plazo van desde retinopatías con pérdida total de la visión, nefropatías, neuropatías y amputaciones, entre otros. Esta gran variedad de enfermedades asociadas a la diabetes hace necesario un control exhaustivo de los pacientes y mejora de los tratamientos a largo plazo.

A pesar de que en muchos casos no es posible categorizar al diabético dentro de un tipo concreto de diabetes, se ha realizado la siguiente clasificación de dicha patología (American Diabetes Association, 2004; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes, 1997; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes, 2003). La diabetes tipo I se debe a la destrucción por parte del sistema inmune de las células β del páncreas; como resultado no se produce nada de insulina. Los autoanticuerpos pueden afectar tanto a la insulina, como a los islotes de Langerhans, diversas tirosinas fosfatasas como la IA-2 y la IA-2 β y, a la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD₆₅). Se conocen algunos genes asociados a la diabetes que predisponen a sufrirla, aunque también se ha de tener en cuenta el factor ambiental. Indicar por último que la diabetes tipo I es totalmente dependiente de insulina. La diabetes tipo II es la mayoritaria con un porcentaje que va desde el 90 al 95% de los pacientes diabéticos. Se suele producir debido a una resistencia a la insulina, una deficiencia de insulina o ambas. Este tipo de diabetes se encuentra claramente asociada con la obesidad. En este caso no es necesario, al menos inicialmente, un aporte exógeno de insulina. Otros tipos específicos de diabetes son por ejemplo debidos a defectos genéticos en las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina (mutaciones en el receptor de la insulina), enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por medicamentos o determinadas infecciones. Por último, comentar la diabetes gestacional, la cual puede derivar en una diabetes tipo II.

La diabetes afecta a un gran porcentaje de la población mundial, causando casi tantas muertes como el VIH. Según el NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) la incidencia de diabetes en la población se ha cuadruplicado de 1980 hasta 2014 y se estima que seguirá subiendo, hasta llegar a un valor de más de 700 millones de afectados en 2025 (Etienne G. Krug, 2016). En gran medida esto se debe a los hábitos de vida, el sobrepeso, la obesidad y el sedentarismo que caracteriza a la sociedad de los países desarrollados. Concretamente ésta es la diabetes tipo II que, como se comentó con anterioridad, se encuentra relacionada con la obesidad. Además de estos factores, el envejecimiento de la población es otra causa del

aumento de la prevalencia de la Diabetes en la sociedad. Según Wild. S. et al. en los países en desarrollo se duplicará la incidencia de diabetes entre la población urbana entre 2000 y 2030. Para parar esta epidemia global que es la diabetes es necesaria la prevención; pero para los 400 millones de personas que ya padecen la enfermedad es necesario controlarla. Para ello es recomendable un enfoque multidisciplinar, empezando por educar a la población, tanto afectada como en riesgo, acerca de la Diabetes, así como proporcionando medicación y un seguimiento constante al diabético. Este último enfoque es el más relevante en el presente trabajo ya que, se basa en el estudio de un sensor no invasivo, lo que permite realizar una mayor cantidad de mediciones de los niveles de glucosa, ganando, además, en comodidad con respecto a las técnicas de medición actuales.

En el caso de pacientes adultos mayores de 60 años la prevalencia de episodios inconscientes de hipoglucemia es mayor. Esto se refiere a que el cuerpo no reacciona fisiológicamente a esta bajada de glucosa, por lo que no se desarrolla una alerta (Weinstock et al. 2012). En estos casos es necesario según los autores un control más exhaustivo y frecuente de los niveles de glucosa para disminuir estos peligrosos acontecimientos. El control se suele realizar tanto de forma continua mediante un monitor, como mediante el método típico de autocontrol del medidor de glucosa en sangre. Estos y otros muchos más ejemplos hacen necesaria la creación y desarrollo de nuevos métodos de detección de niveles de glucosa.

La principal desventaja del método típico recae en la necesidad de que el paciente se pinche para que una gota de sangre se capte en el monitor. Este procedimiento puede llevarse a cabo en repetidas ocasiones a lo largo del día por lo que es incómodo y doloroso. Además, hay que considerar la suciedad de la piel la cual puede interferir en el resultado de la medición. Dentro de los métodos no invasivos para controlar los niveles de glucosa se encuentran estudios en los que se mide la saliva, el sudor, la respiración (K. Yan et al. 2014), métodos subcutáneos con sensores de tipo aguja, entre otros (Ginsberg, 1992). Cabe destacar también la utilización de tecnologías ópticas en el estudio de la concentración de glucosa. Un ejemplo es el estudio realizado por Cameron BD, Côté GL., 1997. La finalidad de estos autores era la de observar la cantidad de rotación de un estado de polarización del haz de luz después de que se propagase a través del humor acuoso contenido dentro de la cámara anterior del ojo. En cada fluido o tejido que se quiera investigar hay que conocer si la concentración de glucosa en ese tejido es proporcional a la sanguínea y, si es así, el tiempo de diferencia hasta que llega a ésta con respecto a la sangre. También hay que considerar las sustancias que puedan interferir en la medida.

La tecnología de las microondas se puede usar en el desarrollo de medidores de glucosa no invasivos debido a sus propiedades de penetración. Se estudian en estos casos campos electromagnéticos o antenas. Para ello se utilizará como base la permitividad eléctrica relativa (ϵ_0) medida usando un resonador de microondas con una antena de frecuencia resonante determinada. Esta frecuencia resonante variará con los cambios de permitividad. La permitividad de los tejidos humanos varía con la concentración de glucosa. Como en los tejidos la mayoría es agua, se estudia esta molécula ya que es la que más contribuye a la permitividad. Además, la caracterización dieléctrica del agua ha sido estudiada en profundidad. Hay que considerar de igual forma que la permitividad varía con la frecuencia utilizada por lo que es interesante estudiar como primer paso las frecuencias en las que se producen los cambios.

Hayashi, 2003 estudió el efecto de la concentración de glucosa sobre la permitividad de los eritrocitos, centrándose también en las diferencias entre la L-glucosa y D-glucosa. Solo la D-glucosa es activa en el cuerpo humano. Por lo tanto, con todo lo comentado anteriormente; es decir, que los niveles de glucosa afectan a la permitividad relativa de la sangre, y que ésta permitividad es dependiente de la frecuencia; se puede afirmar que es posible construir un sensor no invasivo de glucosa gracias a la utilización de microondas.

Antecedentes y objetivos

En estudios previos del grupo de investigación nBio de la Universidad Miguel Hernández (Carlos G. Juan et al.) se llevó a cabo el estudio del comportamiento dieléctrico de soluciones de glucosa con agua con el fin de encontrar el rango de frecuencias que se utiliza en los resonadores microstrip. Debido a la polaridad del agua se considera que es un sistema ideal de dipolos permanentes. Este hecho convierte al agua en un medio ideal para disolver la sustancia que se quiere caracterizar dieléctricamente.

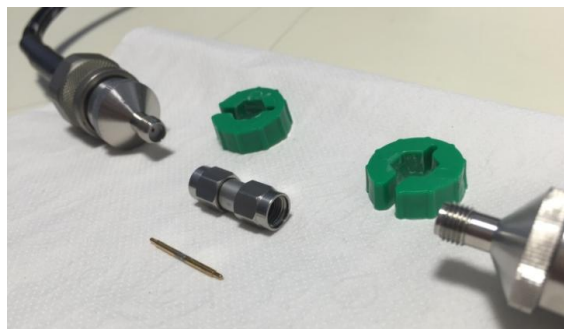


Figura 1 Conector coaxial en el que se realizaron las medidas con las diferentes soluciones.

El primer paso para determinar la relación entre la concentración de la glucosa y su constante dieléctrica fue estudiar disoluciones de glucosa en agua. Para ello se utilizó un conector coaxial sin dieléctrico con la disolución a medir. En este conector se midieron las diversas concentraciones de glucosa en disoluciones de glucosa y agua (figura 1). Concretamente es un método que mide los parámetros de dispersión (parámetros de scattering en inglés que se nombrarán como parámetros S) de la transmisión y reflexión (T/R).

El rango de frecuencias analizadas en este caso estaba entre 100 MHz y 4 GHz. Se realizaron mediciones de soluciones de glucosa y agua cuya concentración iba desde 50 a 10000 mg/dl. Las primeras son las que se pueden encontrar en una persona diabética. Se estudiaron previamente las frecuencias de interés, concluyéndose que a partir de 4 GHz no había cambios significativos. En los experimentos siguientes se descartaron frecuencias más altas de 4 GHz. Las variaciones entre S_{11} y S_{21} , aunque sean pequeñas, se deben a la glucosa, el único parámetro que varía entre concentraciones. Se estudiaron con detenimiento algunos rangos, como por ejemplo de 250-500 mg/dl, y las medidas de 50mg/dl y 1000 mg/dl donde se observó que al aumentar la concentración de glucosa la respuesta dieléctrica era menor para el S_{11} , que mide la reflexión, y mayor para el S_{21} , que mide la transmisión (Figura 2).

Se concluyó que la información útil se encontraba por debajo de 2GHz, por encima de este valor los cambios no eran apreciables. Concretamente la región de interés es de 1 a 1.2 GHz, siendo esta región donde se observa la mayor transmisión (S_{21}) y la menor reflexión (S_{11}). Como conclusión se halló que a mayor concentración de glucosa había una mayor respuesta dieléctrica a excepción de algunos valles. Esto también fue corroborado por Hayashi et al, 2003. Se estudió también la permitividad y se concluyó que el comportamiento general de la permitividad relativa es la de aumentar con la concentración de glucosa, ya que aumenta el número de dipolos. La frecuencia resonante por su parte es menor a mayores valores de permitividad.

Tras analizar el agua con glucosa, se pasó al análisis de soluciones de leche que posee una mayor cantidad de compuestos además de la glucosa, siendo por lo tanto, un medio más complejo. Se partió de las mismas concentraciones y los mismos métodos utilizados con anterioridad. Como conclusión se compararon ambos experimentos con el fin de observar los cambios de un medio con mayor complejidad frente al agua con glucosa. Se observaron diversas variaciones en comparación con las soluciones de agua con glucosa. Usando leche

como solución, las variaciones entre concentraciones eran menores, asimismo, las variaciones eran diferentes de las que se observaron en el agua con glucosa (Figura 3).

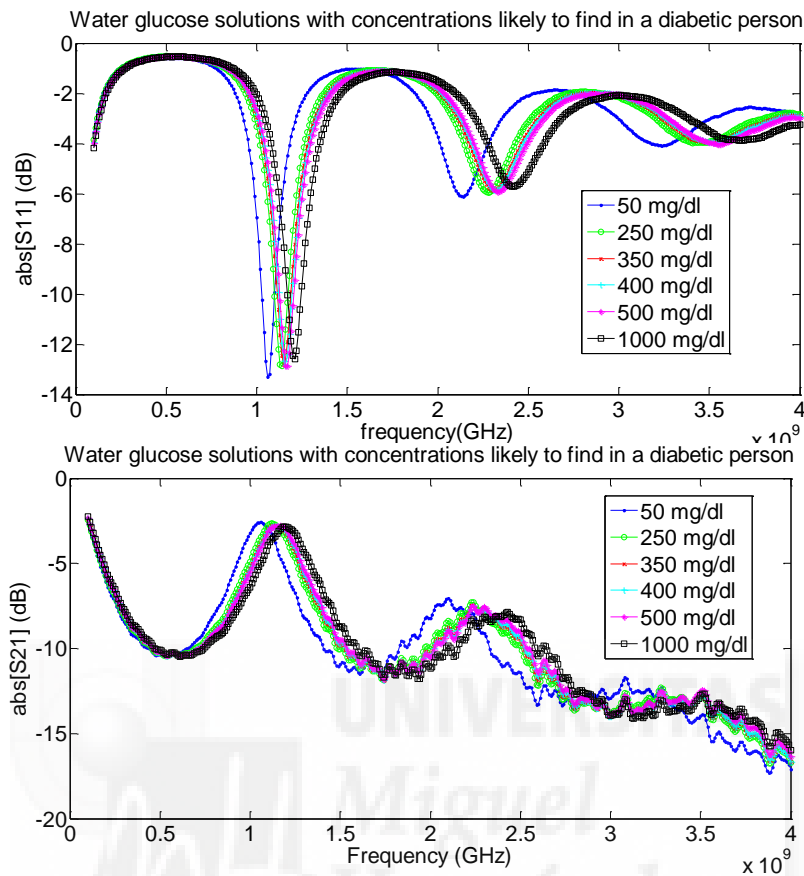


Figura 2 Resultado de las medidas realizadas en soluciones de agua con glucosa mediante el uso del cable coaxial. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias y en el Y el parámetro de dispersión S11 y S21 respectivamente.

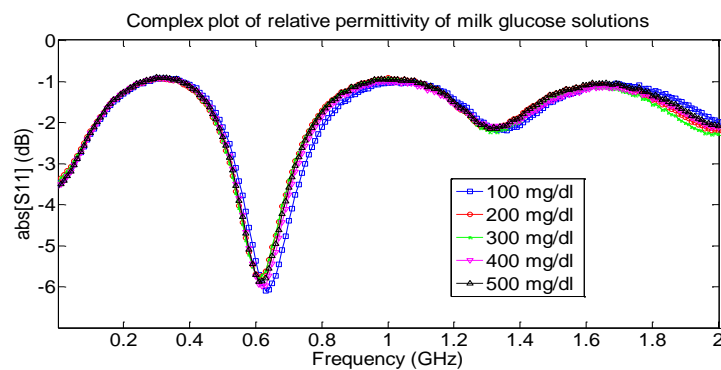


Figura 3. Resultado de las medidas realizadas en soluciones de leche mediante el uso del cable coaxial. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias y en el Y el parámetro de dispersión S11. Solo se encuentra comparada la transmisión, el S11. Las conclusiones obtenidas del S21 son las mismas.

