

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Evaluación computacional en andamios por prototipado rápido para la ingeniería de tejidos

Andy L. Olivares

Tesis presentada para optar por el grado de
Doctor en Ciencias

Programa de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica



Departamento Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica

Universitat Politècnica de Catalunya

España

Director: Dr. Damien Lacroix

2011

*A Angie y a Lily,
Serán siempre “Mi Gran Inspiración”*

*A mi familia y amigos,
Por su cariño y apoyo*

*“Debe ser simple para ser cierto.
Si no es simple, probablemente no podremos descifrarlo”*
ALBERT EINSTEIN

Publicaciones y Presentaciones

Artículos de revistas

Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. **Andy L. Olivares**, Elia Marsal, Josep A. Planell, Damien Lacroix. *Biomaterials* 30 (2009) 6142-6149.

Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing. Rosaria Santoro, **Andy L. Olivares**, Gerben Brans, Dieter Wirz, Cristina Longinotti, Damien Lacroix, Ivan Martin, David Wendt. *Biomaterials* 31 (2010) 8946-8952.

The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding. Ferry P.W. Melchels, Beatrice Tonnarelli, **Andy L. Olivares**, Ivan Martin, Damien Lacroix, Jan Feijen, David J. Wendt, Dirk W. Grijpma. *Biomaterials* 32 (2011) 2878-2884.

Simulation of cell seeding within a porous scaffold under perfusion using computational fluid discrete particles motion. **Andy L. Olivares** and Damien Lacroix. *En revisión en Tissue Engineering Part C: Methods.*

Capítulo de Libro

Computational Methods in the Modeling of Scaffolds for Tissue Engineering. **Andy L. Olivares** and Damien Lacroix. Book "Computational Modeling in Tissue Engineering" published by Springer-Verlag. Editor in Chief Prof. Amit Gefen of Series entitle "Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials". *En revisión.*

Presentaciones en Congresos

Bioreactor based engineering of large-scale engineered cartilage grafts for joint resurfacing. Santoro, R; Brans, G; **Olivares, A. L.**; Lacroix, D; Jakob, M.; Martin, I; Wendt, D. ORS 2009-0777. Oral Presentation. Orthopedic Research Society. 55th Annual Meeting, Las Vegas, US. Feb 22-25, 2009.

Numerical study of mechanical stimuli in regular scaffolds for tissue engineering. **Andy L. Olivares**, Josep A. Planell, Damien Lacroix. Oral Presentation and Poster. IBEC Symposium, Barcelona, Spain, April 14-15, 2009.

Mechanical properties and perfusion profile in gyroid scaffold models for tissue engineering. **Andy L. Olivares**, Josep A. Planell, Damien Lacroix. Oral Presentation. ESB2009, European Society of Biomaterials, Lausanne, Switzerland. Sept 7-11, 2009.

Selection of scaffolds design and its environment for tissue engineering. **Andy L. Olivares**, Josep A. Planell, Damien Lacroix. Poster. 2nd China-Europe Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine, Barcelona, Spain, Nov 17-20, 2009.

Design of 3D scaffolds for tissue engineering applications. **Andy L. Olivares**, Josep Planell, Damien Lacroix. Oral Presentation. 9th International Symposium. Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering. CMBBE. 2010. Valencia, Spain, Feb 24-27, 2010. (Paper contribution ISBN: 978-0-956212-3-9).

Prediction of cell seeding on regular scaffold using spherical particles. **Andy L. Olivares**, Damien Lacroix. Oral Presentation and Poster presentation. IBEC Symposium, Barcelona, Spain, IBEC Symposium, Jun, 2010.

Perfusion Model System to Generate Engineered Grafts with Controlled Cellular Distributions. B. Tonarelli, F. P. W. Melchels, **A. L. Olivares**, D. Lacroix, D. W. Grijpma, I. Martin, D. Wendt. Oral Presentation. TERMIS, Galway, Ireland, Jun 13 - 17, 2010.

Simulation of cell seeding within a porous scaffold under perfusion using computational fluid discrete particles motion. **Andy L. Olivares**, Damien Lacroix. Oral presentation. 6th World Congress on Biomechanics. Singapore. Aug 1 - 6, 2010.

Discrete modelling of cell motion within a porous scaffold under perfusion. **Andy Olivares**, Damien Lacroix. Poster Presentation. 23rd European Conference on Biomaterials. ESB2010. Finland. Sept 2010.

Simulations of cell seeding using particles code and rapid prototyping scaffold. **Andy L. Olivares**, Damien Lacroix. Poster Presentation. TERMIS2011. Granada, Spain. Jun 7-10. 2011.

Simulation of cell seeding on porous scaffold through particles motion. **Andy L. Olivares**, Damien Lacroix. Oral Presentation. ISB2011, Brussels, Belgium, Jul 3-7, 2011.

Dynamic cell seeding simulated by particles motion on regular scaffold. **Andy L. Olivares** and Damien Lacroix. Oral Presentation and Poster. ESB2011, European Conference on Biomaterials, Dublin, Ireland, Sept 4-11, 2011.

Application of particles code to cell seeding on scaffold for functional tissue engineering. **Andy L. Olivares** and Damien Lacroix. Oral Presentation. Particles2011, Barcelona, Spain, Oct 26-28, 2011

Simulation of cell seeding on regular scaffold under numerical perfusion of particles. **Andy L. Olivares**, Damien Lacroix. Poster presentation. IBEC Symposium, Barcelona, Spain, IBEC Symposium, Oct, 2011.

Resumen

En la ingeniería de tejidos son utilizados los andamios porosos con el objetivo de reemplazar los defectos biológicos y para que sobre estas estructuras ocurra la formación de los nuevos tejidos. Los andamios deben garantizar ciertos requisitos en dependencia de la aplicación. Los ensayos y análisis experimentales en la ingeniería de tejidos llegan a ser muy costosos y en la mayoría de las ocasiones los procesos graduales que ocurren dentro de los andamios no son bien conocidos. En esta tesis se utiliza la simulación numérica para evaluar la influencia de la morfología de los andamios, así como las condiciones de cultivo en el crecimiento del tejido bajo experimentos *in vitro*. Debido a la necesidad de optimizar los procesos como el sembrado y el cultivo celular, los avances durante la tesis han llevado a proponer metodologías y diseños de poros para los andamios que ayuden a una mejor comprensión de las respuestas celulares.

Las condiciones físico-químicas del cultivo se desarrollan generalmente en sistemas de bioreactores encargados de reproducir y garantizar un ambiente más eficiente. En esta tesis se propone un método para analizar la posibilidad del escalado de un bioreactor de perfusión, intentando transferir los resultados desde una escala experimental hacia una aplicación clínica para la cual se demanda un mayor tamaño de injerto. Específicamente se desea obtener un cartílago articular que permita realizar un recubrimiento total de rodilla (*diámetro=50 mm*). Un método que garantiza la aplicación de las propiedades macroscópicas (permeabilidad) del biomaterial al paso del fluido de perfusión fue desarrollado. Con el uso de simulaciones de dinámica de fluido se determinó cual es el diseño de bioreactor de los propuestos que brinda una distribución de las células (sembrado) y de estímulos (cultivo) más homogénea y que por lo tanto podría garantizar un crecimiento uniforme del cartílago. Se verifica que el crecimiento del cartílago para el recubrimiento de la rodilla mediante el uso del bioreactor seleccionado es efectivo.

Diferentes morfologías de poros (rápido prototipado) son evaluadas numéricamente. Se seleccionan dos diseños bases para los estudios, uno con una morfología giroide y el otro con forma de un prisma hexagonal. Para ambos diseños fueron analizadas porosidades de 55% y 70%, para un tamaño ($400\mu\text{m}$) controlado a partir del elemento representativo de volumen. Aplicando condiciones de flujo de fluido de perfusión o deformaciones bajo compresión axial, se determinan los estímulos mecánicos iniciales que sienten las células. Estos estímulos son vinculados a una posible respuesta de diferenciación celular guiada por una teoría de mecano-regulación. Se concluyó que arquitecturas similares a la giroide llevan a una mejor accesibilidad del fluido y por lo tanto llevan a una mayor eficiencia durante el sembrado celular. Según la teoría de mecano-regulación se determinó que el proceso de diferenciación es más sensitivo a la aplicación de flujos de fluidos que al empleo de las deformaciones axiales sobre el andamio.

Basados en el hecho que la estructura giroide se mostró como la más efectiva en la distribución del fluido se desarrolló en colaboración con otras universidades un sistema para el control del sembrado celular mediante 1) la predicción de los estímulos mecánicos, 2) la distribución de los poros giroide y 3) la verificación experimental de los ensayos de perfusión. Los andamios se reconstruyeron partiendo de las imágenes de micro tomografía. Dos diseños de andamios fueron analizados, uno con una distribución de tamaño de poro isotrópico ($412 \pm 13 \mu\text{m}$) y el otro con una variación gradual de tamaño de poro ($250\text{-}500 \mu\text{m}$). Los resultados mostraron como los estímulos calculados fueron más uniforme en el andamio isotrópico (15s^{-1} y 24s^{-1}) y como variaron gradualmente (12s^{-1} - 38s^{-1}) en el segundo tipo de andamio. La distribución de las células sembradas también siguen el patrón de la distribución de los estímulos y los poros. De esta manera se traza un sistema para el control del sembrado celular. La relación mostrada fue la siguiente: mayor densidad de células donde el tamaño de poro es mayor y donde el transporte de flujo es mayor.

Finalmente se propone una *nueva metodología* para evaluar el sembrado de las células bajo condiciones de perfusión. En esta ocasión el proceso de sembrado es simulado mediante un modelo multifases Lagrangiano y reproduciendo de manera más completa y compleja las condiciones experimentales de perfusión oscilante que se aplicaron durante el desarrollo del sistema de control anterior. Las células para esta metodología fueron simuladas como partículas esféricas que se encuentran suspendidas en el medio de cultivo. Se propone una teoría existente como el principio de una posible analogía para el control de la adhesión de las células en la superficie del andamio. Se obtiene como resultado una descripción en el tiempo del proceso de sembrado, lo que permitiría la optimización del proceso de sembrado. Se comprueba el dominio que se puede establecer mediante la distribución de la morfología controlada de los poros sobre la distribución de las células. A través del modelo se verifica la correspondencia entre la distribución de las células adheridas con respecto a los resultados experimentales. Las posiciones de las células pueden ser determinadas representando un nuevo método para determinar los inicios del desarrollo de tejidos descritos mediante teorías de mecano-biología.

Abstract

In tissue engineering, the ultimate goal of the development of degradable porous scaffolds integrated with cells is the regeneration of new living tissue to repair biological defects. Scaffolds have certain requirements depending on the application, since they have to provide cells physiological conditions for specific tissue regeneration. Mechanical environment has been widely recognized as a key condition for proper tissue formation, not only for cell differentiation but also for biological delivery during tissue formation.

In vitro analysis of scaffolds efficiency for tissue engineering is normally very expensive and it is generally difficult to control the processes that occur within the scaffolds. In this thesis numerical simulation were used in order to understand the influence of the morphology of scaffolds and culture conditions on different cellular processes, simulating in vitro experiments. Due to the need to optimize some of those cellular processes such as, cell seeding and cell culture different methodologies and scaffolds pores design were proposed to control the cellular responses.

Physic-chemical culture conditions can be reproduced using bioreactor systems since testing these factors using the dynamic environment of bioreactors has been proved to be more efficient that testing the same factors experimentally under static conditions. Also testes done under static conditions uses small scaffolds but some tissue defects happen in a larger scale. Thus, in this thesis a method to analyze a perfusion bioreactor at a larger scale is proposed. The goal is to apply the results from an experimental level to a clinical application, where a larger graft is necessary. This methodology can be used to create an articular cartilage capable to fully cover the knee (diameter = 50 mm). One method that ensures the implementation of the macroscopic properties (permeability) of the biomaterial was developed. Using fluid dynamics simulations, the bioreactor design to provide better distribution of cells in the scaffold (seeded) and the right amount of stimulus (culture) was determined. Briefly, simulation predictions for the articular cartilage formation showed that cartilage growth is more uniform for a more homogeneous fluid-flow distribution.

Different pores morphologies from rapid-prototyping fabrication were numerically evaluated. Two scaffold designs were proposed, one with gyroid morphology and the other with hexagonal prism shape. For both designs porosities of 55% and 70% were tested. In addition, different mechanical stimuli were computed to study the effect on cell adhesion. Mechanical stimuli are known to determine cell differentiation through a mechano-regulation theory. According to this theory, optimization of external conditions for cell differentiation were discussed comparing the effect of fluid-flow and axial compression. Fluid-flow was demonstrated to be more effective for cell differentiation on scaffolds that axial compression. The gyroid architectures lead to a better accessibility of the fluid into the scaffold, which can be related with higher efficiency during cell seeding.

Based on the fact that the gyroid structure leads to a most effective distribution of the fluid, a system to control cell seeding was developed. The parameters of the system were: 1) the prediction of mechanical stimuli (numerically), 2) the distribution of gyroid pore (fabrication) and 3) the experimental verification. The scaffolds were reconstructed based on micro CT images. Two type of scaffold were studied; one with isotropic pore size distribution ($412 \pm 13 \mu\text{m}$) and another with a gradual variation of pore size (250-500 μm). The results showed that on the isotropic scaffolds, the stimuli calculated were more uniform (15s^{-1} y 24s^{-1}) and varied gradually (12s^{-1} - 38s^{-1}) in the second type of scaffold. The distribution of the seeded cells also follows the pattern of distribution of stimuli and pores. Therefore, the use of scaffolds with bigger pore sizes and higher transport fluid velocity was demonstrated to be essential for a higher density of cells.

Finally, a new methodology to evaluate cell seeding under perfusion conditions was proposed. The entire process for cell seeding was simulated using a Lagrangian multiphase model. Experimental conditions used on the previous control study were mimicked. Spherical particles were used to represent cells initially suspended in culture medium. Cell adhesion was controlled on the scaffold surface when the cell hit the surface. Using this simulation, optimization of the process was achieved compared to the time to test the same conditions experimentally. The computed distribution of cells attached in the scaffold matches the distribution under experimental conditions and was obtained within fewer hours that the experimental analysis. This new method is capable of giving an accurate prediction of the positions of the particles that are adhered to the scaffold and in this way it is possible to control the exact points of tissue development. This is an important step for the understanding and control of the processes described by the mechano-biology theory.

Agradecimientos

En la realización de esta tesis he contado con el apoyo, guía y dedicación por parte de Dr. Damien Lacroix. Quiero agradecer infinitamente la confianza que me ha brindado y sobre todo por la influencia que han tenido sus ideas, críticas y sugerencias en mi manera de ver la investigación científica. También esta tesis es el resultado de su esfuerzo por animarme a continuar emprendiendo y formándome durante estos años.

Me gustaría agradecer a las dos instituciones que me acogieron a mi llegada a Barcelona, inicialmente el BIBITE (dirigido por Dr. Maria Pau Ginebra) y posteriormente el IBEC (dirigido por Dr. Josep Planell). Me siento muy afortunado por haber formado parte de estos colectivos durante mis estudios de doctorado y me llevo de ambos muy gratos recuerdos. A todos los investigadores, administrativos, técnicos y estudiantes de estos grupos, gracias por ser tan receptivos y por su apoyo en los años en los que puede formar parte de su entorno profesional y personal.

Durante esta tesis se colaboró con otras instituciones dentro del marco de un proyecto europeo (STEPS). A todos los colaboradores muchas gracias por sus ideas y por la disponibilidad que siempre mostraron. En especial me gustaría agradecer a Dr. Ferry Melchels y Dr. Dirk Gripman (Universidad de Twente), por sus contribuciones en esta tesis relacionada sobre todo en demostrar la posibilidad de fabricación mediante estereolitografía de los diseños de andamios que hemos analizado durante el transcurso del trabajo. Por otro lado mi agradecimiento a Dra. Beatriz Torranelli, Dr. Rosario Santoro, Dr. David Wendt, Dr. Ivan Martin, (Universidad de Basel), especializados en la experimentación in vitro (perfusión), su soporte experimental ha sido crucial para el desarrollo de esta tesis. A raíz de esta excelente colaboración ha quedado plasmada en algunas publicaciones relacionadas con este trabajo, muchas gracias.

A mis compañeros del día a día (Grupo de Biomecánica y Mecanobiología) muchas gracias. Soy consciente de la importancia de tener un grupo unido como el que hemos ido formando en estos años. Doy gracias por haber coincidido con muy buenos investigadores, amigos y personas. Todos tienen un granito de arena en esta tesis y así les dejo mis sinceros agradecimientos para Clara, Andrea, Sara, Jérôme, Ramiro, Jean Louis, Martin, Cecile, Aura, Carlos, Themis; Tony, Juan, Sol, Igor, Elias, Edouard, Rafa. Gracias a ustedes lo difícil se hace simple y llevadero, mucha suerte a todos, nunca los olvidaré.

A mis compañeros de la Universidad de Oriente, Cuba, gracias por apoyarme para poder afrontar este reto. Agradezco a MsC. Alberto Nacer por darme su voto de confianza y a todos los miembros del departamento de Mecánica y Diseño. Pero de manera muy especial a el Dr. Roberto Sagaró a quien le debo el hecho de haberme iniciado en el mundo académico y el cual se ha comportado como un padre y un amigo, opinando y siguiendo siempre todo el trabajo que se ha desarrollado durante esta tesis, gracias.

Esta tesis ha sido financiada en parte por la Agencia Española de Cooperación Internacional mediante una beca de estancia. Dentro del colectivo de la agencia quiero agradecer a Teresa María, quien es la coordinadora de esta beca en Cataluña, y quien se convirtió en una persona muy cercana y familiar para mí, siempre mostrando su interés y preocupación en que todo marchará bien en lo personal y en lo académico.

A todos mis amigos que aunque fuera del ámbito científico siempre me han brindado su apoyo aquí en Barcelona o desde Cuba, dejar plasmado lo imprescindibles que han sido durante estos años lejos de la familia, gracias por poder contar con ustedes y por alegrarme o simplemente escucharme cuando lo necesite.

Agradecer y dedicar esta tesis a mí bebe Angie y a mi esposa Lilibet, las amo! Gracias a toda nuestra familia, agradezco su apoyo y amor incondicional en estos años difíciles para nosotros.

GRACIAS A TODOS!!!

Gracias a Dios por haberme dado salud, esta oportunidad y la posibilidad de conocer a tantos amigos

Barcelona, 2011

Sumario

Publicaciones y Presentaciones	ii
Resumen	iv
Abstract	vi
Agradecimientos	viii
Sumario.....	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Tablas.....	xvi
Nomenclaturas.....	xvii
Abreviaturas	xix
Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Objetivos.....	3
1.3 Propuesta general de la tesis.....	5
Capítulo 2: Estado del arte. Visión numérica de estudios en andamios para ingeniería de tejidos	6
2.1 Introducción.....	6
2.2 Anatomía y fisiología de algunas estructuras biológicas.....	8
2.3 Propiedades de los andamios	13
2.4 Métodos computacionales aplicados en la caracterización morfológica de los andamios	16
2.5 Evaluación computacional de las propiedades mecánicas de los andamios	19
2.6 Descripción computacional de la degradación de andamios y de regeneración de tejidos	20
2.7 Método de homogenización para diseños de andamios	22
2.8 Modelos de flujo de fluido en andamios porosos.....	24
2.9 Simulación de los conceptos de mecano-regulación	25
2.10 Conclusiones y perspectivas de esta tesis	30
Capítulo 3: Bioreactor de perfusión para la generación de recubrimientos de cartílago articular	32
3.1 Introducción.....	32
3.2 Materiales y Métodos	35
3.3 Resultados	40

3.4 Discusión.....	45
3.5 Conclusiones.....	49
Capítulo 4: Influencia de la morfología de los andamios y optimización de las condiciones de cultivo en ingeniería de tejido	50
4.1 Introducción.....	50
4.2. Materiales y Métodos	54
4.3 Resultados	60
4.4 Discusión.....	69
4.5 Conclusiones.....	72
Capítulo 5: Sistema modelo para el control del sembrado celular por perfusión	73
5.1 Introducción.....	73
5.2 Materiales y métodos.....	75
5.3 Resultados	78
5.4 Discusión.....	85
5.4 Conclusiones.....	88
Capítulo 6: Simulación del sembrado celular en andamios porosos mediante el movimiento de partículas	90
6.1. Introducción.....	90
6.2. Materiales y Métodos	92
6.3. Resultados	98
6.4. Discusión.....	107
6.5 Conclusión	109
Capítulo 7: Conclusiones y perspectivas futuras	111
7.1 Resumen de los principales resultados.....	111
7.2 Limitaciones de los estudios	113
7.3 Contribuciones.....	114
7.4 Perspectivas Futuras	115
Referencias	118
Anexos	131
A: Ecuaciones descriptivas de un Sólido Linear Elástico	131
B: Ecuaciones descriptivas de un fluido Newtoniano	133
C: Ecuaciones descriptivas del movimiento de partículas	135
D: Subrutina para el control de las condiciones de flujo	138

Lista de Figuras

Fig 1.1. Aplicación de andamios en ingeniería de tejido óseo.....	3
Fig 1.2. Diferentes niveles	5
Fig 2.1. Procesos en ingeniería de tejidos.....	8
Fig 2.2. Principales zonas anatómicas de un hueso largo.....	9
Fig 2.3. Cartílago articular.	11
Fig 2.4. Representación esquemática del tejido fibroso.	11
Fig 2.5. Diferenciación de las células mesenquimales (MSCs).	13
Fig 2.6. Esquema de una célula adherida.....	16
Fig 2.7. Caracterización computacional de andamios	18
Fig 2.8. Ejemplo de la aplicación de FEM en la determinación de las propiedades mecánicas de los andamios.....	20
Fig 2.9. Simulación computacional de la regeneración del hueso en la ingeniería de tejidos	21
Fig 2.10. Módulo de Young y permeabilidad versus porosidad en dos diseños de unidades básicas.....	22
Fig 2.11. Topologías de arquitecturas	23
Fig 2.12. Perfiles de velocidades.....	25
Fig 2.11. Modelo de mecano-regulación.	26
Fig 2.12. Ejemplo de aplicación del algoritmo de diferenciación en un andamio de PLA-G5	27
Fig 2.13. Diferenciación de tejido estudiada bajo dos condiciones de flujo de fluido en andamios de fosfatos de calcio.	28
Fig 2.14. (a) Lattice (b)Seis localizaciones potenciales de una célula para migrar y proliferar	29
Fig 2.15. Distribución de células en un andamio simplificado usando el método de lattice	29
Fig 2.16. Estímulo de mecano-regulación y fenómeno angiogénico .	30
Fig 3.1. Algunos sistemas de bioreactores utilizados en biotecnología	33
Fig 3.2. Hyaff 11	35
Fig 3.3. Diseño de Bioreactores	37
Fig 3.4. Andamios PLA-G5 utilizados para la verificación.....	39

Fig 3.5. Cámara del bioreactor de perfusión fabricado.	39
Fig 3.6. El sistema del bioreactor	40
Fig 3.7. Simulación de CFD para andamio de PLA_G5	41
Fig 3.8. Presiones y velocidades en la altura del andamio	41
Fig 3.9. Flujo de fluido para ambos bioreactores bajo las condiciones de sembrado celular (Q=30mL/min).	43
Fig 3.10. Distribución del flujo de fluido para ambos bioreactores bajo las condiciones de cultivo (Q=12mL/min).	43
Fig 3.11. Distribución de velocidades en los todos los nodos del andamio durante la <i>fase de sembrado</i>	44
Fig 3.12. Distribución de velocidades en los todos los nodos del andamio durante la <i>fase de cultivo</i>	45
Fig 3.13. Dos secciones de mallas teñidas con MTT después del sembrado celular.	47
Fig 3.14. Vistas macroscópicas del cartílago articular	48
Fig 4.1. Ejemplo de simulación en andamios	52
Fig 4.2. Disponibilidad de fabricación de los diseños estudiados.....	54
Fig 4.3 Prisma hexagonal.....	54
Fig 4.4 Giroide	56
Fig 4.5. Malla de los elementos representativos de volumen (ERV) de cada una de las morfologías analizadas.	57
Fig 4.6. Condiciones de contornos para la simulación a) Carga axial (compresión) b) Flujo de fluido.....	58
Fig 4.7. Esquema de análisis de los estímulos mecánicos en cada arquitectura.	60
Fig 4.8. Distribución de las deformaciones principales en las paredes superficiales de los andamios para 0.5%.	61
Fig 4.9. Vectores de velocidad en planos cortantes característicos para cada estructura	62
Fig 4.10. Parámetros fluido-dinámicos (1mm/s) en los andamios giroide con gradientes de distribución de poros.	63
Fig 4.11. Influencia de la magnitud de la <i>velocidad del fluido</i> en el total del área superficial	64

Fig 4.12. Influencia de la magnitud de <i>la deformación axial</i> en el total del área superficial	65
Fig 4.13. Estímulo bajo perfusión para 0.1mm/s	66
Fig 4.14. Área de diferenciación osteogénica de acuerdo con la variación de las condiciones en la fase fluida y sólida.	67
Fig 4.15. Áreas de diferenciación condrogénica de acuerdo con la variación de las condiciones en las fases fluido y sólido.	68
Fig 5.1. Porosidad local como función de la distancia desde el eje central del andamio	75
Fig 5.2. Volumen de fluido analizado en el sistema de perfusión oscilante. Las condiciones máximas de velocidad 1mm/s son simuladas.	77
Fig 5.3. Andamios Tipo I (Izquierda) y Tipo G (Derecha). Fases computacionales de creación de los modelos	79
Fig 5.4. a) Distribución de las velocidades de fluidos. b) Distribución de la tensión cortante del fluido.....	81
Fig 5.5. a) Imagen de microscopía confocal de un andamio Tipo I después del sembrado. b) Imagen similar de sección cortante en los modelos de CFD muestra las razones cortantes del fluido.....	82
Fig 5.6. a) Distribución de las células mediante imágenes confocal b) Imágenes confocal tratadas en pixeles blancos y negros c) Distribución de la razón de cortante en las paredes de los andamios.	84
Fig 5.7. Cuantificación de las distribuciones de las tensiones cortantes y de las velocidades de fluido, comparadas con las densidades de células distribuidas en las superficies del andamio.	85
Fig 5.8. Tendencias de la deposición de células en relación con los estímulos fluidos (Tensión cortante, Velocidad de fluido).....	86
Fig 6.1. Las superficies reconstruidas desde las imágenes de μ CT de los andamios.	93
Fig 6.2. Representación esquemática de las fuerzas que están actuando en la partícula y que guían su movimiento.	94
Fig 6.3. Esquema de las condiciones dinámicas	96
Fig 6.4. a) Posibles comportamientos de adhesión que estan asociados a la condición de Wall Film.....	97

Fig 6.5. Distribuciones de las partículas en el medio de cultivo en dos diferentes tiempos de las oscilaciones 15min y 1 hora para el andamio tipo I.....	99
Fig 6.6. Distribuciones de las partículas en el medio de cultivo en dos diferentes tiempos de las oscilaciones 15min y 1 hora para el andamio tipo G.....	100
Fig 6.7. Vista superior de la posición de todas las células adheridas en los andamios	101
Fig 6.8. Eficiencia del sembrado celular bajo perfusión para 2h	102
Fig 6.9. Número de células adhiriéndose en cada paso de tiempo para ambos andamios.	103
Fig 6.10. Concentración de células en el medio de cultivo.	104
Fig 6.11. Distribuciones de células comparadas entre los experimentos (izquierda) y los modelos de partículas (derecha).....	105
Fig 6.12. Distribución de las células en 2 h (Simulación) comparada con la distribución de las células (Experimental) después de 16h (Tipo I)	106
Fig 6.13. Distribución de las células en 2 h (Simulación) comparada con la distribución de las células (Experimental) después de 16h (Tipo G).....	106
Fig 6.14. Distribución de las células en la altura de los andamios (a) Tipo I y b) Tipo G.	107
A1. Representación de las tensiones sobre un cubo elemental	131
A2. Representación de las tensiones octaédricas	132

Lista de Tablas

Tabla 2.1 Propiedades mecánicas de tejidos humanos.	12
Tabla 2.2 Propiedades de polímeros biodegradables	14
Tabla 2.3 Tamaños de poros y porosidades relacionados con la generación de hueso.	15
Tabla 2.4 Propiedades mecánicas de algunos andamios dependiendo de la porosidad.	16
Tabla 3.1 Dimensiones de andamios utilizados en bioreactores de perfusión	34
Tabla 3.2 Ecuaciones y esquemas de los principios físicos utilizados para hallar la ecuación de la viscosidad aparente η_s	38
Tabla 4.1 Algunos rangos de tensiones cortantes del fluido reportadas en la literatura	52
Tabla 4.2 Número de elementos tetraédricos de la malla. Porosidad y superficie específica	56
Tabla 4.3 Propiedades calculadas para las estructuras de los andamios. (Para $v=1\text{mm/s}$; $\varepsilon=0.5\%$).....	61

Nomenclaturas

E_f	módulo de Young efectivo
R	fuerza de reacción
Δl	longitud desplazada
l	longitud inicial
ε	deformación
A	área total de la sección transversal
E_{s0}	módulo inicial del andamio
E_s	módulo del andamio variable en el tiempo
W_0	peso molecular inicial
W	peso molecular variable en el tiempo
t	tiempo
σ_c, σ_d	tensiones resultantes en los puntos x_c, x_c
S_s	Superficie del andamio
l_L	longitud crítica
$U(t)$	energía de deformación en el sistema andamio hueso
E^{MACRO}	módulo del andamio a nivel macroscópico
E^{MICRO}	módulo del andamio a nivel microscópico
M	tensor de deformaciones
V	volumen de la unidad básica del andamio
K	permeabilidad
u	velocidad del fluido
∇p	gradiente de presión
η	viscosidad del fluido
S	estímulos
a y b	constantes empíricas utilizadas en el modelo de mecano-regulación
γ	deformación octaédrica
η_s	viscosidad aparente para el andamio
F_D	fuerza de arrastre
F_C	fuerza centrífuga
F_g	fuerza de gravedad
Φ	porosidad
k	permeabilidad intrínseca
K	permeabilidad de Darcy o conductividad hidráulica
ρ	densidad

d	diámetro
Q_D	flujo de fluido a través del medio poroso
Q_P	flujo de fluido a través de un tubo
v	velocidad del fluido en la entrada, condición de contorno
τ	tensiones cortantes en las paredes del andamio
SS	deformación cortante octaédrica, algoritmo de mecano-regulación modificado
FSS	tensión cortante del fluido, algoritmo de mecano-regulación modificado
r	radio de la sección transversal de los andamios cilíndricos
V_T	volumen total de fluido
γ_c	tensión superficial de la célula
ρ_c	densidad de la célula
η_c	viscosidad de la célula
u_c	velocidad de la célula
F_L	fuerza de suspensión
C_D	coeficiente de arrastre
C	concentración de células
m_f	flujo de masa de fluido
e	eficiencia del sembrado
N_a	número de células adheridas
N_c	número de células suspendidas

Abreviaturas

UPC	Universidad Politécnica de Cataluña
IBEC	Instituto de Bioingeniería de Cataluña
CT	Computer Tomography
STEPS	A Systems Approach to Tissue Engineering Processes and Products” (FP6-5004465)
CAD	Computer Aided Design
3D	Tridimensional
2D	Bidimensional
ECM	Extracellular Matrix
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
HAC	Human Articular Chondrocytes
BMSCs	Bone Mesenchymal Stem Cells
FDA	Food and Drug Administration
MR	Magnetic Resonance
CFD	Computational Fluid Dynamic
FEM	Finite Element Method
RP	Rapid Prototyping
SEM	Scanning Electron Microscopy
ERV	Elemento Representativo de Volumen
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
SLA	Stereolithography
PIV	Particle Imaging Velocimetry

Capítulo 1: Introducción

1.1 Antecedentes

Las funciones y condiciones a que se somete el sistema músculo esquelético son de una alta complejidad. Muchas son las enfermedades y patologías que están vinculadas a este sistema biológico. Los casos más conocidos son los relacionados con la osteoporosis y con las lesiones o dolores en la espalda. Aproximadamente un total de 100 millones de europeos sufren de dolores músculo-esqueléticos y en los E.U.A. estos problemas afectan a alrededor de 40 millones de personas mayores de 45 años [1]. Aunque la mortalidad relacionada con este tipo de dolencias y defectos, no es elevada, el mayor efecto está en las limitaciones que les producen a estas personas para realizar alguna actividad física. Para tratar o rehabilitar estos problemas existen numerosos protocolos y terapias que representan un alto coste médico y que finalmente no garantiza una total recuperación de la zona afectada.