El comportamiento dieléctrico varía debido a la mayor complejidad de la leche ya que los tiempos de relajación son mayores al encontrarse más cantidad de dipolos. Asimismo se

observó que la frecuencia era mayor al variar las concentraciones, pero esto ocurre por rangos al igual que en el experimento anterior.

El experimento detallado con anterioridad, en el que se medían disoluciones de agua con glucosa, se realizó de igual forma pero con antenas en lugar del coaxial. Estas antenas resonadoras poseen una frecuencia de respuesta que depende de la permitividad relativa del medio que la rodea. Destacar que nunca está en contacto el medio con el resonador, la antena en este caso. El objetivo principal al igual que en los anteriores casos era caracterizar los cambios en las frecuencias resonantes al cambiar las concentraciones de glucosa.

Otras pruebas realizadas se basaron en el uso de antenas para medir las variaciones en la frecuencia resonante en la lengua de diversos individuos. Estas medidas se basaban en los cambios en la permitividad relativa de la lengua que está relacionada directamente con los cambios en los niveles de glucosa del propio paciente (diabético o no diabético). Se realizó una comparación de los datos obtenidos mediante éste método no invasivo y con métodos invasivos como el glucómetro usado comúnmente. En este caso se usó una frecuencia cercana a 2.5 GHz que es la ideal según las características dieléctricas de la lengua. El experimento se basó en 4 voluntarios, dos diabéticos y dos no diabéticos, a los que se les midió los niveles de glucosa antes y después de ingerir 50 gramos de azúcar en forma de alimentos o zumos. Las mediciones se hicieron cada 10 minutos con los dos glucómetros comerciales y el resonador microstrip en desarrollo. Éste se colocaba en la lengua de los voluntarios con el objetivo de ver si existía una relación entre la frecuencia resonante del resonador y los niveles de glucosa. Las desventajas de este método se centran en que se encuentran variaciones debidas a la localización del sensor en la lengua y la presión ejercida sobre ésta; y además los niveles de ruido pueden llegar a ser altos. Se observó como conclusión una clara correlación inversa entre la permitividad relativa y la frecuencia resonante. Estos cambios en la frecuencia del sensor permiten determinar la concentración de glucosa.

La desventaja de los métodos usados y comentados anteriormente es que la correlación entre la permitividad y la concentración no está del todo clara. Por ello, es necesario estudiar estas correlaciones de forma más exhaustiva para dar lugar a una correcta caracterización dieléctrica del efecto de la glucosa en sangre.

El objetivo principal del presente trabajo es dar el siguiente paso lógico en el estudio del desarrollo de un sensor de glucosa no invasivo basado en las propiedades dieléctricas de esta biomolécula. Con el fin de obtener más información sobre la correlación de la glucosa y

la permitividad in vivo se estudió el efecto de la glucosa en entornos más reales como medios de cultivo. Primero se llevó a cabo con células en suspensión, a continuación con células en monocapa y por último en una matriz de colágeno. En estudio con las células en suspensión se llevo a cabo con y sin células así como con el medio en el que habían crecido con el objetivo de poder discernir el efecto que producían las células y los metabolitos producidos por estas. En el siguiente apartado de materiales y métodos se desarrolla con exactitud cómo se llevó a cabo.

Materiales y métodos

Cultivo celular

El cultivo celular se mantiene en incubadores a una temperatura de 37°C y un porcentaje de CO₂ del 5% a un pH determinado. Las células cultivadas se van replicando y ocupando progresivamente la placa, siempre adhiriéndose a la base de ésta. La mayoría de las células, a excepción de las hematopoyéticas maduras, son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Las células como seres vivos, poseen un metabolismo y además de crecer y desarrollarse, van produciendo diversos productos y agotando el medio. Debido a estas razones, es conveniente realizar lavados y cambios de medio o lo que se conoce como pases. El primer caso se realiza debido al empobrecimiento del medio cuando no está toda la base de la placa cultivada, mientras que se realiza el segundo procedimiento cuando es necesario cambiar el recipiente al haberse formado una monocapa u otras razones más concretas.

Para el estudio de la glucosa se vio conveniente utilizar fibroblastos (3T3) debido a su alta capacidad de reproducción, su facilidad de cultivo e inmortalidad. Además cabe destacar que la lengua está formada en su mayoría por tejido muscular, pero en la zona media de la lengua se encuentra un tabique de tejido conectivo (Chummy S. Sinnatamby, 2003). Los fibroblastos son células que se encuentran y forman parte del tejido conectivo, siendo las más características. Su función es sintetizar fibras y mantener la matriz extracelular de diversos tejidos animales. La línea celular NIH 3T3 proviene de células de fibroblasto de tejido embrionario de ratón y es una línea celular estándar en investigación.

Se realizó el cultivo de 100.000 células en cada placa de Petri P60. Cada placa contenía un medio diferente. Partiendo del medio comercial de 1g/l de glucosa se añadió glucosa en polvo hasta conseguir las concentraciones requeridas de 2g/l, 3g/l, 4g/l y 5 g/l. Además se utilizó como control de crecimiento el medio utilizado normalmente para el

cultivo de fibroblastos que posee una concentración de 4.5g/l. Todos estos medios para adecuarlos al crecimiento celular poseen DMEM (referencia 32430-027 de la casa Gibco), una concentración 1:100 de antibiótico (penicilina y streptomina) y 1:10 de FBS (fetal bovine serum). El FBS debe descomplementarse a 56°C durante 5 minutos para inactivar proteínas del complemento del suero.

Para mantener las células en un estado óptimo se realizó periódicamente lo que se conoce como pases. El proceso se detalla a continuación.

1. Primero se observa al microscopio invertido de placa que la monocapa sea continua y uniforme y que las células hayan crecido hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia, es decir, la máxima capacidad de cubrimiento de superficie).
2. Se aspira con la bomba de vacío el medio de cultivo de la placa.
3. Se realizan dos lavados con PBS (Buffer fosfato salino).
4. Se cubre la placa con cantidad suficiente de 0.5% Tripsina-EDTA (referencia 25300-067-500ml de GIBCO). Los volúmenes varían según la placa, oscilando entre 3ml para P-100 y 2ml para P-60.
5. Las placas se incuban alrededor de 5 minutos con el fin de poder observarse desprendimiento celular de la monocapa.
6. Con la intención de deshacer acúmulos celulares se pipetea reiteradamente con la pipeta. A continuación se transfieren las células a un falcon con el medio de cultivo correspondiente para inactivar la tripsina.
7. Se centrifuga a 1740 rpm durante 5 minutos.
8. Se retira el medio de cultivo con la bomba de vacío con cuidado de no desprender el pellet.
9. Se realiza el recuento celular tras resuspender el pellet.
10. Se homogeneiza y siembra la cantidad necesaria de células.

Cultivo celular primario

Para realizar las mediciones de la glucosa en sangre se buscó un área muy vascularizada, con tejido muscular y con baja cantidad de grasa. No interesa que haya grasa ya que se comprobó que ésta aporta unas bajas variaciones de permitividad relativa, lo que no es de interés. Debido a estas razones se escogió la lengua como el área de interés para el sensor no invasivo. Otra ventaja de la lengua como área de interés es que no se ve afectada por los cambios de temperatura, al contrario que la muñeca que es donde más se han

desarrollado otros sensores no invasivos. Esto es realmente importante porque las medidas se pueden ver influidas por la temperatura.

Para que el cultivo celular fuese más real en comparación con su posterior utilidad, se realizó un cultivo primario a partir de lengua de feto de rata. Debido a que no se ha documentado previamente un protocolo adecuado desde cero, se realizó uno de invención propia. Se partió del protocolo de células de hipocampo que es el que se realiza en el laboratorio, del que se conoce el protocolo y se posee el medio y suplementos.

El primer paso para realizar un cultivo primario es la extracción de las células de los embriones de rata de alrededor de 17-18 días. Para ello se produce la eutanasia de la rata embarazada por medio de una anestesia inicial con isoflurano para después llevar a cabo una dislocación cervical. Este procedimiento se realizó de acuerdo a los protocolos de la comisión de ética de la investigación experimental (CEIE) de la Universidad Miguel Hernández. A continuación se procede a la extracción de la lengua de dichos embriones y se mantiene en HBSS o DMEM sin suero. Se realiza además una primera disgregación del tejido con las pinzas.

Dentro de la campana de flujo laminar se retira el medio y se le añaden 3 ml de DMEM sin suero y colagenasa. Inicialmente se añadió 1ml de colagenasa I, con referencia 17018-029 de Gibco, durante 1 hora a 37°C en un baño de agua. Esta enzima proteolítica se encarga de escindir el vínculo entre un aminoácido neutro (X) y la glicina en la secuencia Pro-X-Gli-Pro, que se encuentra con alta frecuencia en el colágeno. Por lo tanto, esta enzima degrada las fibras de triple hélice de colágeno que se hallan en los tejidos conectivos. Se usó 1ml ya que se encontró que Ozdener. H. 2012, usó 550.00 U/ml en su trabajo y partimos de 285.00 U/mg. Se pesó, diluyó en 1 ml de DMEM sin suero y filtró ya que la colagenasa no era estéril.

Tras esta hora se extrajeron las células con el fin de eliminar la colagenasa y se añadieron a 3 ml de DMEM sin suero junto con 200 µl de tripsina (enzima proteolítica que rompe los enlaces de las células y hace que se disgregue el tejido). No se recomienda la utilización a la vez de colagenasa con tripsina ya que se inactiva.

Pasada 1 hora a 37°C se extrajeron las células y se pasaron a un falcon de 15 ml con 3 ml de medio Neurobasal sin rojo fenol con referencia 12349-015 de Gibco preparado previamente. A este medio se le añade FBS, Glutamax, con referencia 35050-038 de Gibco,

antibiótico (penicilina/streptomina) con una dilución 1:100 y el suplemento B27 con referencia 17504-044 de Gibco. Luego se centrifuga a 1740 revoluciones por minuto durante 5 minutos. Tras quitar el sobrenadante se añadió medio y se contaron las células con el contador de celular Adam.

Estas células fueron transferidas a una placa de 12 multipocillos que contenían los cubreobjetos previamente preparados. Estos cubreobjetos se deben esterilizar durante media hora en UV. Tras esto se les añade 1 ml de PDL (poly-D-lysine 50 mg/ml) por pocillo en los que se colocan los cubreobjetos durante 30 minutos; luego de lavar dos veces con PBS se añade laminina %50µg/ml hasta el momento de cultivar. La función del PDL es la de mejorar la adherencia de las células al cubreobjetos en este caso. Dicha mejora se debe a la interacción entre el polímero que posee una carga positiva y las células o proteínas de carga negativa de las membranas celulares de las células. Indicar además que el PDL es sintético por lo que resiste mejor la degradación frente al PLL que es natural.

Contaje celular

El contaje celular fue necesario para cultivar la misma cantidad de células en las 6 placas de Petri con los distintos medios, así como para saber la cantidad de células que crecieron en los diversos medios y para saber la cantidad de NaOH y colagenasa que se debe añadir para crear la matriz de colágeno. La técnica se define a continuación.

Una vez obtenido el pellet, a partir de los pasos del pase descritos anteriormente, se resuspende con un volumen de medio determinado. Se añade en un eppendorf 20µl de la suspensión celular y se mezcla con 20 µl de la solución azul tripán. Este es un colorante que permite distinguir las células viables de las que no lo son. Las células que han perdido su permeabilidad se tiñen de azul, las viables por su parte permanecen incoloras.

Posteriormente se siembran 20 µl de la mezcla anterior en la cámara de Neubauer con una micropipeta. Se cuentan las células viables, incoloras, contenidas en los recuadros. Se obtiene el promedio y se multiplica por la dilución realizada. Por último se pasa a ml y se calcula el número total de células de la suspensión. Este método se conoce como método de tinción por exclusión.

A continuación se detallará el proceso que se sigue para utilizar el contador de células Adam. La ventaja de este frente al método de la cámara de Neubauer es el ahorro de tiempo. Este método se basa en una tinción de núcleos por fluorescencia, un método fiable e

independiente del tamaño y forma de las células. La tinción se realiza mediante yoduro de propidio que se intercala en el ADN de las células.

Con el contador de células Adam se deben hacer dos disoluciones una con N y otra con T. Partimos del mismo paso que en la técnica del azul tripán. El pellet que se obtiene tras la centrifugación se resuspende en 1 ml. Añadimos en un eppendorf 30µl de la solución T y 30µl de la suspensión de células que hemos resuspendido. Cuando se ha mezclado todo, se cogen 12µl de la disolución y se añade en la placa de medida en T1; 12µl más se añaden en T2. La muestra se inyecta por capilaridad con ayuda de una pipeta automática convencional. Lo mismo se hace con N1 y N2 tras haber mezclado la solución N con la suspensión de células. Solo quedará insertar la placa de medida en el aparato Adam y este proporciona el número de células totales y vivas, así como la viabilidad. Estas placas de medida son desechables.