Biológicamente también existen degradaciones y lesiones que pueden provocar la pérdida de funciones y propiedades de los órganos y tejidos. Esto sumado a las posibles lesiones por accidentes hace inevitable la necesidad de buscar soluciones para enfrentar estos problemas. Una de las soluciones son *trasplantes*, los cuales requieren de condiciones especiales para su aplicación. Los trasplantes necesitan tener una fuente desde donde se pueda extraer el tejido u órgano demandado. De aquí que las mayores limitaciones de estos trasplantes o injertos las encontremos en los altos índices de rechazos y en la insuficiente fuente para las extracciones (donantes). Existen diferentes variantes de injertos: el uso de tejido animal (xenoinjertos), tejido del propio paciente (autoinjertos) o cuando se necesita una tercera persona como donante (aloinjertos). También existe la posibilidad de sustituir las zonas afectadas por medio de implantes artificiales (prótesis). Entre algunos de los implantes más conocidos se pueden mencionar los de arterias, articulaciones (cadera, rodilla), corazones, etc. La durabilidad (incrementando las intervenciones quirúrgicas) y el riesgo de rechazo suelen ser algunos de los mayores problemas de los implantes además no ser aplicables a todos los problemas existentes en tejidos y órganos.

A pesar de que todos estos intentos siguen teniendo el más alto porcentaje de aplicación hoy en día, el futuro en este campo ha sido marcado en las dos últimas décadas por el desarrollo de *la ingeniería de tejidos*. La ingeniería de tejidos es conocida como un campo multidisciplinario que aplica principios de biología e ingeniería en el desarrollo de sustitutos capaces de restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos y órganos [2]. Uno de los principios básicos dentro de este contexto lo constituye la aplicación de biomateriales porosos (andamios) que cumplan con ser biodegradables, bioactivos y que sean capaces por sus propiedades de sustituir el tejido en la zona afectada e imitar así su estructura hasta que el nuevo

tejido sea generado. En la figura 1.1, se muestra un esquema general de la aplicación de andamios en la ingeniería de tejido óseo. El proceso se inicia con la localización del defecto (óseo) en el paciente mediante el uso de técnicas de imágenes (1,2) y a partir de los datos del defecto se diseña y fabrica un andamio que sea capaz de sustituir la zona afectada (3,4). Posteriormente de manera in vitro se siembran las células y se cultivan estas en los andamios hasta que finalmente son implantadas (5-7) y de esta manera se espera que ocurra la remodelación del hueso, la degradación del andamio y la adaptación tejido in vivo (8).

El principio descrito anteriormente es aplicable salvo algunas diferencias, para todo tipo de tejidos y órganos. Las mayores dificultades están en el control de los fenómenos biológicos a lo largo de todo el proceso de generación del tejido. En este punto los andamios y su morfología son una de las fuentes principales de variaciones de respuestas biológicas. Estas estructuras además de servir como soporte para que las células se desarrollen y formen un tejido, deben combinar las propiedades mecánicas con los tiempos de formación de tejido y de degradación del material, la magnitud de la estimulación a las células y otros factores fisico-químicos. Las células estarán en contacto directo con el biomaterial del andamio y dependiendo de las condiciones a la que estas se encuentren será su respuesta biológica. Estas condiciones o estímulos puede que estén directamente vinculados a la estructura porosa del andamio.

A raíz de los conocimientos que se tienen de ingeniería se puede afirmar que los diseños y los materiales son seleccionados en su conjunto para asumir ciertos regímenes de trabajos. También son conocidas las excelentes adaptaciones de los materiales biológicos acorde a las funciones específicas que estos desempeñan. La unión de estas premisas nos llevan a pensar que dentro de la ingeniería de tejidos, un control del micro diseño para los poros de los andamios puede llegar a ser un factor determinante en el desarrollo de los tejidos. Se sospecha que se podrían controlar los estímulos mecánicos y dirigir así las respuestas celulares. Con la aparición de nuevos métodos de fabricación (prototipado rápido) es posible obtener estructuras regulares que garanticen cierta repetitividad en la microestructura del andamio y posibiliten la verificación procesos.

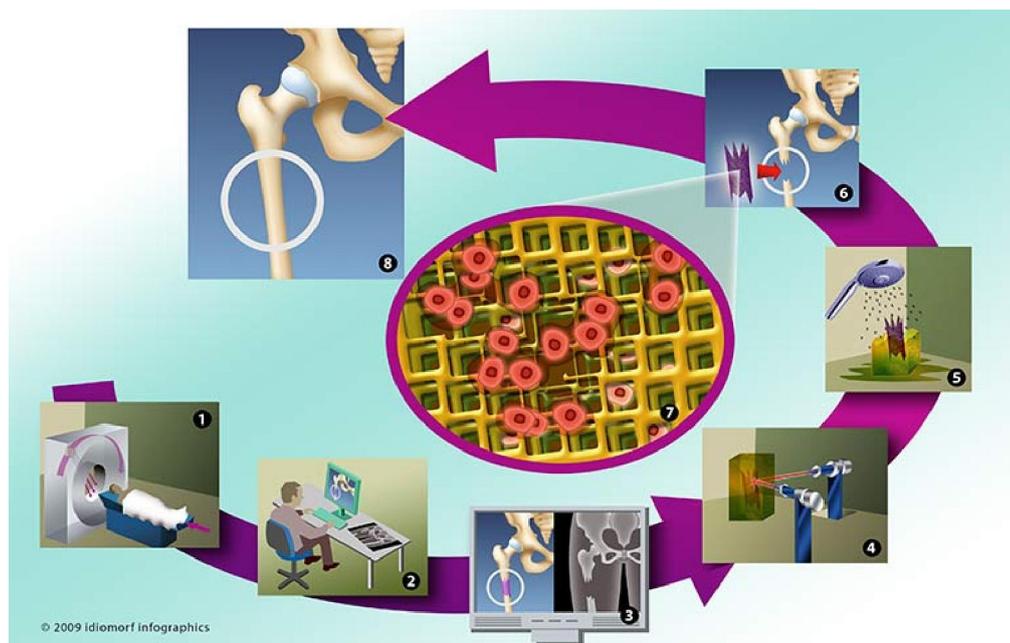


Fig 1.1. Aplicación de andamios en ingeniería de tejido óseo. Localización del defecto (óseo) en el paciente (1,2) diseño y fabricación del andamio para sustituir la zona afectada (3,4); Sembrado de las células y cultivo en los andamios a ser implantados (5-7) y finalmente remodelación y adaptación del tejido in vivo (8) [3].

1.2 Objetivos

En la sección anterior se ha descrito la necesidad del desarrollo de la ingeniería de tejidos y de la premura en entender cuáles son los preceptos que rigen las modificaciones que ocurren en las células y tejidos bajo condiciones *in vitro*.

Los **objetivos generales** de esta tesis son:

1. *Proponer metodologías de predicción para procesos que tienen lugar en la ingeniería de tejidos.*
2. *Evaluar la influencia de las morfologías de los andamios y las condiciones físicas en los estímulos mecánicos asociados con posibles comportamientos de las células in vitro.*

La hipótesis que se plantea es que mediante el control de los diseños se podrían obtener respuestas a algunos de los comportamientos celulares bajo condiciones *in vitro*. Los estudios fueron centrados en el uso de bioreactores de perfusión como sistemas para controlar el ambiente experimental y en los diseños de los poros de los andamios que actuaron como controladores del ambiente que sienten las células. En el transcurso de la tesis se proponen metodologías para predecir diferentes procesos y propiedades a través de herramientas numéricas, pero intentando que estos resultados se mantengan vinculados a los posibles resultados experimentales. La estructura seguida en el documento permite establecer para cada capítulo objetivos específicos que serán descritos a continuación.

En el **capítulo 2 “Estado del Arte”** se explican algunos de los conceptos biológicos necesarios para la comprensión de esta tesis; el objetivo del capítulo fue *“resumir a través de ejemplos el estado del arte de los diferentes métodos numéricos que se han utilizado en la descripción de fenómenos que tienen lugar en andamios para la ingeniería de tejidos”*. Este capítulo sienta las bases a los aportes vinculados a esta tesis, describiendo la necesidad de realizar los estudios que se presentan a continuación.

La descripción de los resultados comienzan en el **capítulo 3: “Bioreactor de perfusión para la generación de cartílagos para un recubrimiento total articular”**. El objetivo en este capítulo es *“Ayudar mediante métodos numéricos en la selección de un diseño de un bioreactor de perfusión a tamaño industrial para lograr la generación de un recubrimiento de cartílago articular total para una rodilla”*. En este capítulo se aplica dinámica de fluido computacional en el estudio de los diseños de bioreactores de perfusión. Una novedad de esta metodología es que el material poroso del andamio es simulado como un fluido viscoso. Los resultados experimentales corroboran que efectivamente el bioreactor seleccionado puede ser utilizado para el desarrollo de un recubrimiento de cartílago articular.

En el **capítulo 4 “Influencia de la morfología de los andamios y optimización de las condiciones de cultivo en la ingeniería de tejido”** el objetivo es *“Evaluar computacionalmente la influencia de diferentes diseños de estructuras de andamios en cuanto a propiedades mecánicas y propiedades de transporte de masa en la posible diferenciación de células mesenquimales”*. El estudio se extiende a una posible diferenciación que pueden sufrir las células según un modelo de mecáno-regulación y se muestra además la sensibilidad que presenta este modelo para varias condiciones de cultivo.

El **capítulo 5 “Sistema modelo para el control del sembrado celular por perfusión”**, persigue como objetivo *“Estudiar la relación entre estímulos mecánicos y sembrado celular en andamios reales reconstruidos desde imágenes de microCT”*. Se propone un sistema que de manera global permita controlar las densidades de células sembradas. Los perfiles de fluido fueron determinados para dos distribuciones de tamaños de poros y se cuantificó el máximo estímulo mecánico en las paredes de los andamios. Los resultados fueron verificados mediante ensayos de sembrado bajo perfusión resultando en la existencia de una estrecha relación entre estímulo mecánico, tamaño de poro fabricado y distribución de células después de un sembrado, conformando así un “sistema modelo” para el sembrado celular.

En el **capítulo 6: “Simulación del sembrado de células a través de un modelo de partículas”**, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el “sistema modelo” del capítulo 5, el objetivo es *“Desarrollar una nueva metodología que permite simular el proceso del sembrado celular”*. El modelo numérico desarrollado puede permitir controlar la cinemática de las células bajo condiciones de perfusión oscilante y optimizar el tiempo de sembrado.

En el **capítulo 7: “Conclusiones y Perspectivas futuras”** se realiza un resumen de los principales resultados de la tesis así como los aportes científicos, teóricos y prácticos de la misma. Además se proponen algunas ideas de cara al futuro para la continuación y profundización de algunas de las teorías que se proponen en esta tesis.

1.3 Propuesta general de la tesis

La tesis se desarrolla en el marco del proyecto STEPS “A Systems Approach to Tissue Engineering Processes and Products” (FP6-5004465) financiado por la Comisión Europea. De manera que los resultados obtenidos mediante simulaciones numéricas y que son desarrollados y presentados en esta tesis están estrechamente integrados con el soporte experimental proporcionado por otras instituciones asociadas a este proyecto. Las universidades que han tomado parte en algunos de los estudios son la Universidad Hospital de Basel, Suiza, encargada de los ensayos in vitro y la Universidad de Twente, Holanda, encargada de desarrollar los andamios mediante estereolitografía. También hubo colaboraciones dentro del proyecto con empresas como Fidia Advance Biopolymer (empresa farmacéutica) y Applikon Biotechnology (empresa fabricante y suministradora de equipos para bioprocesos).

Múltiples simulaciones fueron realizadas en el marco de este proyecto para predecir los comportamientos mencionados en el tópico anterior. Se analizaron modelos tridimensionales de bioreactores y de andamios, estos últimos tanto desde la fase de diseño asistido por computador (CAD) como desde una fase de verificación de diseño donde se reconstruyeron los andamios desde imágenes de micro tomografía computarizada CT. Se aplicaron formulaciones lineal elásticas (andamio sólido) y de fluido newtoniano (cavidades porosas), como parte de la simplificación y caracterización de los diseños iniciales. Finalmente se ha desarrollado una nueva metodología para predecir el sembrado celular bajo condiciones transitorias y a través de la discretización de las células y con uso de criterios de teorías de multifases. A modo representativo se muestra en la figura 1.2, los diferentes niveles estudiados y para los cuales se han abordado diferentes fenómenos dentro del área de ingeniería de tejido.

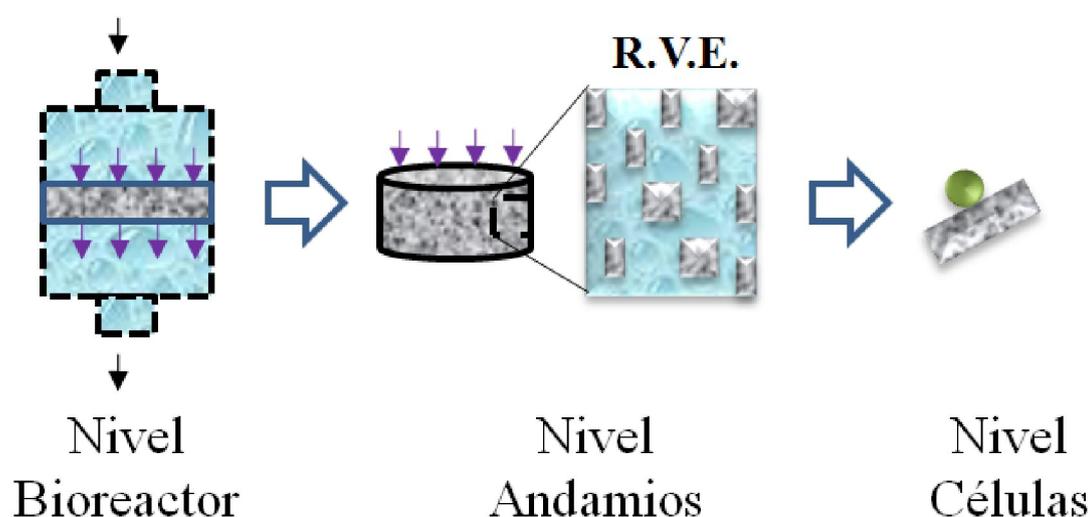


Fig 1.2 Diferentes niveles que se estudian numéricamente en la tesis para describir y controlar los fenómenos que tienen lugar en la ingeniería de tejidos. En esta tesis se utilizaron específicamente: bioreactores (perfusión), andamios (regulares), Células (mesenquimales, condrocitos).