Cultivo celular en matriz de colágeno

Con el objetivo de realizar un cultivo 3D más real donde las células se encuentren en una disposición multicapa se eligió realizar tanto un cultivo celular en el interior de una matriz de colágeno como mediante la impresión 3D. Gracias a este método se logra imitar el entorno *in vivo* de las células en un cultivo *in vitro*. Cabe destacar que debido a las propiedades de las antenas es más factible que las células no formen una única monocapa. Esto se debe a que una sola monocapa da lugar a más errores ya que gran parte de la medición se llevaría a cabo en el entorno, fuera de la monocapa de células. La razón recae en que las ondas forman una parábola sobre el material que se va a medir.

Esta matriz de colágeno se forma a partir de monómeros de colágeno que en condiciones específicas de pH neutro y calentado a 37°C da lugar a fibras de este material. (Williams, Gelman et al. 1978). El colágeno neutralizado es una solución viscosa que al calentarse a 37°C en el incubador se desata la polimerización de las fibrillas de colágeno dando lugar a la matriz de colágeno. Estas fibrillas son vistas con un microscopio de fase fácilmente. Pequeños cambios en el pH o en la temperatura pueden afectar a la polimerización, concretamente a la velocidad o tamaño de las fibras. Cuando se seca el colágeno es posible ver que se vuelve más opaco (Vira V. Artym et al. 2010)

El primer paso realizado fue determinar concretamente la cantidad de NaOH necesaria para que polimerizasen 300µl de colágeno tipo I de cola de rata de la marca Corning con referencia 354236. Basándose en la relación 1:40 de NaOH: Colágeno se obtuvo que el

volumen de NaOH era de 7.5 μ l. Se realizó la prueba con tres volúmenes distintos de 7, 7.5 y 8 μ l de NaOH. Como se observa en la figura 4 la polimerización fue mejor en 8 μ l ya que al teñir con azul tripán, este se esparció menos debido a que se encontraba más polimerizado.



Figura 4. Polimerización del colágeno en diferentes volúmenes de NAOH (7, 7,5 y 8 μ l).

Se realizó otra prueba con fibroblastos añadiendo a la mezcla anterior la concentración de células con el fin de ver como afectaba la concentración celular a la polimerización. Las células se tripsinizaron y tras centrifugarse se diluyeron en 1 ml de medio. De este se cogió el volumen necesario. Se cultivó encima de un cubreobjetos para que las medidas fueran más sencillas de realizarse. Por último se realizó el cultivo en matriz de colágeno junto con las células provenientes del cultivo primario de lengua. Tras producirse la polimerización se debe añadir la cantidad de medio necesaria.

Impresión 3D de los cultivos

El cultivo 3D realizado con la impresora 3D Regemat3D y el programa Regemat 3D designer no se puede llevar a cabo debido a problemas técnicos de dicha impresora. El objetivo era utilizar un andamio de ácido poliláctico (PLA) que, como indica el nombre, es un polímero de moléculas de ácido láctico. Este polímero se utiliza ampliamente en la impresión 3D bajo el proceso FDM (modelado por deposición fundida) y su ventaja recae en que es biodegradable. La primera capa del andamio o scaffold consistiría en una capa de PLA cerrada de 0.35 mm de grosor, las paredes del cilindro deberían ser también cerradas con el objetivo de minimizar las pérdidas o derramamiento de medio y/o células por los poros. Se planteó la construcción de un cilindro ya que, la antena en la que se iban a realizar las medias estaba optimizada a los cubreobjetos que son de forma circular. El diámetro utilizado era de 12mm y el tamaño del poro de 0.6mm.

La idea inicial era crear dos modelos donde realizar las medidas, uno sin células, es decir, solo el andamio y medio y otro igual que el anterior pero con células. Para evitar que las células sufran daño alguno debido a la temperatura de fundición se dejaría una capa sin

células antes de añadir otra de PLA. El número total de capas serían ocho contando las que son espacios. Es interesante también observar las diferencias del cultivo cuando se cultiva dentro del poro formado por el PLA y cuando se cultiva por encima en forma de capa.

Condiciones de esterilidad

Las técnicas de cultivo celular deben ser asépticas, todo debe esterilizarse para evitar cualquier tipo de contaminación. Además se trabaja dentro de una campana de flujo laminar en cuyo interior todo debe ser estéril. El material a utilizar suele ser autoclavado y rociado con alcohol antes de colocarse dentro de dicha campana.

En el caso especial de los medios mencionados en el apartado de cultivo celular a los cuales se les añadía glucosa, la técnica de esterilización utilizada fue la filtración. La razón principal se debe a las propiedades y características de la glucosa en polvo utilizada ya que no se podía esterilizar por medio de técnicas de autoclavado u otras y seguir siendo activa. Por ello, se realizó una filtración de cada medio por separado mediante una membrana PES con un diámetro de poro de 25 μ m con la ayuda de una jeringa de 10 ml, ambos estériles. Lo mismo ocurre en el caso de la colagenasa y la realización del medio Neurobasal.

En cuanto a los aparatos e instrumentos utilizados para la medición, como por ejemplo las antenas, las membranas, conectores, el coaxial... se esterilizaron durante media hora con luz ultravioleta. Los cables del VNA se esterilizaron mediante etanol. Asimismo, los cubreobjetos que se utilizan como base para el cultivo se deben esterilizar por ultravioleta.

Las medidas realizadas a los cultivos de colágeno y en general a los cultivados sobre cubreobjetos, al no ser necesario instrumental del laboratorio, se realizaron fuera de las condiciones de esterilidad para ser más tarde desechadas en el contenedor adecuado.

Medidas

Las medidas realizadas por las antenas y el coaxial se basan en el concepto físico de los campos eléctricos constantes, entre otros mecanismos físicos que contribuyen a la polarización del medio dieléctrico. Este trabajo no está centrado en la parte teórica de las medidas, si no más en la parte biológica necesaria para realizarlas, por lo que se hará un resumen de la teoría que hay detrás.

Cuando un material es afectado por un campo eléctrico constante las cargas se mueven, cambian de orientación y esto es diferente en el caso de que se encuentren unidas o libres. En el caso de los dipolos, que son los que nos interesan, ya que el agua es considerada

un dipolo, estas cargas se orientan paralelas al campo eléctrico. Se puede relacionar esto con la permitividad de forma que la permitividad depende de la polarización que ha sido causada por el campo eléctrico. A bajas frecuencias la permitividad es mayor ya que el sistema está polarizado, mientras que cuando el sistema está relajado se encuentran altas frecuencias y permitividad baja. Las técnicas usadas para medir la dispersión dieléctrica de materiales en función de la frecuencia se conocen con el nombre de espectroscopía dieléctrica (DS, de sus siglas en inglés dielectric spectroscopy).

Se realizaron dos tipos de medidas, con antenas y con un conector coaxial, pero ambos se analizan por medio de un analizador de redes de vectorial o VNA de sus siglas en inglés vector network analyzer. Este aparato proporciona los parámetros de dispersión (S-parameters). Es importante calibrar el sistema, por lo que es un paso necesario. Destacar que el medio a estudio nunca está en contacto directo con las antenas, se encuentra siempre una película o un cubreobjetos. El esquema se encuentra representado en la figura 5 donde MUT hace referencia a la muestra que se va a medir que variará en los diversos experimentos realizados. En estos circuitos de altas frecuencias (microondas concretamente) para que se pueda estudiar cómo se retransmiten las ondas reflejadas y transmitidas se usan los parámetros de dispersión. De entre todos los parámetros los elegidos para trabajar fueron el S_{11} y S_{21} .

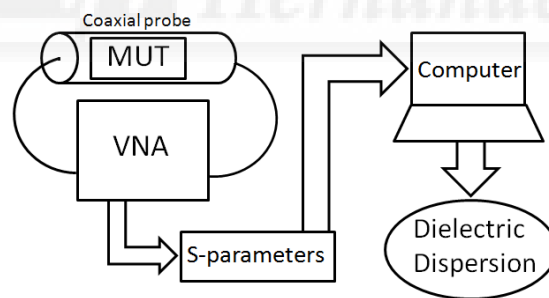


Figura 5 Esquema representativo del proceso de obtención e los datos de dispersión.

Es fundamental sobre todo en las medidas que utilizan el coaxial evitar las burbujas de aire que ocasionan datos erróneos. Con el fin de evitar la formación de dichas burbujas se usa un trípode que mantenga el conector vertical y posibilite la salida de las burbujas.

Se utilizaron dos antenas de dos tipos diferentes para realizar las medidas, la primera se caracteriza por estar formada por líneas de meandro y la segunda por ser circular. La diferencia entre ambas recae en las frecuencias resonantes. Se usan dos tipos de resonadores para obtener la máxima información posible, el circular mide a una frecuencia de 2 GHz,

mientras que el resonador de líneas de meandros lo hace a 1 GHz, ambos valores de frecuencia aproximados. Se usan ambos para obtener medidas en dos frecuencias distintas lo que permite realizar un estudio diferencial. Se observa además del desplazamiento de la frecuencia resonante, la diferencia de desplazamientos que ha habido entre ambos resonadores. Todo esto permite construir una función de desplazamiento. Las medidas se realizaron sobre una membrana en la que se pipeteó la muestra a estudio formando una película por tensión superficial (figura 6).

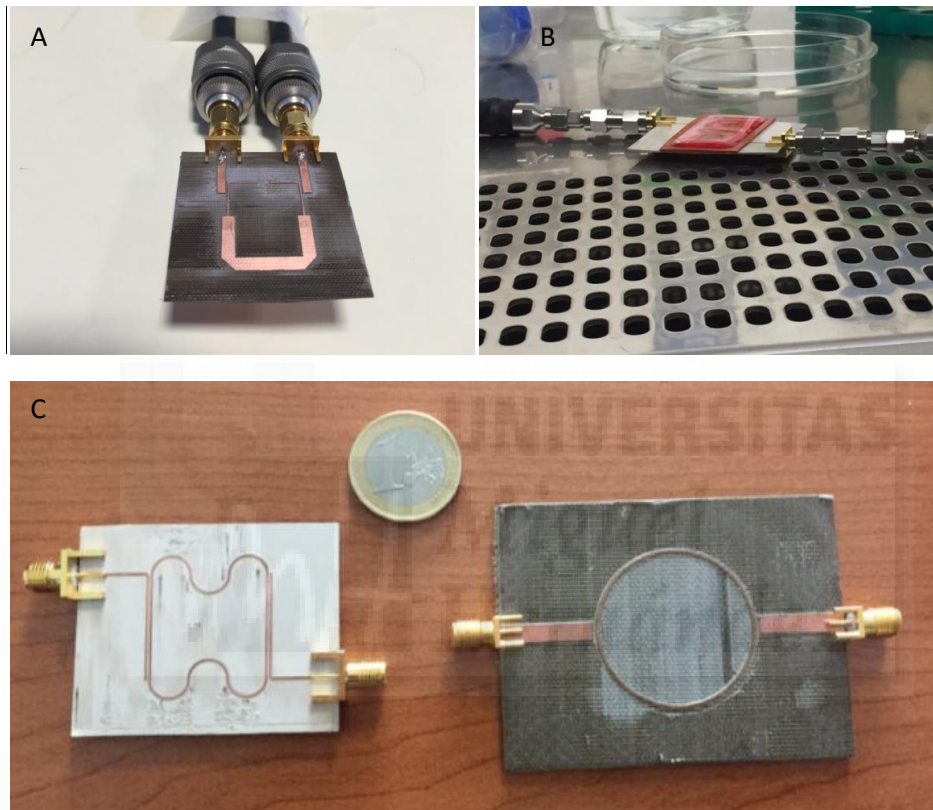


Figura 6 A) Antena utilizada en las medidas con el cubreobjetos. B) Antena de líneas de meandro con la membrana en la que se realiza la medición. C) A la izquierda se observa el resonador de líneas de meandro y a la derecha el circular.

En las últimas medidas que se realizaron sobre los cubreobjetos, se construyó una antena de menor tamaño para adaptarse a la forma y tamaño del cubreobjetos (figura 6.A). Estos resultados no se analizarán en el apartado de resultados ya que no están disponibles debido a la gran cantidad de cálculos que hay detrás de las representaciones gráficas. En este caso en especial, hay que considerar en las ecuaciones el grosor del cubreobjetos que se midió con un micrómetro digital.

Las medidas de las 6 soluciones de glucosa en suspensión se llevaron a cabo tras tripsinizar el cultivo, centrifugar y resuspender en el medio nuevo. Además se realizaron las

medidas en el medio en el que estaban las células para comprobar que la concentración de glucosa ha variado frente al medio nuevo debido al metabolismo celular; y con el medio nuevo con y sin células. Para despegar las células era necesario tripsinar y eliminar el medio antiguo en el que habían crecido. En el caso de los cultivos sobre cubreobjetos no fue necesario realizar este proceso.

Resultados

El primer experimento llevado a cabo se basó en el estudio de la frecuencia resonante, y por lo tanto, de la permitividad, que está relacionada con la concentración de glucosa. En primer lugar se realizó mediante el uso de células de fibroblastos en suspensión. Las medidas se obtuvieron utilizando tanto un conector coaxial como dos tipos diferentes de antenas.

El cultivo de células de fibroblastos en diversos medios con diferente concentración de glucosa dio como resultado una variable cantidad de células en cada uno de ellos. Como se observa en la figura 7, tras 7 días se puede distinguir claramente la diferencia entre cada medio y el medio de 4.5g/l de glucosa, que es el usado comúnmente. Estas variaciones en las concentraciones de 4g/l y 5g/l se pueden deber a que la glucosa utilizada no es tan activa y/o a que se haya podido perder un poco en la filtración. Como era de esperar la viabilidad de las células en las concentraciones de 1g/l y 2g/l es muy baja y por tanto, también lo es su concentración celular.

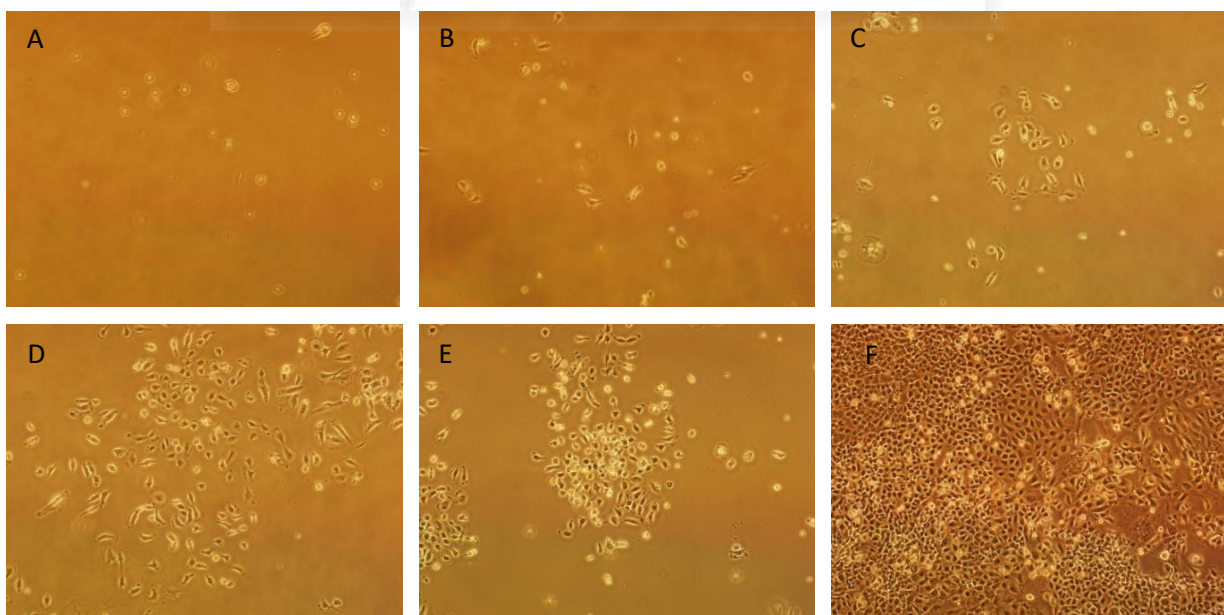


Figura 7. Fibroblastos 3T3. Se encuentran recogidos los diferentes medios a un aumento de 4x tras 7 días. A) Medio con 1 g/l de glucosa. B) Medio con 2 g/l. C) Medio con 3 g/l de glucosa. D) Medio con 4 g/l de glucosa. E) Medio con 5 g/l de glucosa. F) Medio con 4,5 g/l de glucosa.

Las imágenes anteriores se corroboran con la concentración de células medida mediante el contador de células Adam y dichos valores se encuentran recogidos en la tabla 1.

	1g/l	2g/l	3g/l	4g/l	5g/l	4.5g/l
[células]/ml	1260	18900	6300	79300	31500	2080000
Viabilidad	0	24-33%	0% ¹	92%	80%	91%

Tabla 1 Valores de concentración celular de cada solución con un medio ascendente en cuanto a la concentración de glucosa. El valor de 4.5g/l es un medio comercial.

En las siguientes representaciones gráficas se puede comprobar que los cambios en la concentración de glucosa producen cambios en la permitividad relativa (constante dieléctrica). Debido a la correlación inversa entre la permitividad relativa y la frecuencia resonante medida, se puede caracterizar los cambios en la concentración de glucosa de las diferentes concentraciones, observándose de igual forma el efecto de las células en sí y los diferentes metabolitos celulares.

Las mediciones realizadas mediante el conector o cable coaxial, tras ser calibrado, se realizaron tanto con el medio de cultivo nuevo sin células, con células y utilizando el medio en el que las células habían crecido durante 7 días. Tras ser calibrado, se midieron las 6 concentraciones diferentes de glucosa por cada medio indicado anteriormente. Se usó un cable coaxial SMA macho-macho que forma una cavidad donde se pipeteó la muestra a estudio. Los parámetros que se consideran, al igual que en estudios anteriores, son el S11 para la reflexión y el S21 para la transmisión. La frecuencia estudiada es de hasta 2 GHz, tal y como se comprobó realizando las calibraciones con agua y glucosa de los primeros estudios realizados por Carlos G. Juan et al del grupo de investigación nBio de la unidad de Robótica médica (resultados en fase de publicación). El conector coaxial aporta información del comportamiento de las diferentes disoluciones como material dieléctrico, es decir, cómo cada disolución es capaz de afectar a los campos electromagnéticos. Es un estudio de amplio espectro en el que concluimos que la región donde se observan cambios se encuentra entre 1 GHz y 1.5 GHz. Debido a esta observación las mediciones con los resonadores, es decir, con antenas se adaptan a esas frecuencias.

Tal y como se muestra en el gráfico 1, si nos centramos en los valores de 1g/l, 2g/l y 5g/l se observa una correlación entre la concentración de glucosa y la respuesta dieléctrica. En el factor de dispersión S11, que se corresponde a la reflexión, se puede visualizar como la

¹ Ese 0% no parece ser muy real porque en las imágenes se observa que si hay viabilidad, más que en el 2g/l. Este valor erróneo se debe a que las células estuvieron un tiempo en la campana tras centrifugarse por lo que es probable que se formasen acúmulos o se resuspendió de forma incorrecta.

respuesta dieléctrica disminuye, formando un valle, mientras la concentración aumenta. La concentración de 4.5 al poseer mayor concentración de células y ser un medio diferente no se comparará con las otras concentraciones de glucosa. El medio con la concentración de 3g/l no se ajusta al comportamiento de las demás concentraciones, en principio por algún error experimental o por diferentes motivos que se desconocen por lo que se deberán estudiar con más detenimiento.

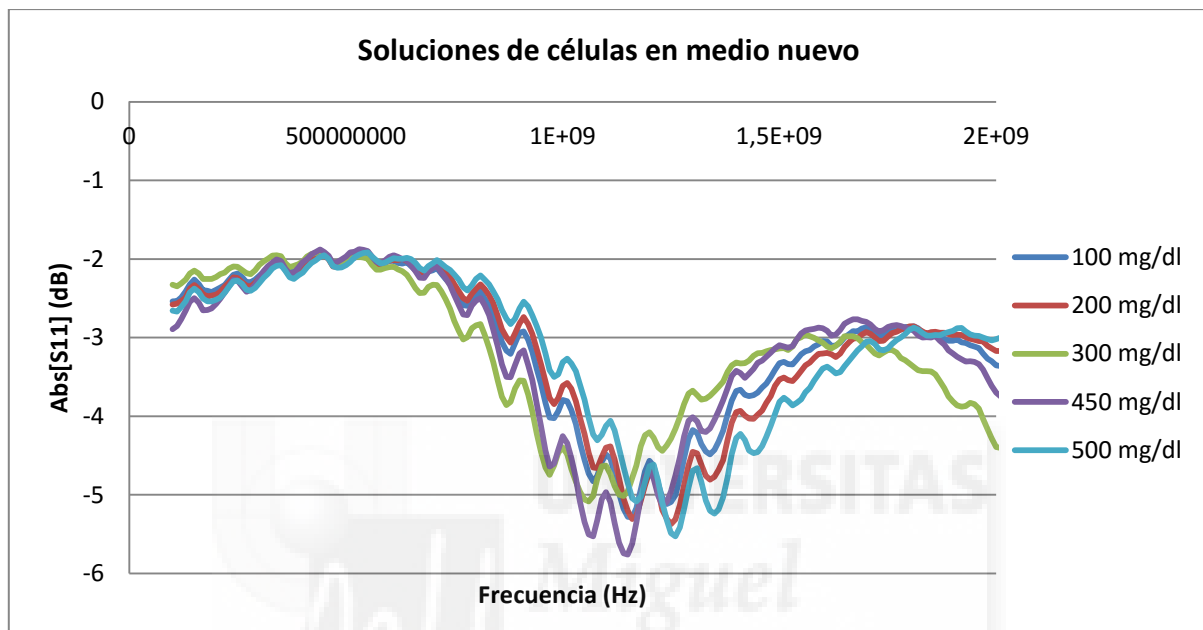


Gráfico 1 Representación de las soluciones de células en un medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un conector coaxial para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias y en el Y el parámetro de dispersión S11.

En el caso de estudiarse la transmisión, el S21, el resultado es al contrario, ya que aumenta la respuesta dieléctrica con la concentración de glucosa como se muestra en el gráfico 2. Se puede observar que el comportamiento de las soluciones es muy similar a excepción de la concentración de 4.5 g/l en la que la respuesta dieléctrica varía, es mayor. Esto puede deberse a que el medio comercial de 4.5 g/l difiere en cuanto al contenido con el resto y que la glucosa es más activa. En el parámetro S21 sí se encuentra una similitud de la concentración de glucosa de 3g/l al contrario de lo que ocurre con el parámetro S11.

Tras compararse los resultados de ambos parámetros de dispersión de las diferentes concentraciones de glucosa en medio nuevo sin células (Gráfico 3 y 4) y con células (Gráfico 1 y 2), se puede concluir que las células no influyen mucho en la reflexión y transmisión ya que los resultados son muy similares entre los medios con células y sin células. Esto es bastante coherente con la teoría, ya que se estudian dipolos de agua. En este caso del parámetro de dispersión S11, el valor de 4g/l es bastante similar al de 3g/l, y ambos forman el

valle a frecuencias más cercanas al de 4.5g/l que a las otras concentraciones. Esto puede indicar que dichos medios son los más similares al óptimo, que es el de 4.5g/l, ya que en este caso no se ve afectado por las diferentes concentraciones de células. En cuanto a la transmisión, es decir al parámetro de dispersión S21, se ve diferencias entre ambos medios. Estas recaen en que las soluciones con células mueven a frecuencias más altas los resultados. Al igual que ocurría con los ensayos con leche comparados con agua y glucosa, los cambios en la leche son más pequeños, menos apreciables.

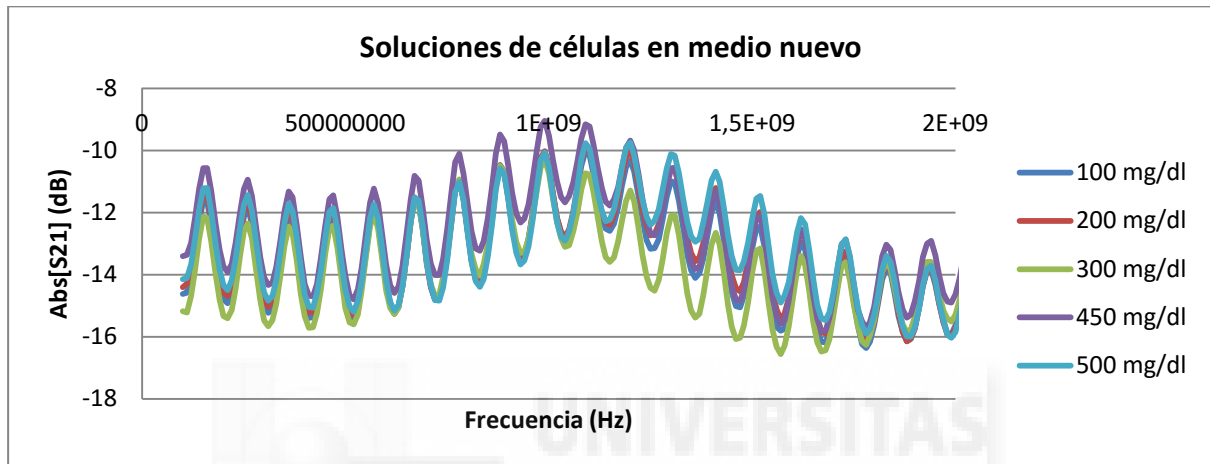


Gráfico 2 Representación de las soluciones de células en un medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un conector coaxial para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias y en el Y el parámetro de dispersión S21.