Capítulo 2: Estado del arte. Visión numérica de estudios en andamios para ingeniería de tejidos

Resumen: La ingeniería de tejidos utiliza andamios porosos para sustituir los defectos biológicos. Estos andamios deben satisfacer funciones como soportar cargas mecánicas, garantizar el transporte de masa a través de sus canales y ser biocompatible y biodegradables. Experimentalmente no están completamente comprendidos los procesos celulares producto de los estímulos mecánicos, de aquí que los métodos numéricos constituyan una herramienta de ayuda. En este capítulo se resumen algunos de los principales resultados obtenidos por medio de análisis numéricos aplicados a andamios para la ingeniería de tejidos. Durante la búsqueda bibliográfica quedó evidenciada la necesidad de optimizar los diseños de los poros de los andamios, optimizar las condiciones de cultivo y es fundamental el control de las respuestas celulares en condiciones in vitro para realiza avances objetivos en el área de la ingeniería de tejidos.

2.1 Introducción

La ingeniería de tejidos es considerada como “un campo interdisciplinario que combina los conocimientos y tecnologías de células e ingeniería de materiales con apropiados factores químicos para la creación de órganos o la regeneración de tejidos dañados”[2]. Más recientemente, Williams D. F. definió la ingeniería de tejidos también como “la creación (o formación) de un nuevo tejido para reconstrucciones terapéuticas del cuerpo humano a través de la liberación y estimulación controlada de las células que son seleccionadas específicamente mediante una combinación sistémica de señales mecánicas y moleculares” [4]. En esta última definición del campo se muestra como el desarrollo en el mismo ha conllevado a plantear como sumamente relevante los efectos de los estímulos mecánicos y moleculares en las reconstrucciones. Estos procesos de creación del tejido biológico necesitan generalmente un substrato artificial que guie al tejido y que controle las respuestas de las células a partir de la aplicación de estímulos específicos. “Andamios” es la denominación que se les brinda a estos soportes artificiales temporales. Aunque los estudios de biomateriales se realizan generalmente en sustratos en dos dimensiones, para la evaluación de la interacción célula-biomaterial se necesita una forma tridimensional (3D) para poder sustituir los defectos o simplemente porque es necesario para imitar el volumen de órganos o tejidos.

En la pasada década, los estudios y financiaciones relacionadas a la investigación en el campo de la ingeniería de tejidos y de los andamios se han incrementado substancialmente[5]. La potencialidad de los

Este capítulo se ha publicado en parte en: *Computational Methods in the Modeling of Scaffolds for Tissue Engineering*. **Andy L. Olivares** and Damien Lacroix. Book "Computational Modeling in Tissue Engineering" published by Springer-Verlag. Editor in Chief Prof. Amit Gefen of Series entitle "Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials". *En revisión*.

avances en la ingeniería de tejidos está directamente relacionada con el posible incremento de la calidad de vida. Esto es interpretado como la posibilidad de fabricar o generar partes del cuerpo humano disminuyendo los riesgos de rechazo y eliminando sobre todo la necesidad de donantes.

Trasladar los resultados científicos hacia aplicaciones clínicas constituye hoy día una de las barreras principales en el campo. Fundamentalmente el problema radica en la alta complejidad de los procesos y fenómenos que tienen lugar bajo las condiciones *in vitro* o *in vivo* y que hasta el momento no son totalmente entendidos. Hay que tener en cuenta que los estudios experimentales en donde se utilizan células humanas encarecen los estudios y es conocido que tanto el tipo de células, la fuente de obtención, así como el modo y medio de crecimiento influyen directamente en los resultados de creación de tejidos.

Un andamio ideal debe satisfacer características específicas como: interconexión de los poros, canales abiertos con capacidad para proveer de oxígeno y nutrientes a las células en el interior de los andamios y que permita que los productos de desechos sean expulsados fácilmente [6]. Además estos andamios deben ser fabricados con materiales biocompatibles, biodegradables y con apropiadas características mecánicas [6]. En la figura 2.1, se resumen las propiedades a controlar en los andamios y algunos de los fenómenos que tienen lugar bajo condiciones *in vitro* u *in vivo* [7]. De este modo, se plantea que el biomaterial a través de la estructura del andamio podría controlar la afinidad y el desarrollo de las células. Durante el cultivo es deseable conocer las fuerzas que perciben las células debido a que es de interés conocer o entender bajo cuales condiciones o estímulos ocurren las diferentes fases celulares que se observan: migración, proliferación o diferenciación. Las complejidades de todos estos fenómenos se incrementan cuando se incluyen procesos de degradación de material, formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), la formación e integración del nuevo tejido.

La dificultad que representa la cuantificación y determinación de parámetros (biológicos, físicos o químicos) a nivel experimental ha llevado al uso de métodos computacionales como herramientas que ayuden a la comprensión y caracterización de lo que sucede en el interior de los andamios. Basados en el hecho de que los andamios son materiales porosos, presentarán durante el cultivo una fase fluida (poros) y otra sólida (biomaterial). Un análisis idealizado de un andamio puede ser realizado a través de una formulación poroelástica (teoría muy utilizada para estudiar el comportamiento de los tejidos), donde las fases sólidas y fluidas están saturadas en un volumen. Una limitación de esta teoría radica en que la influencia que puede tener la morfología de los microporos de los andamios no se tiene en cuenta. La mayoría de los resultados que se muestran en este capítulo y a los cuales se hace referencia en la tesis son basados en que existen dos fases bien delimitadas por la geometría del andamio, además de plantearse los métodos de cómo se pueden caracterizar estas morfologías mediante métodos computacionales.



Fig 2.1. Procesos en ingeniería de tejidos usando andamios (modificado de Liu et al.[7])

2.2 Anatomía y fisiología de algunas estructuras biológicas

2.2.1 Hueso

El esqueleto humano está formado por 206 huesos. El esqueleto tiene como funciones proteger los órganos vitales, permitir la locomoción, además de biológicamente funcionar como depósito de minerales (regulando el metabolismo) también interviene en la producción y almacenaje de células sanguíneas (hematopoyesis)[8]. Cada hueso consta de tejido óseo compacto (hueso cortical) y tejido óseo esponjoso (hueso trabecular), ver figura 2.2. Mientras el hueso compacto o cortical forma la superficie externa de todos los huesos y principalmente en la diáfisis de los huesos largos; el hueso esponjoso o trabecular se localiza en los extremos del hueso (epífisis y metáfisis) y en el interior de los huesos cortos y planos, respectivamente. Cubierto por el periostio se encuentran los túneles y canales a través de los cuales pasan los vasos sanguíneos y linfáticos que nutren el hueso. Sobre la zona de unión y articulación del esqueleto se encuentra el cartílago articular, el cual protege al hueso del desgaste que se produce durante la locomoción[9]. El hueso trabecular está constituido por todo un entramado de material óseo, con estructuras en forma de celdas tridimensionales, que se llaman trabéculas. Las trabéculas interconectadas dan lugar a un aspecto esponjoso o espumado. El hueso trabecular o esponjoso posee una gran área superficial (Ej: la pelvis humana: hueso trabecular, 1600 cm², mientras que su superficie perióstica ,80 cm²).

El mecanismo básico de formación del tejido óseo se denomina osteogénesis u osificación. En términos mecánicos el hueso es un material compuesto con diferentes fases: sales inorgánicas (60-70%) y varias sustancias orgánicas (30-35%). La dureza del hueso viene dada porque en su composición está impregnado de una fase mineral, cristales de hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ (95% de la fase inorgánica) con un cierto contenido de carbonato.

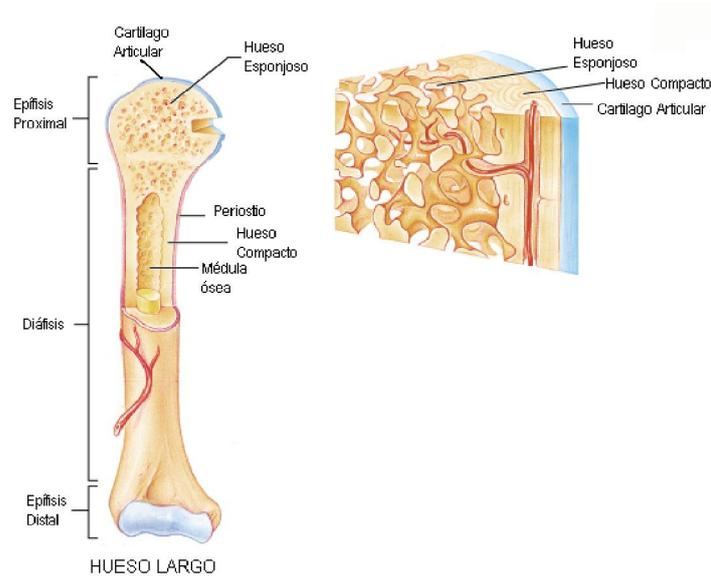


Fig. 2.2. Principales zonas anatómicas de un hueso largo [10].

La ley de Wolff plantea explícitamente que “cada cambio en la forma y la función del hueso o simplemente la función siguen ciertos cambios definidos en la arquitectura interna (trabeculas) e igualmente son definidas alteraciones secundarias en la conformación externa y estos cambios están relacionados con leyes matemáticas” (*Julius Wolf 1892*) [11]. Aunque la justificación de la existencia de la ley de Wolff ha sido cuestionada en muchos aspectos [12], [13], son también muchos los investigadores que defienden la idea de que la remodelación ósea ocurre en respuesta a las cargas mecánicas [14-18]. Está comprobado que la morfología ósea presenta un compromiso peculiar entre los criterios estructurales y metabólicos. Además clínicamente se ha demostrado que la masa ósea aumenta a medida que se intensifica la actividad física, y disminuye si el estímulo funcional es más débil (Ej. estancias prolongadas en la cama o en condiciones de micro gravedad reducen la masa ósea).

En materiales como el hueso en los que no se produce una desviación abrupta respecto de la región lineal inicial, el límite elástico se define como la intersección entre la curva tensión-deformación y una línea recta paralela al tramo elástico a un 0.2% de la deformación. Para los niveles de tensiones y deformaciones a las que trabaja normalmente el hueso, se puede establecer que las velocidades de deformación fisiológicas son 0.001s^{-1} para la marcha normal y aproximadamente de 0.01 s^{-1} para una actividad vigorosa [9].

A nivel celular en el tejido óseo encontramos, los osteoblastos encargados de la formación del tejido y los minerales que dan resistencia al hueso; luego tenemos a los osteoclastos los cuales se destacan por ser células de gran tamaño y que se forma en la médula ósea, su función consiste en absorber y eliminar el tejido no deseado. Finalmente están los osteocitos que corresponden a la mayor cantidad de las células encontradas en el hueso, estas participan activamente en la remodelación ósea, además de participar en el intercambio de iones a través de su gran superficie de contacto [19]. Los osteocitos son además células mechano-sensorias y que desempeñan un papel fundamental en la adaptación funcional del hueso.

El origen de las células del tejido óseo puede ser a partir de las células madres que se puede diferenciar en osteoblasto o en osteoclasto. Pero existe otra teoría que afirma que los osteoblastos y los osteoclastos pueden representar diferentes líneas celulares. Los osteoclastos están íntimamente relacionados con el macrófago y el monocito sanguíneo y posee un progenitor común con ellos; mientras los osteoblastos tendrían una célula madre común a otras células productoras de colágeno (fibroblastos o condroblastos) y proceden de células mesenquimatosas fijas no migradas [9].

2.2.2 Cartilago Articular

El cartilago articular se presenta como una capa blanca y densa de tejido conjuntivo de entre 1-2 mm de espesor en el adulto, alcanzando un máximo de 5-7 mm en las articulaciones más grandes de individuos jóvenes. El cartilago articular puede dividirse en cuatro zonas: la superficial, la media o transicional, la zona profunda y la zona de cartilago calcificado (ver figura 2.3).

La zona superficial es la parte superior del cartilago y forma la superficie de deslizamiento. En su interior, las delgadas fibrillas de colágeno están orientadas de forma paralela a la superficie y los condrocitos (células cartilaginosas), están elongados paralelos a la superficie donde existe una escasa cantidad de proteoglicanos. La zona media o de transición, tiene fibras de colágeno de mayor diámetro y aparentemente una menor organización, además, los condrocitos tienen un aspecto más redondeado. La zona profunda se caracteriza por tener la mayor concentración de proteoglicanos y el menor contenido de agua, las fibras de colágeno tienen un diámetro grande y están organizadas de forma vertical a la superficie articular, los condrocitos en esta zona son totalmente esféricos y a menudo están dispuestos en forma de columnas. La capa más profunda es la zona de cartilago calcificado y separa el cartilago hialino del hueso subcondral. Se caracteriza por pequeñas células distribuidas en una matriz cartilaginosa densamente incrustada con sales de apatita.

El tejido articular es un tejido de baja densidad celular y sin inervación ni vasos sanguíneos ni linfáticos. Sus células, o condrocitos, se disponen en forma diferente a lo largo de la profundidad del cartilago. Los condrocitos derivan de la diferenciación de las células mesenquimatosas. Durante el crecimiento de estas células se generan una gran cantidad de sustancia extracelular y el tejido maduro ocupa menos del 10% del volumen tisular total.

Los condrocitos son los responsables del mantenimiento de esta matriz. Los condrocitos son metabólicamente activos y son capaces de responder a una diversidad de estímulos ambientales. La matriz extracelular está formada por un 10-30% de la parte sólida (fibras de colágeno, proteoglicanos, condrocitos) y por un 65-80% de fase acuosa. Las principales funciones del cartilago articular son: (a) evitar la existencia de cargas puntuales entre las superficies en contacto de la articulación (b) permitir el movimiento relativo de las superficies articulares con la mínima fricción y desgaste.

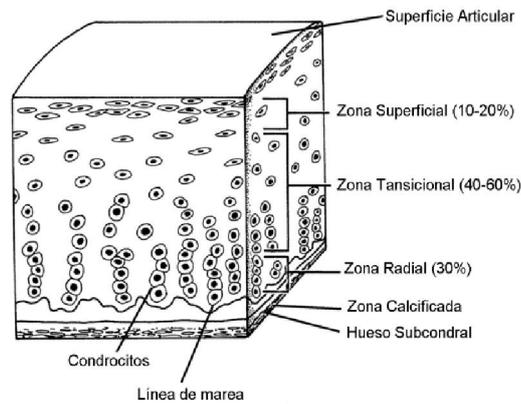


Fig 2.3. Cartílago articular. Se muestra la superficie articular, donde se realiza en contacto. Una parte interior dividida en tres zonas fundamentales (superficial, transicional y radial). Se muestra la zona del hueso subcondral y la zona de cartílago calcificado que se encuentra entre cartílago y hueso (Modificado de Newman[20])

2.2.3 Tejido Fibroso

Morfológicamente, el tendón es un material complejo formado por fibrillas de colágeno embebidas en una matriz de proteoglicanos y esta configuración está asociada a una escasez de células [21]. En el tendón, el tipo de célula predominante son los fibroblastos, estos se encuentran distribuidos en filas paralelas y alargadas en los espacios entre los haces de colágeno (figura 2.4). Los cuerpos celulares son fusiformes y están orientados en fibras, tal y como se puede observar en un corte longitudinal (figura. 2.4).