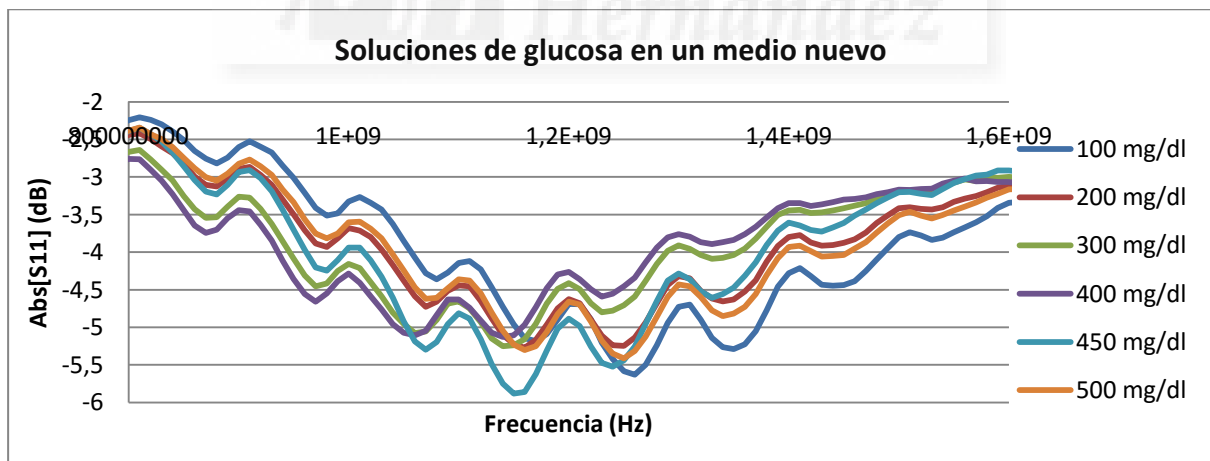


Gráfico 3 Representación de las soluciones de medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un conector coaxial para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias y en el Y el parámetro de dispersión S11.

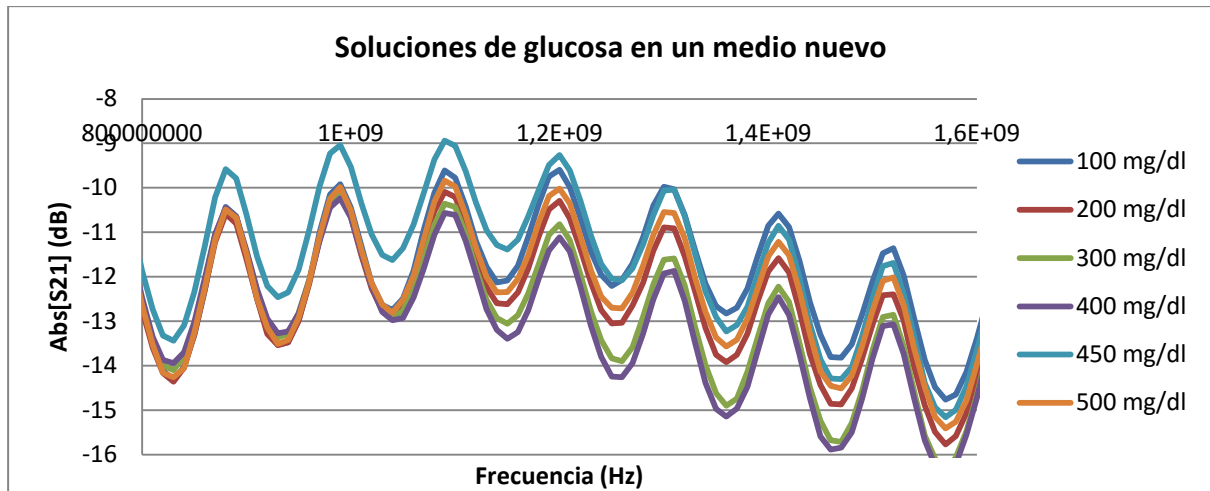


Gráfico 4 Representación de las soluciones de medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un conector coaxial para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias y en el Y el parámetro de dispersión S21.

Debido a la viscosidad de los medios de más de 2g/l en los que las células habían estado cultivadas durante una semana, no se pudo realizar las medidas en el conector coaxial. La razón principal es que dicha viscosidad impedía que el medio entrase en el coaxial sin formar burbujas. Las burbujas se deben evitar a toda costa ya que dan resultados erróneos debido al ruido. La viscosidad es debida en parte a células muertas o células en división, así como productos del metabolismo celular. No se mostrarán los resultados obtenidos con el conector coaxial y el medio en el que las células han estado cultivadas debido a la poca información que se pudo obtener.

Las mediciones realizadas mediante los resonadores o antenas se realizaron tanto con el medio de cultivo nuevo sin células, con células y utilizando el medio en el que las células habían crecido durante 7 días. Tras ser calibrado se midieron las 6 concentraciones diferentes de glucosa por cada medio indicado anteriormente. Se distinguen dos tipos de antenas, la circular y la formada por líneas de meandro. Los parámetros que se consideran, al igual que en estudios anteriores, son el S11 para la reflexión y el S21 para la transmisión. La frecuencia usada en las antenas tal y como se ha concluido en el estudio del conector coaxial es de hasta 2 GHz más o menos. En las antenas lo que se estudia en el eje X son las frecuencias de resonancia, mientras que es más indiferente el desplazamiento en el eje Y. Las variaciones en el eje X indican que la zona de frecuencias es la correcta ya que, se observan variaciones con la misma antena a la misma frecuencia que solo se pueden atribuir a la concentración de glucosa siendo ésta, lo único que varía. Además se puede distinguir el efecto de las células ya que se ven unas ligeras diferencias entre las soluciones con y sin células en el resonador de

líneas de meandro (Gráfico 5 y 6). Solo se tendrá en cuenta el primer pico representado en los gráficos obtenidos a partir del resonador de líneas de meandro, debido a que, el segundo pico es solo una resonancia de orden superior. Las células desplazan en general la frecuencia resonante a valores más pequeños o lo que es lo mismo a permitividades mayores. Uno de los cambios más aparentes es el de 4.5 g/l que posee la mayor concentración de células. Los valores de las soluciones de células se encuentran desplazados a frecuencias resonantes menores que en el caso del medio nuevo sin células.

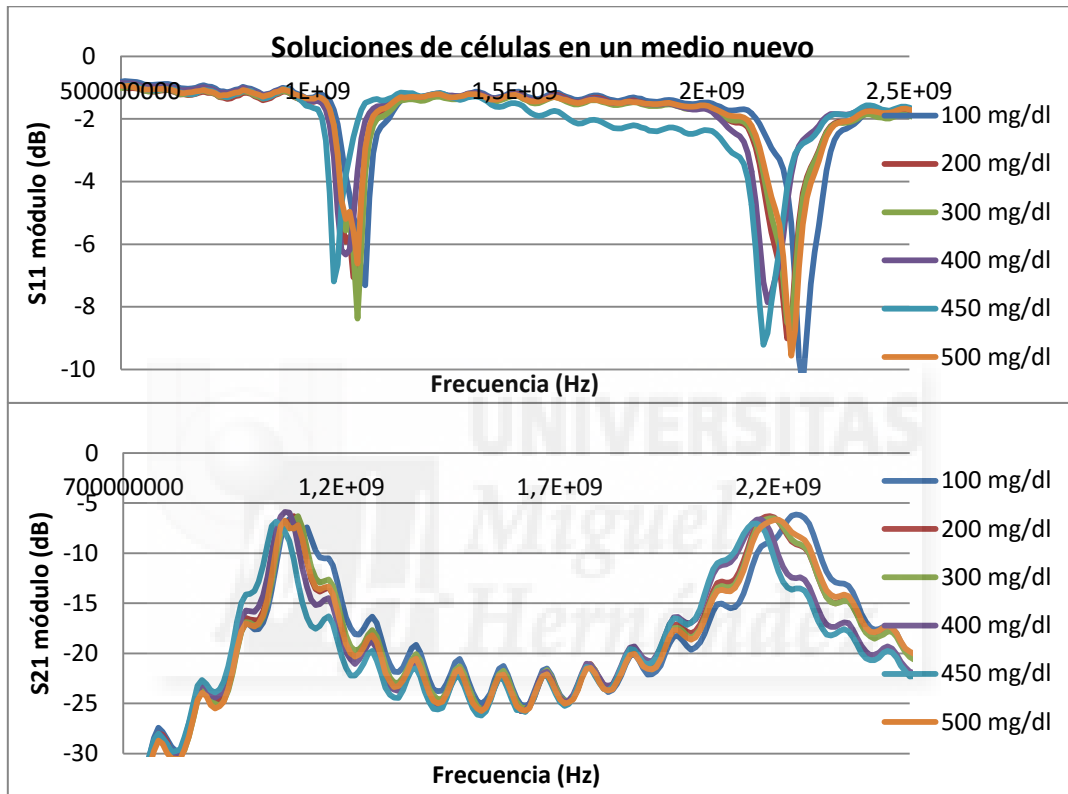


Gráfico 5 Representación de las soluciones de células en un medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un resonador de líneas de meandro para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias, y en el Y el parámetro de dispersión S11 y S21, respectivamente.

Tras estudiarse el gráfico 6 con detenimiento se pueden distinguir 3 zonas de diferente frecuencia resonante. La primera zona descendente engloba los valores de 1g/l y 2g/l, la segunda zona forma un pico entre 2g/l y 4.5 g/l, con un pico en el 4g/l; por último, la tercera zona que es ascendente y va desde 4.5 g/l a 5 g/l. No se puede concluir que la permitividad o en este caso la frecuencia resonante sigan una clara correlación con la concentración de glucosa.

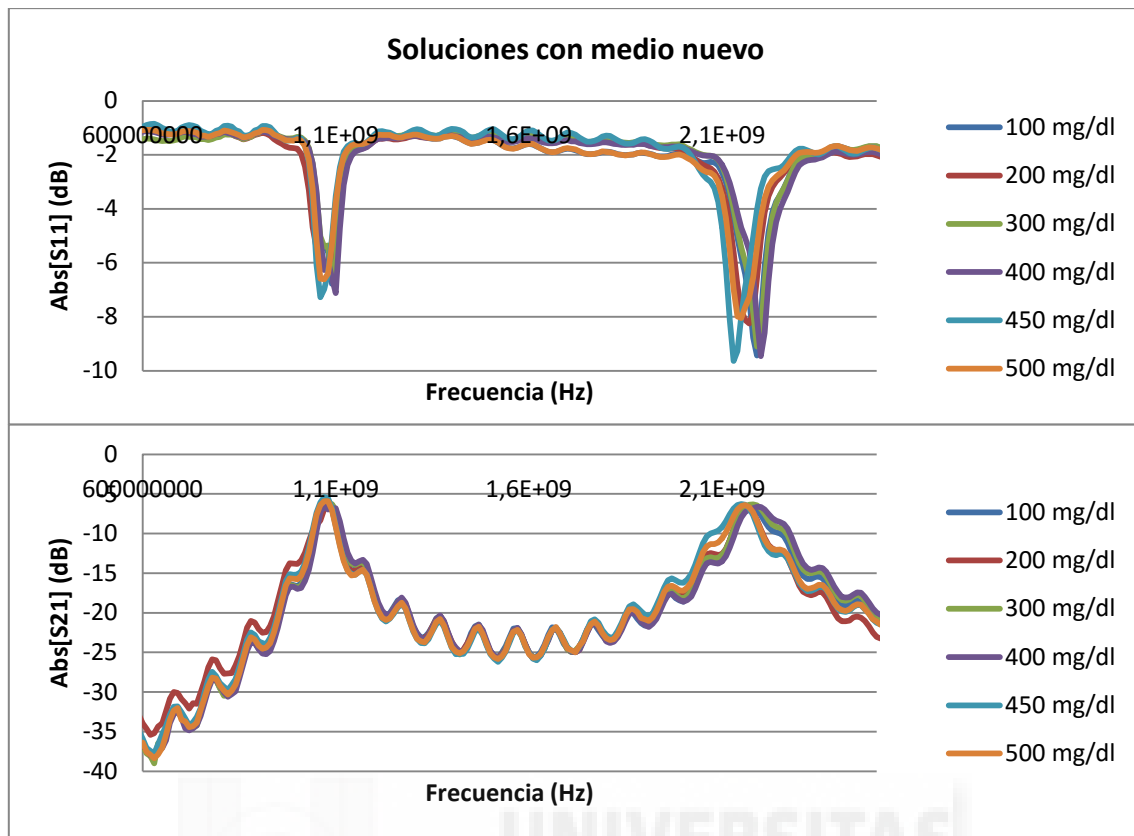


Gráfico 6 Representación de las soluciones de medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un resonador de líneas de meandro para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias, y en el Y el parámetro de dispersión S11 y S21, respectivamente.

Las diferencias entre concentraciones de glucosa, en referencia a la frecuencia resonante de las soluciones formadas por los medios en los que las células estuvieron cultivadas durante 7 días, indican una mayor similitud con las soluciones con células que con el medio limpio. Esto se debe en parte a que las soluciones con el medio que ha sido utilizado para cultivar las células poseen células muertas o en división que estaban en suspensión con el medio. Además es un medio más complejo en cuanto a metabolitos de desecho y otros productos, así como, una menor cantidad de glucosa que ha sido usada en el metabolismo celular. Las soluciones de medio cultivado, al igual que las soluciones con células, producen un desplazamiento a valores menores de frecuencia resonante. En este caso las variaciones son menores comparadas con las del medio con células. Los resultados mostrados en el gráfico 7 son, además de lo indicado anteriormente, menos previsibles ya que al desconocer los componentes exactos de este medio no es posible establecer relaciones. Indicar además que la concentración de glucosa en el medio nombrado como 4.5 g/l no será esa debido al metabolismo celular.