Las moléculas de colágeno se combinan para formar unidades de micro fibrillas. Por otra parte, los ligamentos son clasificados como tejido conjuntivo denso y son tanto macroscópica como microscópicamente similares a los tendones. Estos últimos están constituidos por bandas cortas de tejido conjuntivo fibroso, fuerte y flexible que conectan huesos o soportan a las vísceras. Los ligamentos poseen una vascularización muy escasa y son metabólicamente inactivos, por lo que su cicatrización es lenta; pero a diferencia del cartílago poseen una abundante inervación[9].

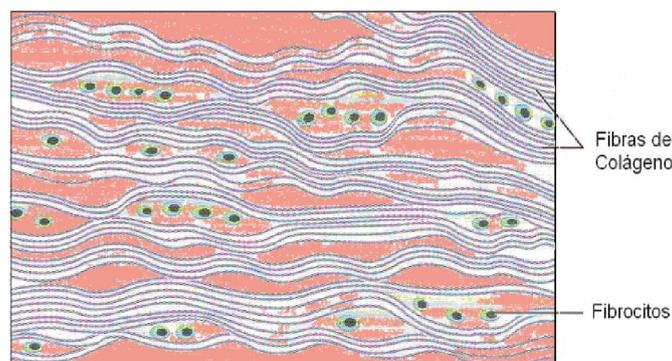


Fig 2.4. Representación esquemática del tejido fibroso. Se muestran de manera alargada las fibras de colágeno y los fibrocitos de manera redondeada, se muestra la escasez de células.

2.2.4 Propiedades mecánicas de los tejidos humanos

En la tabla 2.1 se resumen las principales propiedades mecánicas de los tres tipos de tejidos que se han tenido en cuenta para el desarrollo de esta tesis (hueso, cartílago y fibroso). Se destaca la elevada resistencia que poseen los tejidos fibrosos y el bajo módulo de Young, todo esto debido a las grandes deformaciones que estos pueden soportar a tracción. Luego tenemos que el hueso cortical presenta un módulo de Young elevado (3-30 GPa) en comparación con todos los otros tejidos, debido a una de funciones específicas, sostén. Esta tabla es soporte fundamental para realizar las comparaciones con los posibles sustitutos de las diferentes zonas del tejido.

Tabla 2.1 Propiedades mecánicas de tejidos humanos.

	Resistencia a Tracción (MPa)	Resistencia a Compresión (MPa)	Módulo de Young (MPa)
Hueso Trabecular[22] -	-	2-12	50-500
Hueso Cortical[22]	60-160	100-230	7,000-30,000
Cartílago[23]	3.7-10.5	-	0.7-15.3
Ligamento[24]	13-46	-	65-541
Tendón[24]	24-112	-	143-2,310

2.2.5 Diferenciación de MSCs

Los tres tipos de tejidos conectivos (hueso, cartílago articular, y tendones o ligamentos) según con el tipo de células a que está asociada la matriz extracelular (ECM), sean osteoblastos para hueso, condroblastos para cartílago, y fibroblastos para tendón, ligamento pueden tener un común precursor en las células embrionarias o mesenquimatosas (figura 2.5)[25, 26].

El tejido mesenquimal o mesénquima es el tejido conectivo embrionario que proviene del mesodermo y presenta una gran variedad de tipos celulares. A partir de este tejido y por diferenciación celular y regulación diferencial se originan patrones de desarrollo diferentes que provocan la aparición de tejidos más especializados.

Desde un punto de vista estricto se puede decir que las células que se encuentran en el mesénquima son las denominadas células mesenquimales, pero este término en algunas ocasiones se utiliza sin ningún rigor para también hacer referencia a las células madres mesenquimales (MSCs), que son un tipo de célula pluripotencial a partir de la cual pueden originarse los diferentes tipos de tejidos conectivos. Por lo tanto, mientras que las células del mesénquima no se diferencian en células hematopoyéticas, las MSCs al ser pluripotentes sí que pueden hacerlo. Esto implica que las MSCs son células mesenquimales, pero no todas las células mesenquimales son MSCs. No obstante, para el estudio presentado en esta tesis referente a la diferenciación celular solamente los tres linajes representados en el esquema de la figura 2.5 son utilizados y será indiferente si se utiliza MSCs o mesenquimales.

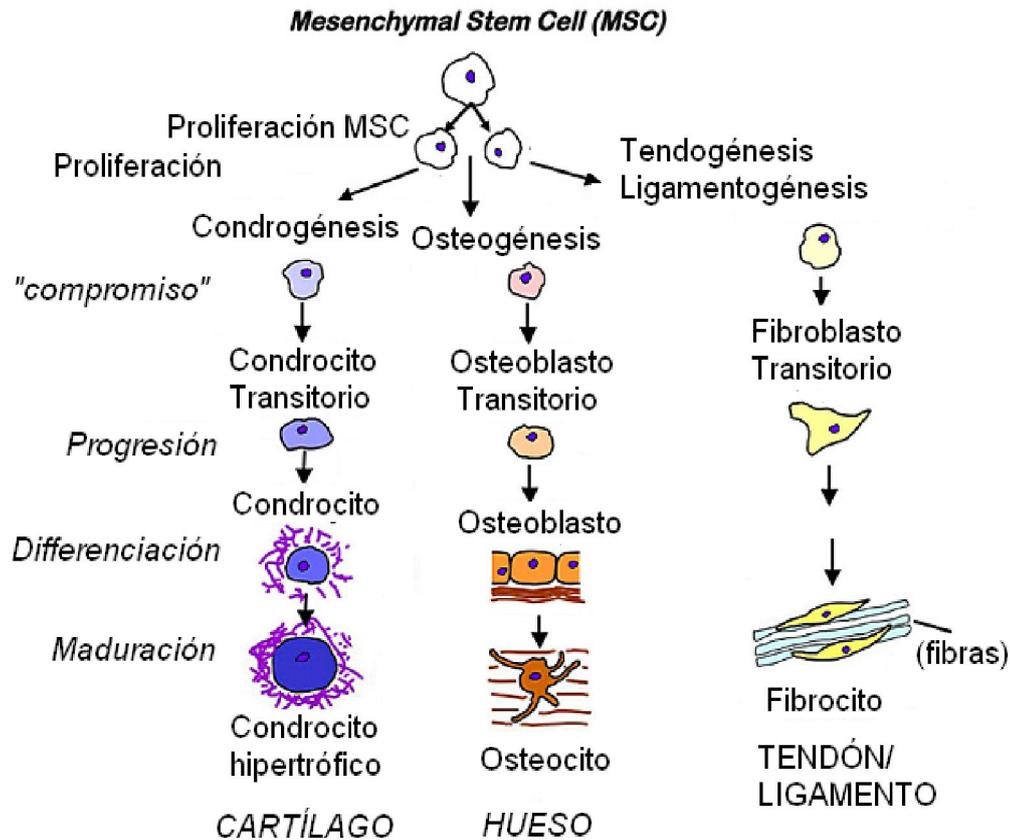


Fig 2.5. Diferenciación de las células mesenquimales (MSCs). Se muestran los caminos que pueden ser sorteados para células de tejidos conectivos (hueso, cartílago y tendones / ligamentos). (Modificado de Caplan et al. [25]).

2.3 Propiedades de los andamios

Idealmente como se ha planteado anteriormente un andamio para aplicaciones en ingeniería de tejidos debe poseer las siguientes características: tridimensionalidad, ser poroso, interconexiones entre los poros, biodegradabilidad, tratamiento superficial, propiedades mecánicas similares a las del sitio natural donde se implantará. A partir de algunos de los trabajos encontrados en la literatura, para este epígrafe se resumen algunas de las propiedades de los andamios.

2.3.1 Algunos de los principales biomateriales para andamios

Tres tipos de materiales para el desarrollo de andamios son generalmente investigados: (1) Polímeros Naturales: colágeno, glicoproteínas, quitina, quitosano, almidón; (2) Polímeros Sintéticos: basados fundamentalmente en policaprolactona (PCL); en ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-glicólico (PGA) y sus co-polímeros por ejemplo (PLGA), (3) Cerámicos: como son la hidroxiapatita (HA) y el fosfato de calcio ejemplo β (β -TCP).

Mientras que los biomateriales naturales ofrecen el mayor potencial en términos de biocompatibilidad, presentan grandes problemas con el rendimiento mecánico. En este sentido se puede decir que los polímeros sintéticos son los candidatos por excelencia para suplantar este tipo de limitación (ver tabla 2.2). Aunque estos polímeros sintéticos mencionados anteriormente han sido aprobados por la FDA (Food Drug Administration), para el uso en humanos; presentan algunas limitaciones relativas a los productos de degradación. Por ejemplo los productos de degradación de los PLA y PGA al ser ácidos tienden a reducir el pH alrededor del microambiente donde se localiza el biomaterial y este efecto ácido puede causar la necrosis de la célula, actuando a su vez como un acelerador de la degradación del polímero. Por estas razones se insiste en la necesidad de controlar la concentración y razones de degradación de estos polímeros.

Tabla 2.2. Propiedades de polímeros biodegradables [27]

Polímero	Punto Fundición (°C)	Temp. Transición Vítrea (°C)	Degradación (en meses)	Densidad (g/cm ³)	Res. Tracción (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (GPa)
PLGA	Amorfo	45-55	Ajustable	1.27-1.34	41.4-55.2	3-10	1.4-2.8
DL-PLA	Amorfo	55-60	12-16	1.25	27.6-41.4	3-10	1.4-2.8
L-PLA	173-178	60-65	>24	1.24	55.2-82.7	5-10	2.8-4.2
PGA	225-230	35-40	6-12	1.53	>68.9	15-20	>6.9
PCL	58-63	-65	>24	1.11	20.7	300-500	0.21-0.34

Las cerámicas han sido ampliamente utilizadas debido a su alta biocompatibilidad y su semejanza a la fase inorgánica del hueso o dientes. Las cerámicas son de una naturaleza frágil y por estas razones presentan una limitada aplicabilidad en la ingeniería de tejido. Algunos investigadores [28, 29] han desarrollado materiales compuestos de polímeros sintéticos y cerámicos en aras de mezclar la ductilidad del primero con la alta rigidez del segundo.

2.3.2 Tamaño de poros, porosidad e interconectividad de los canales

Los poros de los andamios pueden definirse como micro (*diámetro* < 100 μm) o macro (*diámetro* > 100 μm)[30]. Para que ocurra la colonización de los poros por las células, se necesita un tamaño mínimo de poros igual a 100 μm , si se desea la regeneración de tejidos óseo (tabla 2.3). En la tabla 2.3 se relacionan los tamaños de poros y los resultados principales en la regeneración de hueso. Sin embargo muchos de estos tamaños de poros reportados en la literatura presentan geometrías de poros aleatorias y no garantizan un óptimo valor que pueda ser generalizado para las diferentes aplicaciones. El efecto del tamaño de poro en la regeneración de un tejido se puede ejemplificar de la siguiente manera: 5 μm puede ser un tamaño óptimo para la neovascularización, entre 5–15 μm es adecuado para el crecimiento interno

de los fibroblastos, $\approx 20 \mu\text{m}$ para el crecimiento interno de los hepatocitos, $20\text{--}125 \mu\text{m}$ para piel de un adulto y de $100\text{--}350 \mu\text{m}$ para la generación de hueso[31].

Es de mi opinión que puede que estos resultados estén relacionados con la tortuosidad o curvaturas que presentan los poros y que de esta manera se estén condicionando los estímulos que sienten las células, ya sea un estímulo de compresión, tensión u otros que llegue a los receptores de las células. Otro punto importante y que es necesario controlar es la interconectividad de los poros. Esta es una característica física del poro que permite el suministro de nutrientes y la limpieza de los desechos de los productos del metabolismo dentro de los andamios. Por esta razón es recomendable tener andamios abiertos y bien interconectados para lograr una fácil vascularización y garantizar una penetración homogénea de las células logrando así un desarrollo uniforme del tejido.

Tabla. 2.3 Tamaños de poros y porosidades relacionados con la generación de hueso.

Tamaño de Poro del andamio (μm)	Porosidad (%)	Tendencias del crecimiento de tejido óseo mineralizado
2-6	33.5	No hay crecimiento de tejido [31]
15-40	46.2	No hay crecimiento de hueso y si existe crecimiento de tejido fibroso [31]
30-100 (80%, <100 μm)	46.9	Crecimiento de hueso, pero el mayor porcentaje es para tejido fibroso [31]
50-100 (63%, <100 μm)	46.9	Crecimiento de hueso, pero el mayor porcentaje es para tejido fibroso [31]
60-100 (37%, <100 μm)	48	Crecimiento de hueso, pero el mayor porcentaje es para tejido fibroso [31]
<100	35.3	No hay diferencias significativas entre la formación de tejido fibrosos y mineralización de hueso [32]
<200	51.0	No hay diferencias significativas entre la formación de tejido fibrosos y mineralización de hueso [32]
<350	73.9	Diferencias significativas entre la cantidad de hueso creciendo y los otros grupos controlados [32]

2.3.3 Importancia de las propiedades superficiales y mecánicas de los andamios

La interacción de las células con los andamios está también condicionada por la superficie del andamio. Se ha demostrado que si la superficie tiene cierta rugosidad o es bioactiva existe una mayor adhesión y esto es crucial para una mejor migración, proliferación y diferenciación. Las células son capaces de detectar con una alta sensibilidad las condiciones mecánicas de los sustratos. Partiendo del contacto inicial que es regulado por la integrina y el citoesqueleto seguidos por las deformaciones en el sustrato o por las cargas exteriores aplicadas (figura 2.6), se requiere conocer cuál es la respuesta de las células.

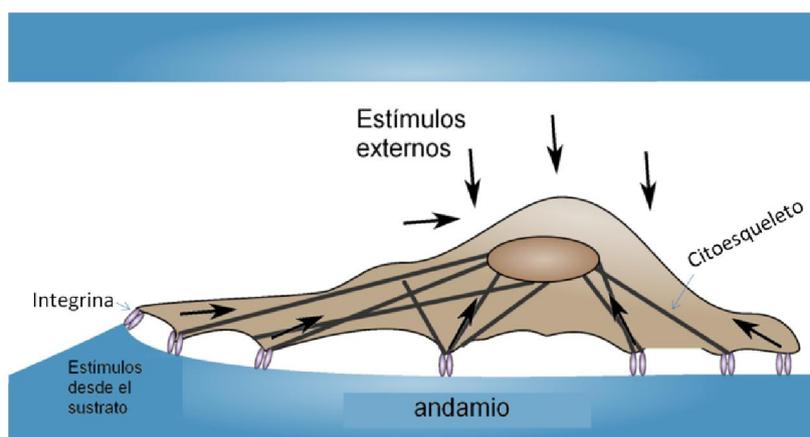


Fig 2.6. Esquema de una célula adherida (integrinas) a la pared del andamio y que está recibiendo estímulos externos (ej: fluido o por indentadores) y estímulos que provienen de la deformación del andamio.

Por ejemplo si el sustrato de adhesión es rígido y no deformable, las células no podrán reorganizarse y enganchar receptores en las placas de adhesión, lo cual constituye un pre requisito para suministrarle señales y así aumentar la viabilidad de las células. En la tabla 2.4 se resumen algunas de las propiedades mecánicas para andamios tridimensionales y se han relacionado con la porosidad de estos. Estas propiedades mecánicas son conocidas mediante ensayos tradicionales y es necesario vincularlas con los estímulos mecánicos locales que están actuando sobre las células adheridas.

Tabla 2.4. Propiedades mecánicas de algunos andamios dependiendo de la porosidad.

Material	Porosidad (%)	Propiedades Mecánicas	Referencias
Policaprolactona-fosfato tricalcico (PCL-TCP)	60-70	Módulo de Compresión 6.8 MPa; Resistencia a compresión 1.0MPa	Hutmacher et al. [33]
Poli (L-láctico-co-D,L-láctico)-fosfato tricalcico (PLDLLA-TCP)	60-70	Módulo de Compresión 88.6 MPa(seco); 51.5MPa(húmedo) Resistencia a compresión 1.0MPa	Hutmacher et al. [33]
Poli (D,L-láctico) (PDLLA). <i>Diseño Cúbico</i>	64±5	Módulo de Young , 324±39 MPa	Melchels et al. [34]
Poli (D,L-láctico) (PDLLA). <i>Diseño Giroide</i>	69±2	Módulo de Young , 169±21 MPa	Melchels et al. [34]
Poli-95%LL,5%DL.-láctico, estabilizado con titanio con partículas de vidrio	95	Módulo de Young, 120±30 kPa	Charles-Harris et al. [35]

2.4 Métodos computacionales aplicados en la caracterización morfológica de los andamios

En dependencia de la aplicación, biomateriales y métodos de fabricación así serán los microporos de los andamios. Las técnicas convencionales (separación de fases, espuma de gas, sales en suspensión)

presentan ciertas dificultades para reproducir o para garantizar una microestructura bien conectada de tamaños de poros[36-39]. No obstante, las muestras pueden ser caracterizadas a través de métodos computacionales no destructivos, de donde se destacan los análisis por micro Tomografía Computacional (μ CT) y por Resonancia Magnética (MR). Estas técnicas permiten que por medio de imágenes se pueda obtener una reconstrucción digital del andamio, permitiendo así la creación de modelos a partir de muestras específicas. Se han seleccionado algunas de las reconstrucciones de andamios que se encuentran en la literatura para ejemplificar las ventajas de estos métodos computacionales (figura 2.7). En la figura 2.7a (izquierda), se muestra una sección de un andamios de fosfato de calcio, donde se puede observar la distribución irregular de los tamaños de poros[38]. El proceso de reconstrucción se realiza mediante la superposición de las imágenes de μ CT y brinda un resultado tridimensional como el mostrado en la figura 2.7a (derecha) [38]. Generalmente estas reconstrucciones se utilizan para el análisis de la superficie de la estructura 3D, pero a partir de estas superficies es posible crear mallas y dar paso a la obtención de los volúmenes sólidos, que representarán las geometrías de los modelos por elementos finitos (FEM) o de modelos de dinámica de fluido (CFD), que encontraremos en la literatura. Por ejemplo, para el modelo de FEM desarrollado por Milan et al [40] se pueden distinguir entre las fases de un material compuesto por PLA (ácido poli láctico) y G5 (Vidrio de fosfato de calcio estabilizado con titanio)(figura. 2.7b). Esta identificación es posible mediante la aplicación de diferentes escalas de grises en la etapa de reconstrucción, donde se identifican estos materiales. El problema del uso de los modelos creados a partir de estas estructuras irregulares es que cambiará de un andamio a otro, por la no existencia de repetitividad, ni garantía de que las interconexiones y tamaños de los poros sean semejantes o adecuados para ciertas aplicaciones.

Los métodos de fabricación a partir del diseño asistido por ordenador (CAD) permiten el control en la fabricación de las estructuras 3D; estos métodos han sido recientemente incluidos en la biomedicina y especialmente en el área de la ingeniería de tejidos [41]. El nombre que comúnmente se utiliza para denominar estas técnicas es rápido prototipado (RP). Estas técnicas garantizan una mejor reproducibilidad e interconectividad de los poros que los métodos tradicionales mencionados con anterioridad. En la figura 2.7c, se muestran los pasos usados para caracterizar un andamio regular. El primero es concebir el diseño deseado (CAD) de los poros, en el ejemplo de la figura 2.7c, se muestra un diseño giroide[34], [42] formando la estructura tridimensional, posteriormente la fabricación y finalmente la verificación o caracterización mediante la reconstrucción de imágenes μ CT[34]. Con estos pasos se puede estudiar la influencia del método de fabricación en la estructura final. Estos andamios regulares pueden ofrecer muchas facilidades a la hora de entender y optimizar los diferentes comportamientos biológicos. En los epígrafes posteriores se presentan diversos ejemplos de aplicación de métodos numéricos en el entendimiento de fenómenos biológicos en los andamios para aplicaciones dentro de la ingeniería de tejido.

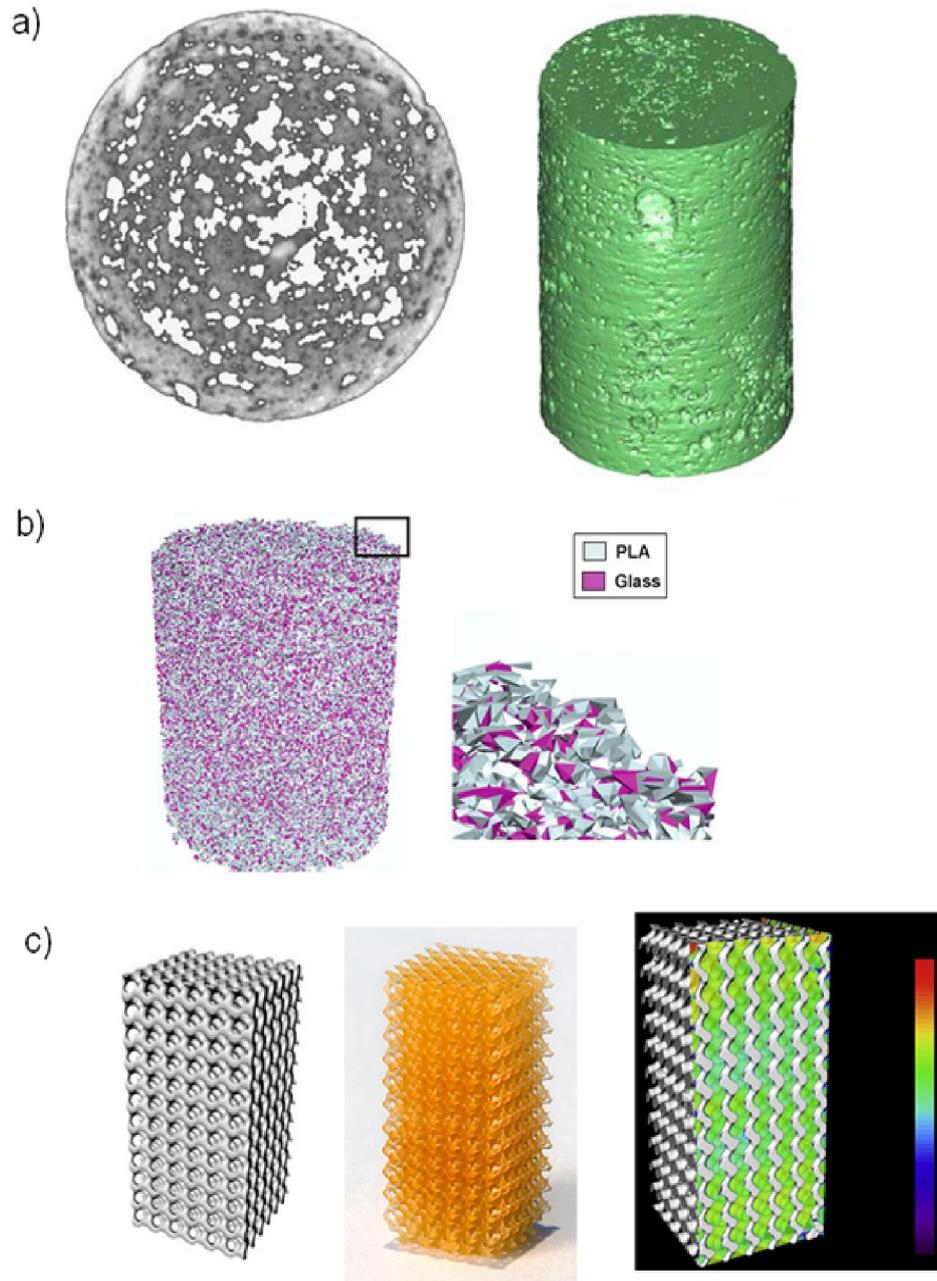


Fig 2.7. Caracterización computacional de andamios **(a)** (izquierda) imagen de sección cortante de micro-CT de fosfato de calcio no inyectable y (derecha) reconstrucción 3D en MIMIC(Materialise) del cemento de CaP (modificado desde Lacroix et al. [38]). **(b)** Reconstrucción 3D de un andamio de PLA-G5 (ácido poli láctico y vidrio), donde se representan los componentes del compuesto en un modelo por elemento finitos (modificado desde Milan et al. [40]). **(c)** Pasos en la caracterización computacional de un andamio regular, diseño CAD de unidades básicas giroide ensambladas en 6x6x12 unidades, se muestra una foto del andamio ya fabricado y la verificación del diseño realizada mediante la reconstrucción de escáner de μ CT (modificada desde Melchels et al [34]).

2.5 Evaluación computacional de las propiedades mecánicas de los andamios

En el caso de necesitar sustituir un tejido óseo dañado, el andamio debe ser capaz de soportar temporalmente el régimen de carga a la que está sometida la zona afectada, lo cual se traduce en la necesidad de proporcionar una resistencia mecánica bastante elevada. Esta es una de las razones por la cual las propiedades mecánicas de los andamios son un punto crítico y que dependerá por lo tanto de la aplicación, manejabilidad y las propiedades que se deseen obtener del conjunto andamio-tejido. La obtención computacional de la microestructura del andamio explicada en el epígrafe anterior ofrece la posibilidad de estudiar los andamios respetando la estructura específica de los poros.

Mediante el método de elementos finitos (FEM) se dan soluciones aproximadas a problemas físicos basados en ecuaciones diferenciales parciales. Para definir un problema se parte de un continuo (geometría); que su dominio es dividido en un número finito de subdominios (elementos), cuyo comportamiento se especifica mediante un número finito de parámetros y donde la solución del sistema completo será el ensamblaje de las soluciones en los elementos [43]. En ingeniería de tejidos, el FEM ha sido utilizado principalmente para determinar las propiedades mecánicas efectivas de los andamios porosos. El método permite calcular el módulo de Young efectivo (E_f) (Ec. 2.1), dependiendo de la fuerza de reacción R , calculada en los nodos, donde A , el área total de la sección cortante de el andamio y las deformaciones axiales aplicadas $\varepsilon = \Delta l/l$ [38], [44].

$$E_f = (R/A)/(\Delta l/l) \quad (2.1)$$

Los parámetros mecánicos calculados en las superficies del andamio son considerados como estímulos o señales que perciben las células adheridas. Dependiendo de la magnitud del estímulo (deformación) así será la respuesta de las células para su proliferación o diferenciación [45]. Generalmente, para aplicaciones de tejido óseo se aplican cargas de compresión o tracción, determinando así la resistencia y la distribución de deformaciones en las paredes del andamio (figura. 2.8). En el ejemplo de la figura 2.8, el efecto de los estímulos mecánicos fueron estudiados a través de FEM para estructuras de andamios de cementos de CaP y para vidrio poroso [38]. La deformación octaédrica en una sección 2D de ambos andamios son mostrados en la figura 2.8a. Altas deformaciones (0.75%) son encontradas en áreas cercanas a los poros bajo la aplicación de un 0.5% de compresión. La distribución de deformaciones es bastante heterogénea correspondiendo con la irregularidad de la distribución de los poros.

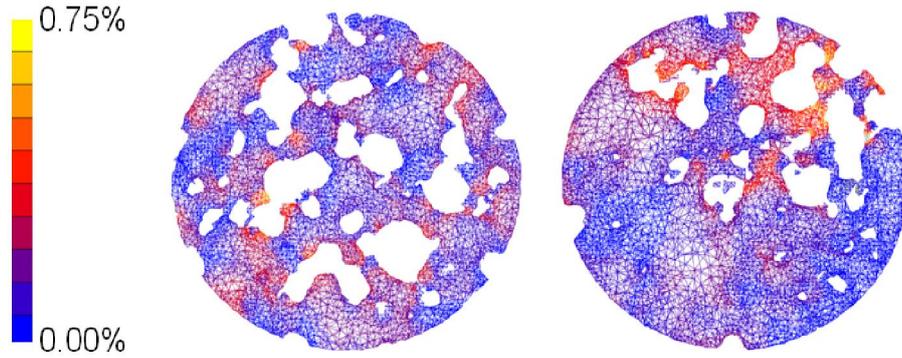


Fig 2.8. Ejemplo de la aplicación de FEM en la determinación de las propiedades mecánicas de los andamios. Deformación octaédrica para dos muestras (izquierda) cementos de CaP y (derecha) andamios de vidrio (modificado desde Lacroix et al.[38])

2.6 Descripción computacional de la degradación de andamios y de regeneración de tejidos

La degradación de los andamios está directamente relacionada con las propiedades mecánicas temporales que deben proporcionar los andamios para sustituir el tejido dañado. El ejemplo escogido fue desarrollado por Adachi et al. [46], ellos proponen computacionalmente una manera para describir el proceso de regeneración de tejido aplicado a la ingeniería de tejido óseo. El estudio fue basado en el método de elementos finitos y en la evaluación de la función mecánica del proceso de regeneración medido a través de los cambios de energía de deformación en un sistema compuesto por el andamio y el nuevo hueso. Dos diseños de andamios regulares fueron evaluados uno tipo enrejado cúbico y el otro tipo esférico, descritos ambos mediante la unidad básica de diseño para un andamio regular (figura 2.9). La degradación del andamio fue asumida que ocurrirá debido a la hidrólisis, para la cual el peso molecular del polímero W decrecerá, esto se traduce en la reducción del módulo de Young del andamio E_S (ver Ec. 2.2). En este caso, E_{S0} es una constante correspondiente al módulo de Young inicial y W_0 es el peso molecular inicial. La razón de degradación se verá afectada por la morfología de la microestructura del andamio y por áreas superficiales que pueden acelerar el proceso de difusión de las moléculas de agua en el interior del material polimérico macizo.

$$E_S(W(t)) = E_{S0} \frac{W(t)}{W_0} \quad (2.2)$$

La formación de hueso y la reabsorción son acopladas al modelo asumiendo que existen actividades celulares osteoblásticas y osteoclasticas. El nuevo hueso formado es simulado usando la ecuación de razón de remodelado de una superficie del hueso trabecular (Ec. 2.3), basado en la hipótesis de tensiones uniformes. En esta ecuación, σ_c es la tensión representativa en el punto x_c en la superficie del hueso o del andamio para el cual los osteoblastos forman las nuevas matrices del hueso, y σ_d son las tensiones representativas en el área vecina al punto x_d . En la ecuación S_S define la superficie del andamio, σ_r es la

tensión en el punto vecino x_r dentro de la distancia de detección crítica l_L ($l = |x_r - x_c|$) y $w(l)$ es la función de descomposición explicada en más detalles por Adachi et al. [46].

$$\sigma_d = \frac{\int_S w(l)\sigma_r dS_S}{\int_S w(l)dS_S} \quad (2.3)$$

Los cambios de la energía total de deformación del sistema hueso-andamio, $U(t)$, en el proceso de regeneración son graficadas en la figura 2.9 para las estructuras de poros enrejado cúbico y la esférica. En las gráficas se indica la transición de la función mecánica para los dos componentes estructurales. Para la estructura enrejada (figura 2.9 a) el punto de entrecruzamiento ocurre a los 40 días, mientras que para el poro esférico (figura 2.9 b) ocurre en aproximadamente 20 días. Se demuestra en este caso como el diseño del poro del andamio presenta una alta influencia en el proceso de regeneración. A través de los casos presentados, es posible demostrar que las variables para optimizar la regeneración del hueso pueden ser determinadas mediante la simulación computacional. Sin embargo, las ecuaciones utilizadas para realizar las predicciones de degradación del andamio y de la formación de hueso se derivaron de bases que son diferentes y que limitan en gran medida este estudio.