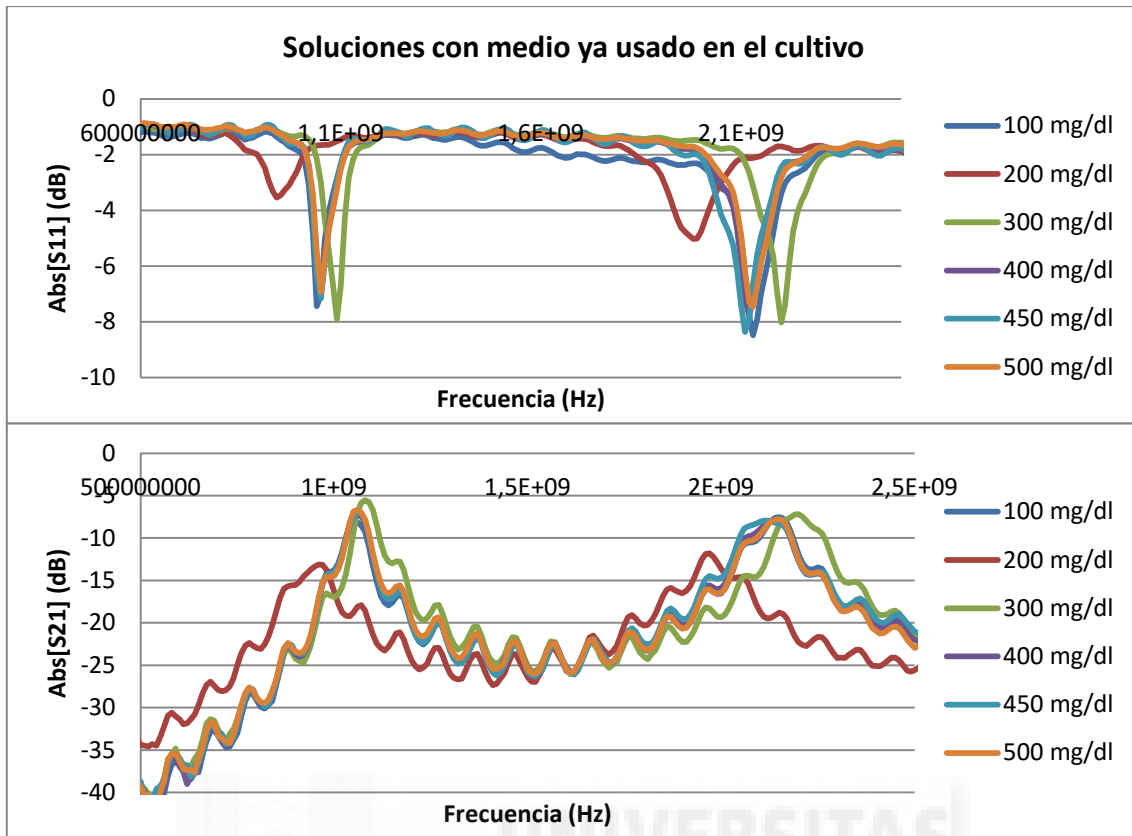


Gráfico 7 Representación de las soluciones de medio ya usado en el cultivo celular de fibroblastos 3T3 con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un resonador de líneas de meandro para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias, y en el Y el parámetro de dispersión S11 y S21, respectivamente.

En base a anteriores artículos de Carlos G. Juan et al. se sabe que el resonador circular aporta información sobre las zonas en las que la concentración de glucosa se encuentra. Por otro lado el resonador de líneas de meandros se usa para determinar la concentración de glucosa más eficazmente una vez la zona ha sido obtenida. Para ello es necesario traducir las variaciones de frecuencia a permitividad e intentar establecer una relación entre la permitividad y la concentración de glucosa. Como se ha indicado previamente, la frecuencia de resonancia es inversamente proporcional a la permitividad relativa en todas las antenas; lo que se desconoce es el tipo de relación entre la permitividad relativa y la concentración de glucosa.

Estudiando con detenimiento los valores de frecuencia resonante, obtenidos mediante el resonador circular de las soluciones de medio nuevo sin células, representados en la gráfica 9 se llega a la siguiente conclusión. Se pueden distinguir 3 zonas al igual que ocurría con el resonador de líneas de meandro, solo que esta vez las zonas son diferentes. La primera zona está formada por un pico debido al valor de 1 g/l. A continuación se forma un valle con el mínimo en 2 g/l y tras este se encuentra una meseta que equivale a la zona 2 que engloba el

valor de 2, 3 y 4 g/l. El valor de 4.5g/l forma una depresión no muy pronunciada que empieza a ascender hasta formar un pico con máximo en 5g/l. Esta última es la tercera zona. En el grafico 8 se muestran de forma visual las diferentes zonas tanto para el resonador circular como para el resonador de líneas de meandro. Indicar que estos valores son datos crudos obtenidos mediante el VNA por lo que es necesario aún un procesamiento mediante diversos algoritmos con el fin de obtener las frecuencias de resonancia reales de manera precisa.

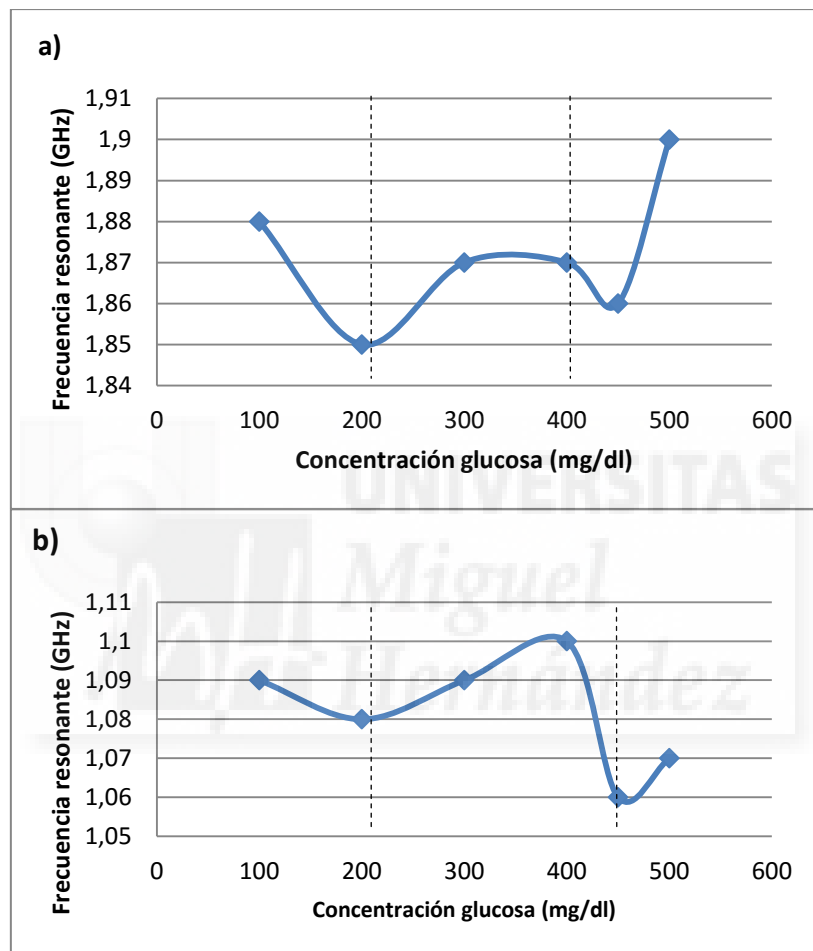


Gráfico 8 Representación de la frecuencia resonante frente a las concentraciones de glucosa utilizadas. Se utilizó el resonador circular (a) y el resonador de líneas de meandro (b) y soluciones de medio nuevo sin células.

En cuanto a las diferencias entre el medio nuevo con células (gráfico 10) y sin células (gráfico 9) no se observa gran diferencia a excepción del valor de 5 g/l. Las diferencias en cuanto a la frecuencia resonante a la que se produce el valle o pico respectivamente en el resto de valores no son apreciables. Corroborando los resultados obtenidos con el resonador de líneas de meandro, los valores obtenidos por medio del resonador circular del medio en el que ya se han cultivado células (gráfico 12) se desplazan a valores menores de frecuencia resonante comparados con los obtenidos con el medio nuevo (gráfico 9).

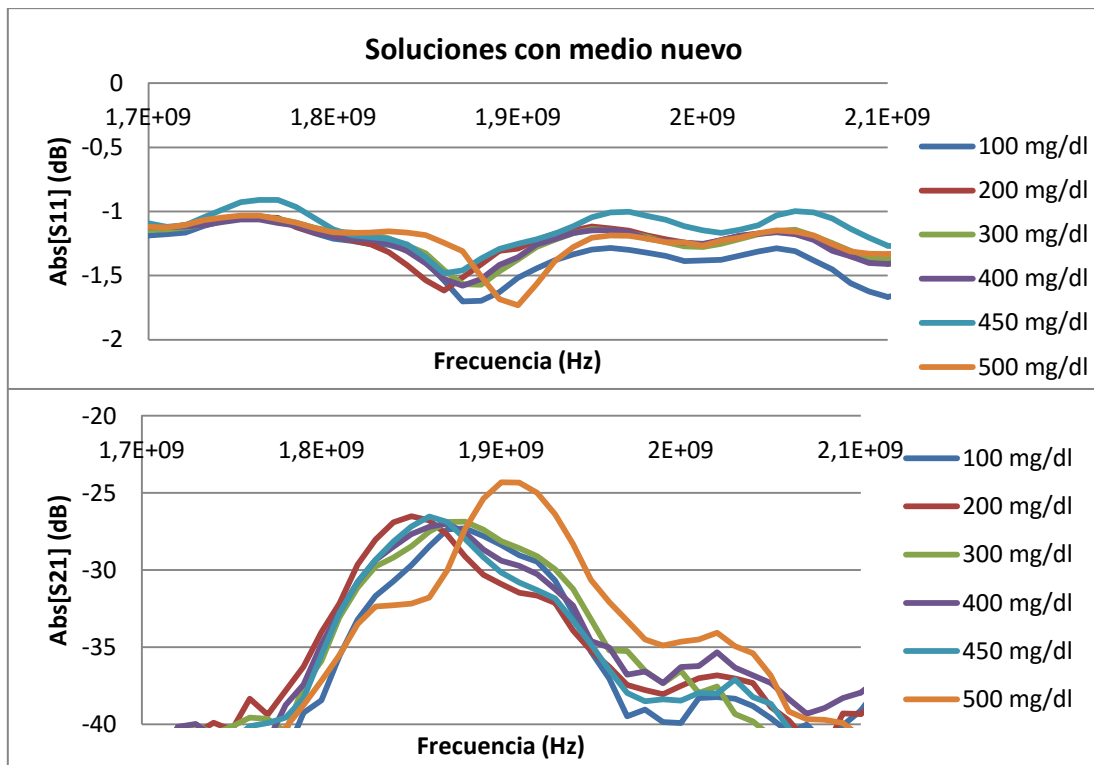


Gráfico 9 Representación de las soluciones de medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un resonador circular para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias, y en el Y el parámetro de dispersión S11 y S21, respectivamente.

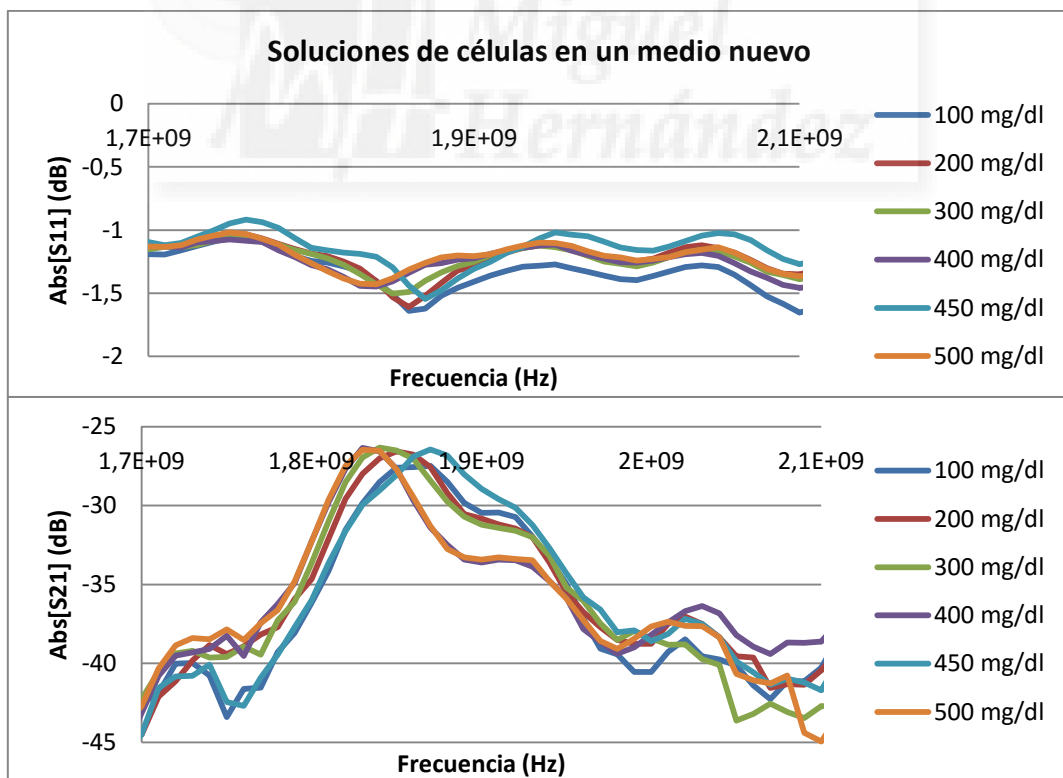


Gráfico 8 Representación de las soluciones de células en un medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un resonador circular para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias, y en el Y el parámetro de dispersión S11 y S21, respectivamente.

El estudio con más detenimiento de las frecuencias resonantes para el resonador circular en el medio en presencia de células muestra claramente la disminución de las frecuencias resonantes con la mayor complejidad del medio. (Gráfico 11)

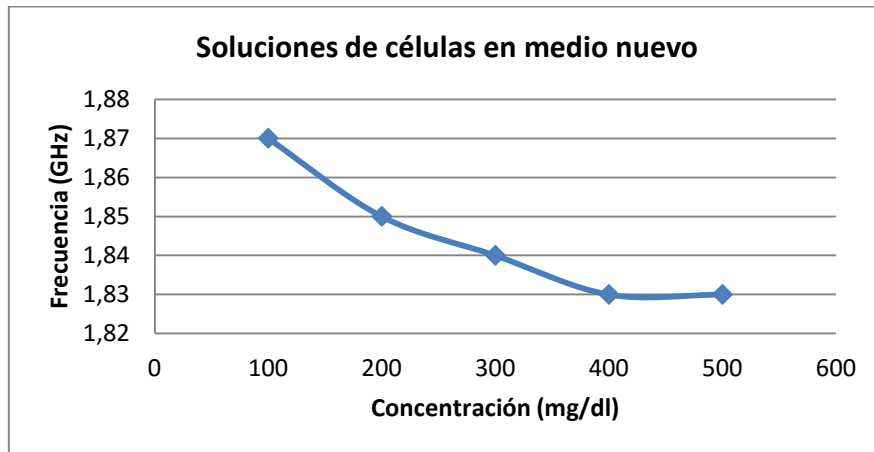


Gráfico 9 Representación de las soluciones de células en un medio nuevo con diferentes concentraciones de glucosa mediante un resonador circular. En el eje X se muestran las diferentes concentraciones mientras que en el Y las frecuencias.

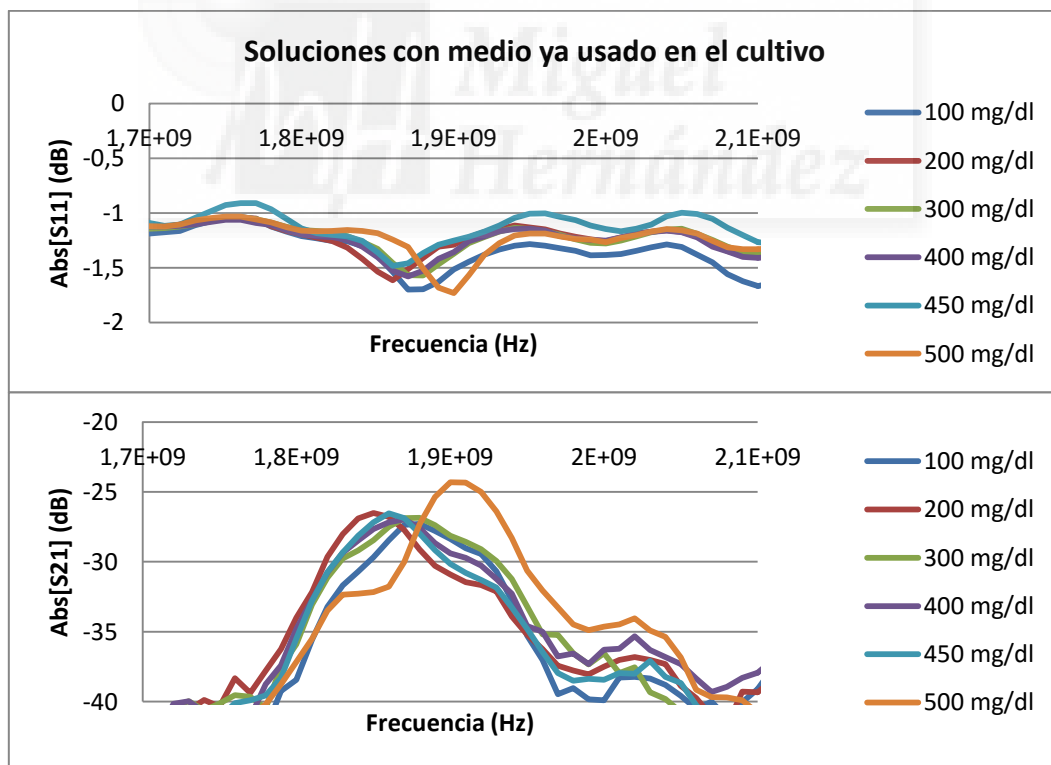


Gráfico 10 Representación de las soluciones de medio ya usado en el cultivo celular de fibroblastos 3T3 con diferentes concentraciones de glucosa. Se ha usado un resonador circular para realizar las medidas. En el eje X se muestran las diferentes frecuencias, y en el Y el parámetro de dispersión S11 y S21, respectivamente.

En referencia a la segunda parte, al estudio de monocapas de células de lengua y al cultivo 3D, no se analizarán los resultados, tan solo el cultivo de las células de lengua. No se pudo realizar el cultivo primario con diferentes concentraciones de glucosa debido al escaso crecimiento en un medio con concentración de glucosa idónea para el crecimiento celular. Se intentó realizar un cultivo heterogéneo de los diferentes tipos celulares que se pueden hallar en la lengua, pero finalmente el resultado fue diferente. A pesar de aumentar los tiempos en los que las células estaban en contacto con las enzimas tripsina y colagenasa, a la hora de cultivar se siguieron observando acúmulos celulares. Estos acúmulos indican que la disgregación no fue perfecta. Se evitó el uso de un medio de fibroblastos debido al rápido crecimiento de estas células que bloquearía el crecimiento de otras células de interés, se puede observar que aun así proliferó sobretodo este tipo celular. En la figura 8 se observan las células tras 7 días después de realizarse el cultivo primario.

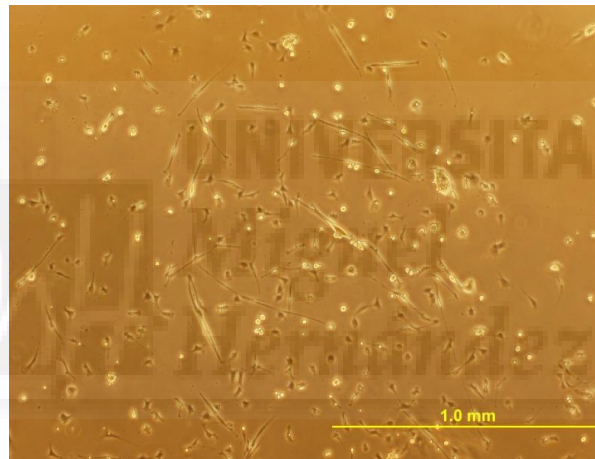


Figura 8. Cultivo celular primario de células de lengua tras 7 días.

Debido al hecho de que el medio no era el idóneo para el crecimiento de las células se vio una escasa proliferación, es decir, no aumentó apenas la concentración celular. Esto se comprobó al realizar una tripsinización de las células. La concentración celular se calculó de la mezcla de 3 cubreobjetos en los que se habían cultivado 250000 células dando como resultado un número menor del esperado aunque no hubiesen crecido. Tras dos semanas los cultivos empezaban a involucionar, a desdiferenciarse volviéndose similares a células germinales con un núcleo muy activo que se engrosaba. Este paso se daba tras el alargamiento de las células. Como se indicó anteriormente se realizó la tripsinización de dichas células y se cultivó otra vez durante 4 días. El resultado fue que el número de células de morfología más indiferenciada estaban en muy poca cantidad y se observaron fibroblastos, neuronas y células de glía. Es posible que estas células neuronales proviniesen de una contaminación al extraer

las células de lengua tras realizarse la extracción de corteza, células de glía y neuronales del mismo feto (figura 9). Otra posibilidad es que las células neuronales provienen de los nervios que encontramos en la lengua, que proliferan al estar en contacto con un medio de neuronas y suplemento como el B27 de células neuronales.

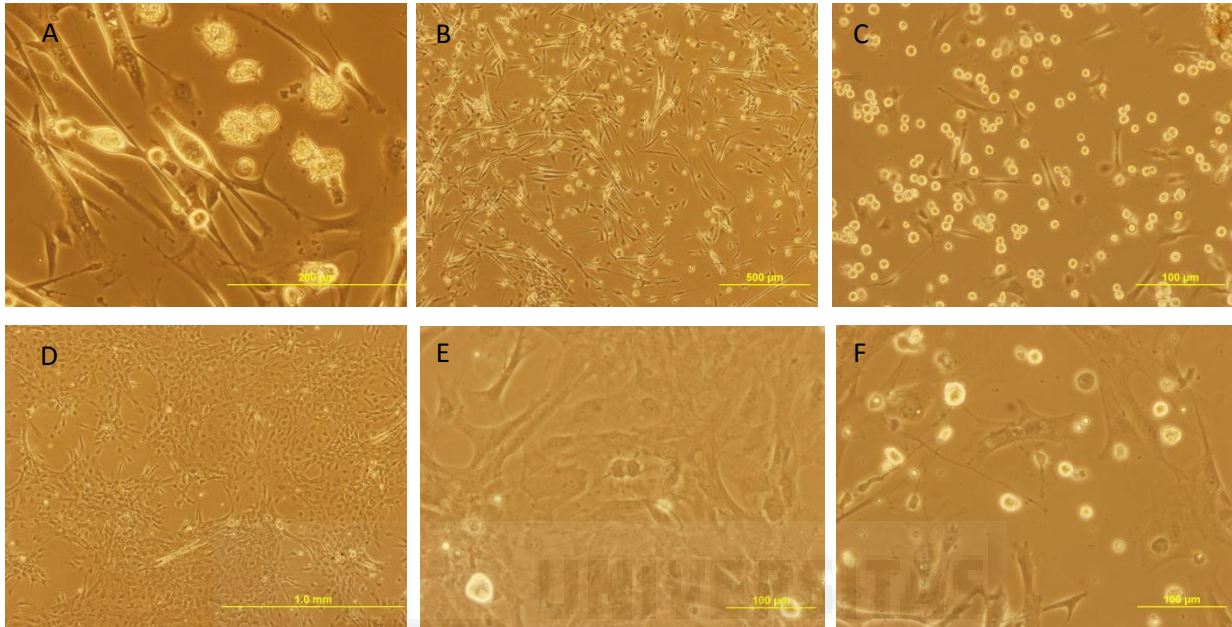


Figura 9 A) Detalle de los núcleos engrosados; B y C) Cultivo primario de células de lengua tras 11 días sin tripsinizar; D) Cultivo primario de células de lengua de 4 días tras tripsinizar; E) Detalle de células en división tras el tripsinizado. F) Detalle de una célula de glía en un cultivo tras ser tripsinizado.

Se estudió en profundidad el crecimiento de estos cultivos en el tiempo debido a que se observaba que cambiaba su morfología totalmente, llegando a lo que se parecía una involución. Cabe destacar que además muchos de los cultivos diferían de otros realizados a partir de la misma muestra inicial de lengua de feto. Tal y como se observa en la figura 10, las células empezaban a alargarse mientras que al mismo tiempo su núcleo se hacía cada vez más grande y activo. Tras esto, la célula se convertía en todo núcleo y se desanclaba de la base. Estas células se unían y formaban un aglomerado.

Tras observarse el cambio morfológico característico de la mayoría de las células en el cultivo se comprobó que tenía gran similitud con los cultivos celulares de papilas gustativas. Se formaron este tipo de células a pesar de que en estudios anteriores de Ozdener et al (2006) se concluye que el mejor modo de que las células se unan al cubreobjetos es utilizando colágeno de tipo 1 como material de adhesión. El PDL es el menos efectivo de los que se estudiaron. Ozdener *et. al* (2012) muestran que los cultivos celulares de papilas gustativas del tipo fungiforme crecen en agrupamientos celulares como los observados en las placas (figura 11). Estos investigadores trabajaron con papilas gustativas humanas. Durante los 15-30

primeros días las células tenían una apariencia compacta pero tras encontrarse en la confluencia celular estas empezaron a mostrar una morfología elongada y polarizada.