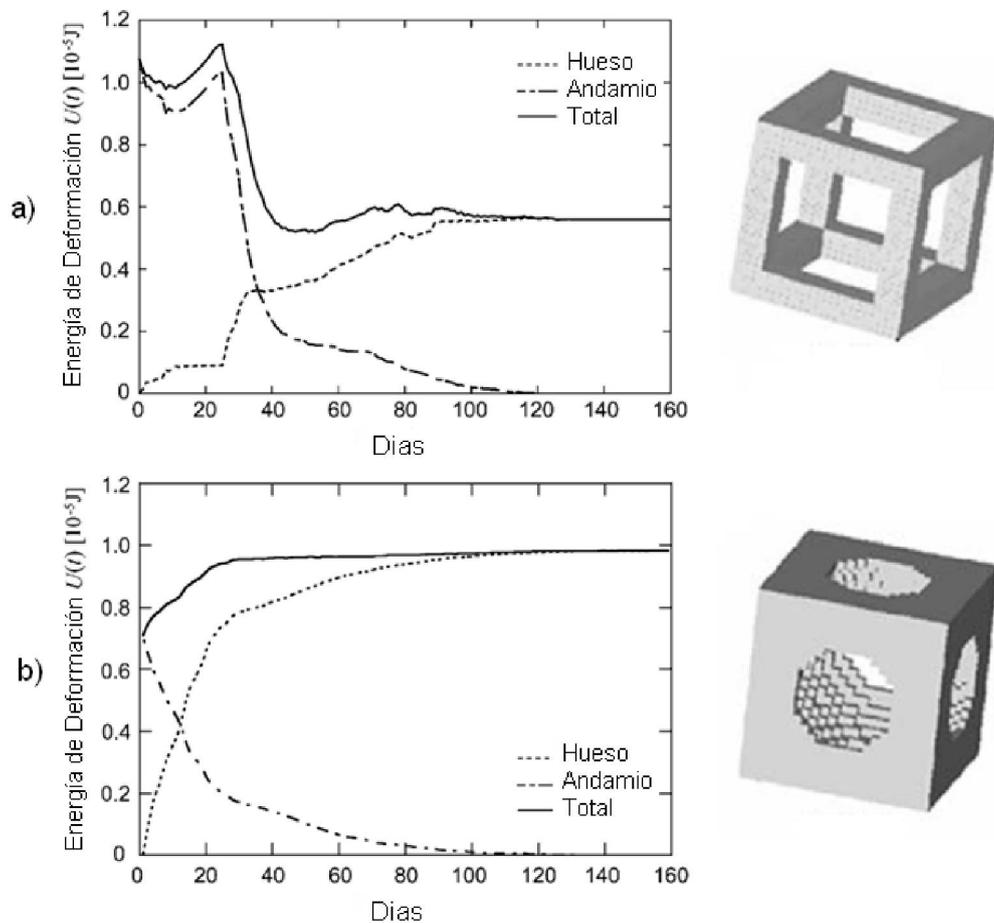


Fig. 2.9. Simulación computacional de la regeneración del hueso en la ingeniería de tejidos, basada en la degradación del material y en la formación de nuevo tejido óseo (a) Enrejado Cúbico (Lattice-like) con $l=1.6\text{mm}$ y (b) estructura esférica con $d=2.6\text{mm}$. (Modificado desde Adachi et al. 2006[46])

2.7 Método de homogenización para diseños de andamios

Los andamios deben combinar parámetros conflictivos como función mecánica y apertura de poro para el transporte de masa. Para evaluar el compromiso que debe existir entre estos dos parámetros, se propone la teoría de homogenización, basada en ecuaciones de equilibrio a multiescala y que permiten calcular las propiedades efectivas en estas unidades básicas [47], [48]. El ejemplo que se ha escogido para describir la teoría es el estudio presentado por Hollister[47]. Para este estudio las propiedades mecánicas como por ejemplo la rigidez específica (E^{macro}) (Ec.2.4) se calcula a partir de la rigidez a nivel microscópico (E^{micro}), esto se obtiene dependiendo del tensor de deformación (M) y del volumen de la unidad básica (V) [48]. Por otro lado, para el estudio del transporte de masa se necesita homogenizar algún parámetro representativo. Los trabajos son enfocados generalmente a la permeabilidad macroscópica (K) (Ec. 2.5) que es calculada mediante la velocidad de fluido promedio según la ecuación de Navier-Stokes (v) y los gradientes de presiones[47]. En la figura 2.10 se muestran los resultados obtenidos por Hollister[47], mediante la aplicación del método de homogenización.

$$E^{macro} = \frac{1}{|V_{unit\ cell}|} \int_V E^{micro} M dV_{unit\ cell} \quad (2.4)$$

$$K^{macro} = \frac{1}{|V_{unit\ cell}|} \int_V v dV_{unit\ cell} \quad (2.5)$$

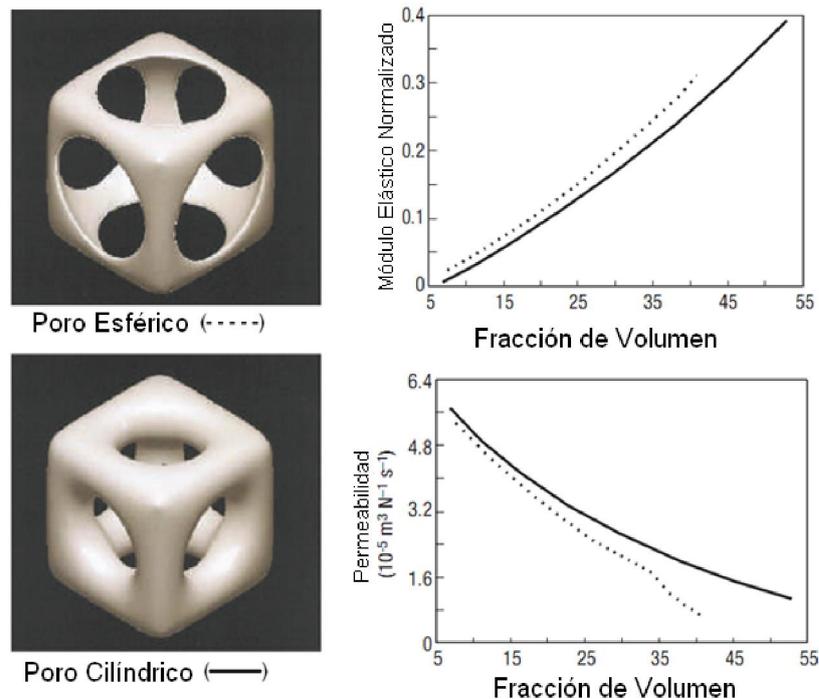


Fig 2.10. Módulo de Young y permeabilidad versus porosidad en dos diseños de unidades básicas diseñadas; poro esférico (superior, en el gráfico con líneas discontinuas) y poros cilíndricos (inferior, en el gráfico en línea sólida) (modificado desde Hollister 2005[47]).

Un incremento de la cantidad de material claramente se transforma en un incremento de las propiedades elásticas, pero a costa del detrimento de la permeabilidad. Los resultados demuestran que el módulo de Young se incrementa como era de esperar con el incremento de la fracción de volumen y que es para los poros esféricos donde se encuentra una rigidez mayor del andamio. La permeabilidad decrece con el incremento de la fracción de volumen y es para los poros cilíndricos para los cuales se obtienen valores más altos de permeabilidad. La importancia de esta metodología radica en la posibilidad de maximizar la permeabilidad (transporte de masa) teniendo en cuenta el mantener las propiedades mecánicas muy semejantes a las del tejido natural a sustituir.

En la figura 2.11 se muestran algunos de los diseños utilizados por Hollister y Yu Lin [49] para obtener una estructura optimizada, la cual es mostrada de forma ideal en la figura 2.11d. En este caso y aplicando el método de homogenización, los autores demostraron la posibilidad de obtener una arquitectura que con una porosidad adecuada 74% cubra las necesidades de una rigidez óptima. De esta manera se optimiza la rigidez pero obteniendo poros muy cerrados, afectando los valores de permeabilidad. No obstante, el método permite la optimización de las estructuras aunque no llega a garantizar que para aplicaciones de ingeniería de tejidos se obtengan magnitudes de señales mecánicas similares a las que son necesarias para el control las actividades de diferenciación, sembrado celular, proliferación o migración bajo ciertas condiciones experimentales.

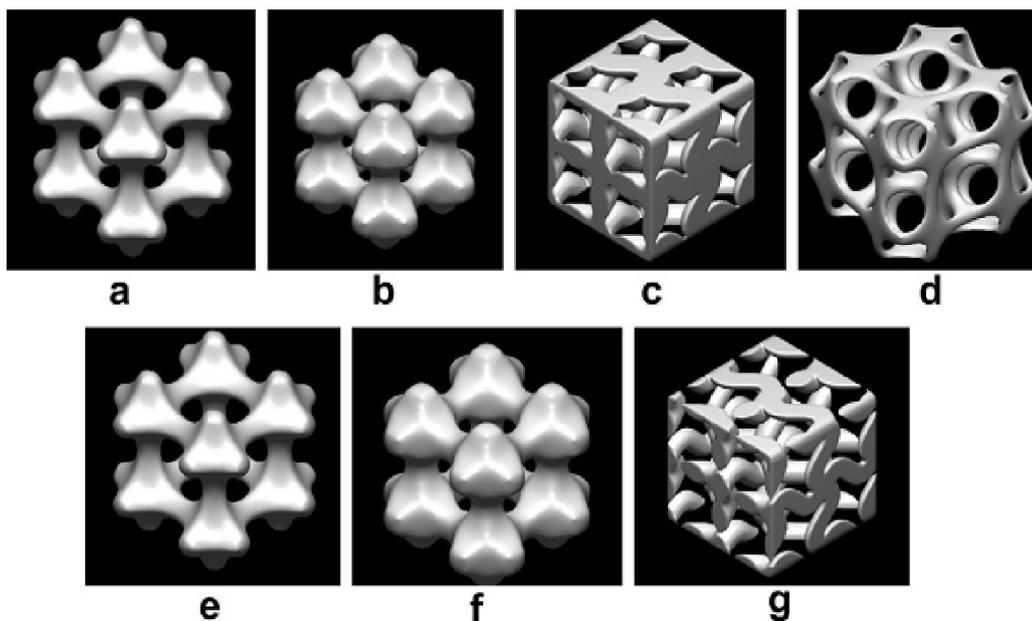


Fig 2.11. Topologías de arquitecturas estudiadas por Hollister y Yu Lin [49]: (a) porosidad 65% poro esférico; (b) porosidad 65% poro cilíndrico ortogonal c) porosidad 65% fibras de onduladas, (d) topología optimizada 74% de porosidad, (e) porosidad 75%, poro esférico25%; (f) porosidad 75% poro cilíndrico ortogonal g) porosidad 75% fibras de onduladas.

2.8 Modelos de flujo de fluido en andamios porosos

En ingeniería de tejidos son generalmente usados bioreactores como sistemas para proveer de un ambiente dinámico a las células. Los estímulos son originados partiendo de las deformaciones de las superficies del andamio o desde el flujo de fluido que se mueve por el interior de los poros. Pero de manera general los bioreactores son utilizados para crear una circulación o transporte de masa que permita incrementar la eficacia del sembrado celular y también para proveer de estímulos a las células en la fase de cultivo. Entre los bioreactores están los llamados de perfusión directa que son sistemas extensivamente usados en ingeniería de tejidos por la capacidad que presentan estos de llevar una distribución uniforme del fluido[50-52]. El método que se utiliza para simular los fenómenos relacionados con la intervención de líquidos es el de dinámica de fluido computacional (CFD)[53]. Para el caso específico de la perfusión directa, se crea un flujo de fluido laminar simulado mediante las ecuaciones clásicas de Navier-Stokes (Ec. 2.6) y la de continuidad (Ec.2.7), donde u y ∇p son las velocidades de fluido y el gradiente de presión.

$$\rho \vec{u} \cdot \nabla \vec{u} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{u} \quad (2.6)$$

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (2.7)$$

En la figura 2.12 se muestran los resultados de CFD para morfologías de poros irregulares [40]. El volumen fluido es delimitado por las paredes de los poros a partir de las imágenes de micro-CT tomadas desde las morfologías irregulares de los andamios PLA-G5 (figura 2.12a). Las propiedades del biomaterial del andamio no tienen ningún tipo de influencia para estos tipos de análisis. Milan et al[40] obtuvieron para este estudio que existe una distribución heterogénea de fluido debido a la irregularidad de la interconexión de los poros (figura 2.12a). Ellos calcularon que para una velocidad de $100 \mu\text{m/s}$ en la entrada del andamio, las velocidades en el centro de los poros están en el rango de entre 150 y $780 \mu\text{m/s}$, mientras que en las proximidades de la pared estas velocidades se encontrarán entre 0 – $50 \mu\text{m/s}$ (figura. 2.12a).

Estudios en andamios de morfología regular como el que realizan Boschetti et al. [54] (figura 2.12b), presentan la posibilidad de controlar los parámetros de fluido teniendo en cuenta la porosidad y el tamaño de poro. En la figura 2.12b se muestra como a medida que se aumenta la porosidad y el tamaño de poro disminuyen las velocidades en el centro de los poros. La necesidad de incluir los diseños de los poros en los estudios de estímulos fluidos en andamios no queda totalmente esclarecido por Boschetti et al.[54]; pues los autores realizan el estudio en un solo diseño donde los perfiles de fluido se muestran proporcionales a las variaciones de la fracción de volumen de material.