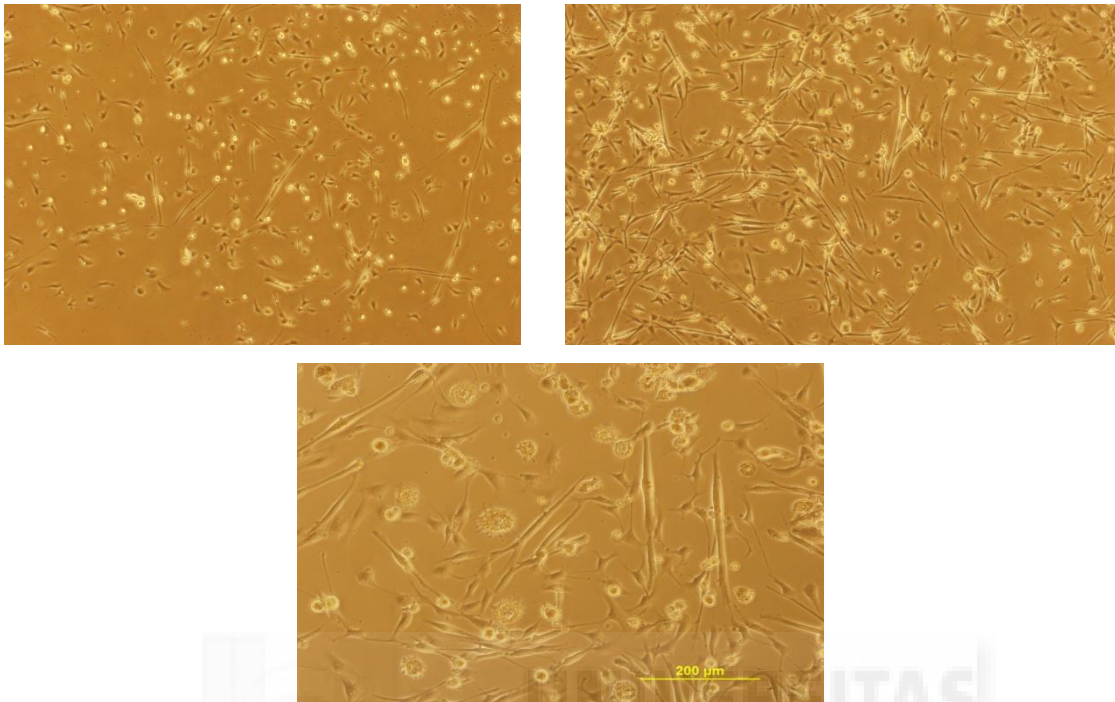


Figura 10. Células tras 4 días, se empieza a observar que las células se alargan y se ensanchan los núcleos. B) Tras 11 días la concentración celular aumentó así como las células desprendidas y las células de morfología alargada. C) Detalle de las células desprendidas y los núcleos engrosándose.

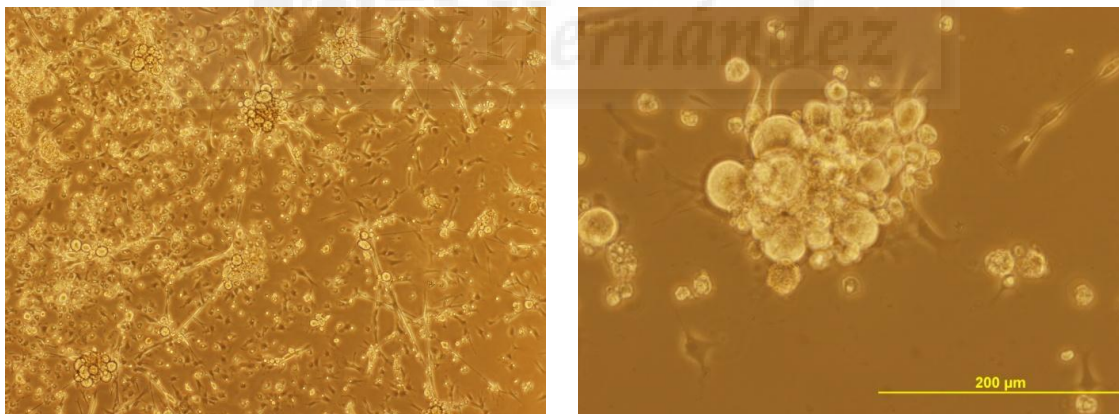


Figura 116 Cultivo primario de lengua de feto de rata tras 18 días. B) Detalle del agregado de células a un mayor aumento (20x)

En la Figura 12 se observan unas células que no han podido ser clasificadas, para ello se deberían haber fijado y teñido o haber sido caracterizadas por otros métodos. En principio se encuentra bastante similitud con una contaminación con levaduras. Otra opción es que debido a su comportamiento con las otras células de alrededor puede ser que estén relacionadas con las papilas gustativas en la formación del poro gustativo.

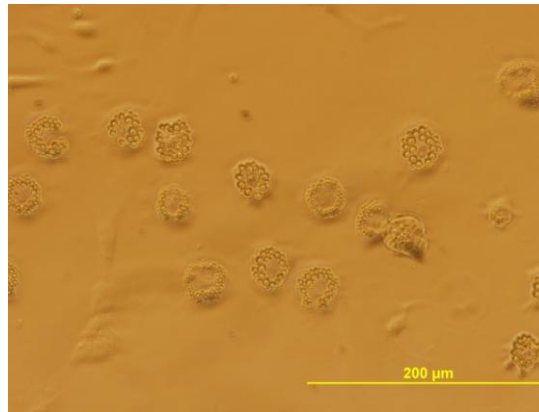


Figura 12 Cultivo primario de lengua de feto de rata a 20x tras 11 días.

Por último, los cubreobjetos en los que no se observaba una monocapa de células y/o habían demasiadas células contraídas con morfología circular y en la mayoría de los casos desprendidas del cubreobjetos, se tripsinizaron con el fin de obtener una gran cantidad de células para insertarlas en la matriz de colágeno (Figura 13). Lo mismo se iba a realizar con la impresora 3D. Como no era conveniente realizar tinciones o inmunohistoquímica que podría afectar a la medición, no se pudo observar la matriz de colágeno con otros microscopios más potentes como el microscopio confocal.

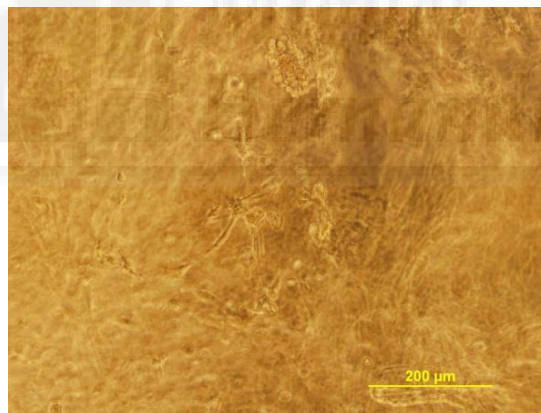


Figura 13 Visualización de células en la matriz de colágeno mediante el microscopio invertido de placa.

Discusión

En referencia al estudio del conector coaxial podemos concluir que los desplazamientos, tanto en el eje X como en el eje Y, nos aportan información de las zonas de frecuencias a las que las antenas se comportarán mejor. Dichos desplazamientos permiten construir antenas adaptadas a las zonas de frecuencias óptimas. En el presente estudio los cambios se encuentran entre 1 y 1.5 GHz siendo estas las frecuencias más interesantes desde

el punto de vista dieléctrico. Al establecer la región con los resultados del coaxial, se puede afirmar que los cambios que se observan a esas frecuencias se deben a la glucosa.

En cuanto a las soluciones con células y sin ellas, así como usando medios más complejos y reales con diferentes productos metabólicos, se puede concluir que tanto la presencia de células como la mayor complejidad del medio producen un desplazamiento a frecuencias resonantes menores. No es posible sacar una conclusión clara de los medios en los que han crecido las células más allá de que se producen diferencias frente a las otras soluciones, y que las variaciones son menores conforme aumenta la complejidad del medio. Esto se corrobora en la comparación entre las soluciones de agua con glucosa y las soluciones de leche en las que en general cuanto más complejo es el material a estudio las variaciones son menos apreciables. Las soluciones con el medio donde se cultivaron las células se ven afectadas por la cantidad de células que han crecido en el, los productos de desecho o metabolitos diversos expulsados por las células, la disminución de glucosa y las células muertas y en división. Esto se corrobora sobretodo con la solución formada por las células en el medio de 4.5 g/l. Este difiere del resto al poseer una mayor concentración celular y un medio comercial distinto. Además posee otro tipo de glucosa ya que no posee la glucosa en polvo que se añadió en los otros medios.

En general, las células provenientes de cultivos primarios son objeto de desdiferenciación e inestabilidad cromosómica, caracterizado por las pérdidas o ganancias de los cromosomas durante la replicación celular en líneas celulares continuas. Otro problema recae en que los cultivos nunca llegan a una confluencia total entre las células del 100% como ocurre in vivo. Todo esto afecta a los cultivos celulares y junto con el medio incorrecto y el uso de PDL son las razones por las que el cultivo celular de lengua no ha sido del todo exitoso. Se esperaba encontrar además de estas células de las papilas gustativas, otras como músculo y tejido epitelial. Cabe la posibilidad que el uso de suplementos neuronales como el B27 y medio neurobasal hayan promovido el crecimiento de las células de las papilas gustativas. Esto se encuentra corroborado por Takeda et. al y Hosley et. al que sugieren que para el mantenimiento del cultivo de las papilas gustativas es necesario añadir factores neurales.

Conclusiones y proyección futura

A pesar de que se trata de un estudio muy preliminar, los resultados obtenidos sugieren la existencia de una relación entre la permitividad y la concentración de glucosa. La

importancia de este hecho recae en que será útil en el desarrollo de un potencial sensor no invasivo para la comunidad de diabéticos de todo el mundo. Además, en diferencia a los resultados obtenidos en anteriores trabajos cuyos resultados están a espera de ser publicados, se ha podido observar el efecto de la concentración celular disminuyendo las diferencias observables por la variación de glucosa y desplazando los resultados a valores de frecuencia resonante menores.

La conclusión que se extrae del presente trabajo es que las frecuencias a las que se observan cambios en la respuesta dieléctrica están en torno a 1 y 1.5 GHz. Además es importante comentar que la complejidad del medio produce desplazamientos a valores de frecuencia resonante más pequeños. Estos resultados se han observado mediante las antenas usando medios con células y medios en los que se han cultivado las células frente a medios nuevos de concentración de glucosa conocida.

Se puede concluir que existe una relación entre la permitividad relativa y el nivel de glucosa en sangre pero se hace necesaria una mayor investigación para definir con exactitud el tipo de relación existente. Indicar que los resultados de la frecuencia resonante frente a la concentración de glucosa para los resonadores de tipo líneas de meandro y circulares son muy similares a los encontrados en soluciones de agua con glucosa.

El siguiente paso a este trabajo es analizar los resultados obtenidos de los cultivos en monocapa y en 3D mediante la matriz de colágeno. Será útil poder comparar estos resultados con los realizados en suspensión. Estos resultados serán en principio más reales que los anteriores.

En un futuro será necesario seguir investigando, con el fin de encontrar una relación entre la permitividad y la concentración de glucosa, para poder desarrollar un sensor no invasivo de glucosa basado en las constantes dieléctricas de esta molécula. Sería útil realizar un estudio con diferentes concentraciones de glucosa en un cultivo en monocapa o 3D, así como estudiar el efecto de la flora bacteriana de la boca y los diferentes hábitos higiénico-bucodentales o el tabaco, por ejemplo.

Bibliografía

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, Volume 27, Supplement 1, January 2004

- [2] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes. *Diabetes Care* 20:1183–1197, 1997
- [3] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes . *Diabetes Care* 26:3160–3167, 2003
- [4] Etienne G. Krug. (2016). Trends in diabetes: sounding the alarm. *The Lancet*. Volume 387, No. 10027, p1485–1486, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30163-5
- [5] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes, Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047–53.
- [6] Weinstock et al. Risk factors associated with severe hypoglycemia in older adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2016;39:603–610
- [7] K. Yan, D. Zhang, D. Wu, H. Wei y G. Lu, «Design of a Breath Analysis System for Diabetes Screening and Blood Glucose Level Prediction,» *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 61, n° 11, pp. 2787-2795, 2014.
- [8] Ginsberg, Barry H. An overview of minimally invasive technologies. *Clinical Chemistry*, 38, 9 1596-1600. 1992
- [9] B. D. Cameron y G. L. Côte, «Noninvasive Glucose Sensing Utilizing a Digital Closed-Loop Polarimetric Approach,» *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 44, n° 12, pp. 1221-1227, 1997.
- [10] Y. Hayashi and et al., "Dielectric Spectroscopy Study of Specific Glucose Influence on Human Erythrocyte Membranes," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 36, pp. 369-374, 2003.
- [11] Carlos G. Juan et al. Dielectric Characterization of Water Glucose Solutions Using a Transmission/Reflection Line Method.
- [12] Chummy S. Sinnatamby. Anatomía de Last: regional y aplicada. Editorial Paidotribo, 2003
- [13] Ozdener H, Spielman AL, Rawson NE. Isolation and culture of human fungiform taste papillae cells. *J Vis Exp*. 2012 May 17;(63):e3730. Doi: 10.3791/3730.
- [14] Williams BR, Gelman RA, et al. Collagen fibril formation. Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. *J Biol Chem*. 1978;253(18):6578–6585.
- [15] Vira V. Artym, Kazue Matsumoto, Imaging Cells in Three-Dimensional Collagen Matrix. *Curr Protoc Cell Biol*. 2010 Sep; Chapter: Unit–10.1820. doi: 10.1002/0471143030.cb1018s48
- [16] Hakan Ozdener, et. Al. Characterization and Long-Term Maintenance of Rat Taste Cells in Culture, *Chem. Senses* 31: 279–290, doi:10.1093/chemse/bjj030 (2006)

- [17] Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. (1992) Neural cell adhesion molecule of taste buds. *J. Electron Microsc.*, 41, 375–380.
- [18] Hosley, M.A. and Oakley, B. (1987) Postnatal development of the vallate papilla and taste buds in rats. *Anat. Rec.*, 218, 216–222.