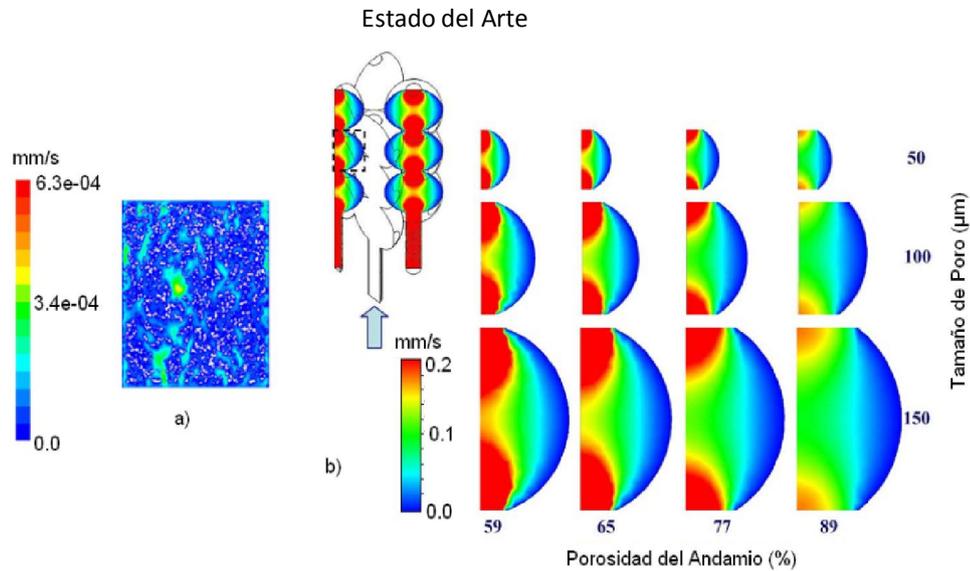


Fig 2.12. Perfiles de velocidades representados en una sección cortante para un flujo de fluido de perfusión ($v=100\mu\text{m/s}$) (a) Morfología irregular del andamio fabricado con PLA-G5 (ácido poli-láctico y vidrio G5), el modelo fue obtenido desde las imágenes de micro-CT (Milan et al. [40]). (b) Variación de la magnitud de velocidad del fluido en un modelo de andamio con poros regulares. El efecto de los tamaños de poros y las porosidades en los perfiles de velocidad es representado (Boschetti et al. [54]).

2.9 Simulación de los conceptos de mecano-regulación

2.9.1 Diferenciación celular en andamios

En 1997, una teoría de mecano regulación fue introducida por Prendergast et al. [55], con la cual se propone explicar la relación existente entre los estímulos mecánicos con la formación del tejido basado en la diferenciación de células mesenquimales. La propuesta inicial asumió que las dos fases coexisten de manera saturadas (formulación poroelástica) encontrando aplicaciones en: simular la interfase implante-hueso [56], la curación de una fractura[57] o un defecto osteocondral[58], en cámaras de hueso[59], [60], y distracción del hueso [61]. La primera aplicación de este algoritmo en ingeniería de tejido fue realizado por Kelly & Prendergast en 2007 [62] con el cual se estudió la diferenciación celular y la influencia de las propiedades del material de un andamio sobre las propiedades condrogénicas para corregir un defecto osteocondral.

Las bases del algoritmo de diferenciación son que a través del estudio de la magnitud del estímulo S . Este parametro es calculado mediante la combinación de la deformación cortante octaédrica (γ) y las velocidades del fluido (u) (figuras 2.11) [63]. Ambos estímulos puede producir una distorsión de las células afectando su actividad de diferenciación. Según la ecuación del estímulo (Ec. 5.1), a y b son las constantes empíricas [56]; $a=0.0375$ y $b=3\mu\text{ms}^{-1}$. Ahora si $S>3$, entonces la diferenciación de una célula será en células productoras de tejido fibroso; si $3>S>1$, la diferenciación de una células será para cartilago; si $1>S>0.267$, la diferenciación de la célula será para el hueso; y si $0.267>S>0$, entonces ocurre la reabsorción [64] (figura. 2.11).

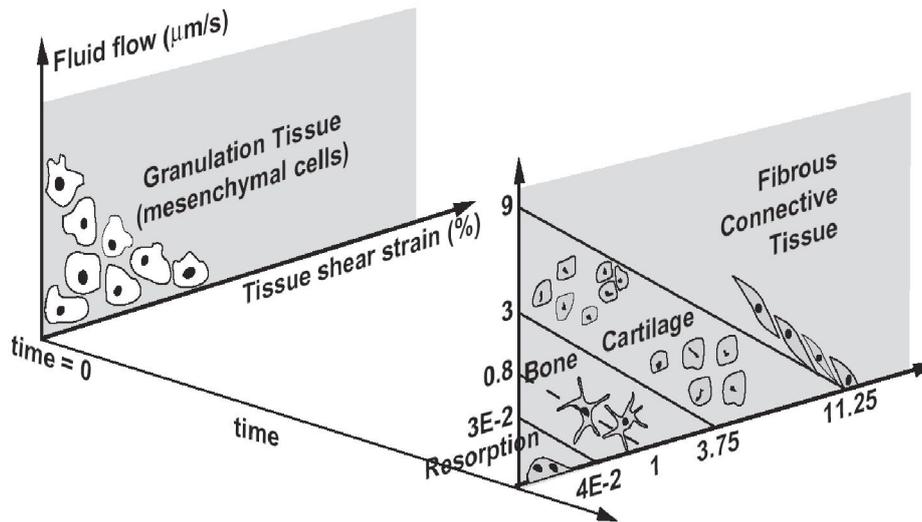


Fig 2.11. Modelo de mecano-regulación. El fenotipo de tejido es determinado para cada elemento dependiendo de de la posición en que se encuentre la combinación de estímulos dentro del diagrama de mecano-regulación (el diagrama no se encuentra a escala (Lacroix et al. [63]).

$$S = \frac{\gamma}{a} + \frac{u}{b}, \quad (2.8)$$

En el ejemplo de aplicación del algoritmo realizado por Milan et al.[64], se predice la diferenciación en un material PLA-G5 bajo diferentes razones y magnitudes de carga compresiva. Ellos mostraron el efecto que presentan estos factores en la distribución de los tejidos en una misma configuración del andamio. En la figura 2.12 se puede ver el incremento de los estímulos en relación con el incremento de la carga de compresión y como para las condiciones de 1% de deformación a 0.0025 s^{-1} es muy homogénea la formación de tejido óseo. Este resultado está directamente relacionado con la estructura y la falta de repetitividad no permite replicar en otras muestras estos resultados aunque se controlen y mantengan las condiciones de cultivo.

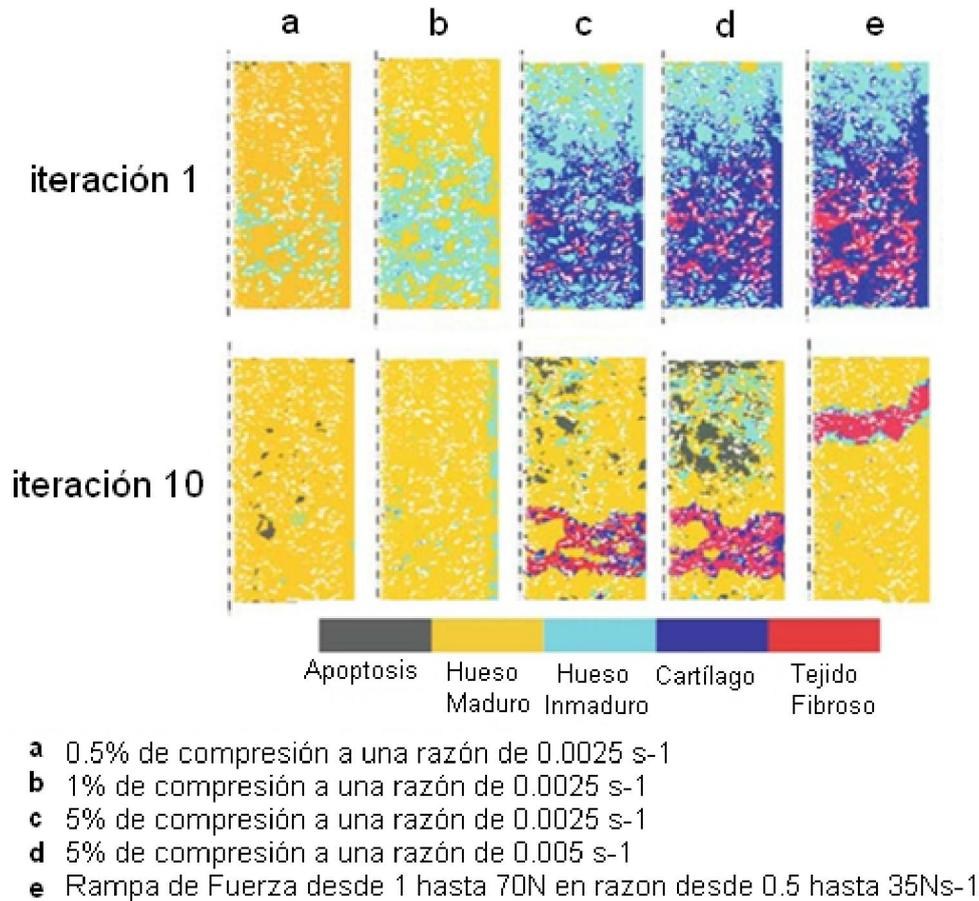


Fig 2.12. Ejemplo de aplicación del algoritmo de diferenciación en un andamio de PLA-G5 (modificado Milan et al.[64]). Resultados para diferentes estímulos de compresión cíclica. Se muestra como valores de 0.5% de deformación garantiza mayor uniformidad y formación del hueso maduro. Y se muestra la heterogeneidad de estímulos para valores de deformaciones mayores.

Otro ejemplo es el estudio realizado por Sandino y Lacroix [65] en andamios de morfologías irregulares de fosfato de calcio (CaP). En este caso la diferenciación para los estímulos mecánicos es transmitida a través de fases no saturadas, las cargas de compresión se aplican en la parte del biomaterial y el flujo de fluido de perfusión se calcula en el interior de los poros actuando como estímulos. Las propiedades de los elementos finitos o propiedades del tejido que se va diferenciando son sustituidas por las propiedades de un fluido viscoso que cambia en relación con los estímulos aplicados. En la figura 2.13 se muestra como las condiciones aplicadas al fluido, de presión o de velocidad de fluido arrojan resultados diferentes en cuanto al tipo de fenotipo predominante después de un mismo tiempo. La condición de presión aplicada en la entrada lleva a un mayor porcentaje de diferenciación en tejido óseo, si la comparamos con su equivalente para una velocidad de 10 μ m/s y donde se obtendrán zonas apoptóticas en el interior de los poros.

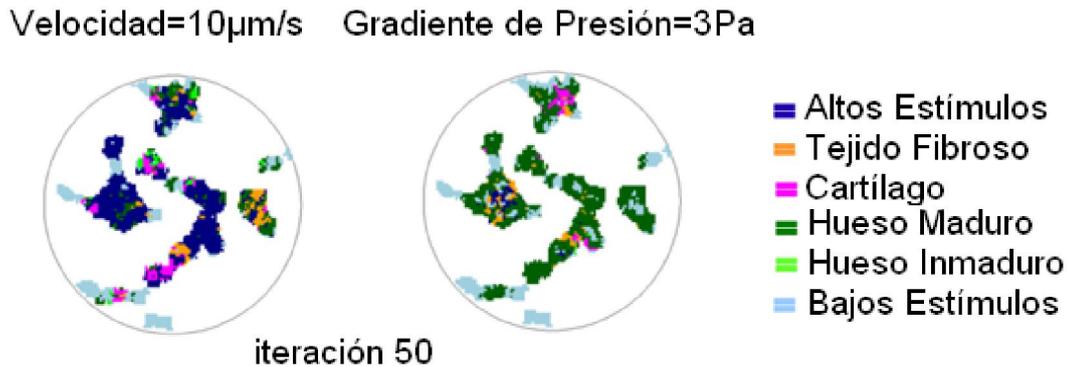


Fig 2.13. Diferenciación de tejido estudiada bajo dos condiciones de flujo de fluido en andamios de fosfatos de calcio. Velocidad de fluido (10 μ m/s) y presión (3Pa). (Modificado desde Sandino & Lacroix[65])

2.9.2 Aproximación mediante puntos lattice

Una relevante aplicación en los modelos de mecano-biología es la formulación de los puntos *lattice*, introducidos en estos modelos por Pérez y Prendergast con el objetivo de incluir el comportamiento individual de las células [66]. Un *lattice* creado dentro de un elemento finito representa un tejido de granulación, de este modo cada *lattice* es considerado una región del espacio para ambas células y matriz extracelular (figura 2.14). El modelo *lattice* ha sido usado como alternativa para simular la proliferación y la migración de las células. La proliferación es asumida (3D) que puede ocurrir en las seis direcciones principales (figura 2.14b). Primeramente una nueva posición es aleatoriamente seleccionada desde los alrededores de la posición original (incluye a la posición original) y una posición vecina es seleccionada para que sea ocupada por la célula hija. En el evento si una posición está ocupada se escoge otra que no esté ocupada de manera aleatoria nuevamente. Este proceso continúa hasta que la simulación finalice o que todas las posiciones del *lattice* estén ocupadas. Para el proceso de migración, una nueva posición para las células es escogida de manera aleatoria (que incluye la posición original). Al saber que el proceso de migración es un proceso más rápido, una nueva localización de una célula migrada se escoge por iteración. Un punto *lattice* podría ser ocupado por una MSCs, un fibroblasto, un condrocito, un osteoblasto o una célula endotelial.

La formulación del *lattice* fue aplicada en ingeniería de tejidos por Byrne et al. [68] (figura. 2.15). En ese trabajo, los autores estudiaron el efecto de las propiedades porosidad y razón de degradación en las propiedades mecánicas durante el proceso de formación de tejido en un andamio regular. Inicialmente, ellos asumieron que el andamio se encontraba colonizado por tejido de granulación y con 1% de puntos *lattice*, escogiendo de manera aleatoria el sembrado de células mesenquimales. Se calculó y optimizó las propiedades del andamio para obtener una mayor formación del tejido óseo, pero la mayor limitación del estudio es el hecho de ubicar las células sembradas de manera aleatoria en una sola unidad de poro del andamio, debido a que se asume la fase del sembrado y disminuyendo cualquier posible relación existente entre la morfología del andamio y la distribución del sembrado.

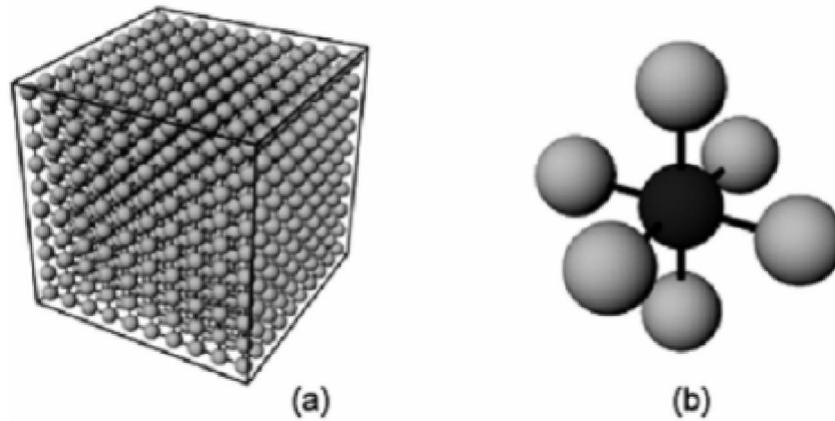


Fig 2.14 (a) Lattice generado desde la geometría de un elemento de granulación (b) Seis localizaciones potenciales de una célula para migrar y proliferar[67].

Por otro lado, la secuencia de las células endoteliales y de los vasos pueden ser definidas en los lattice a través de una función probabilística [69], [70]. Los estudios de angiogénesis durante la diferenciación del tejido han sido introducidos por Checa y Prendergast [71] utilizando el modelo lattice. Este modelo de angiogénesis fue aplicado a un andamio simplificado para ingeniería de tejido óseo y se estudio la influencia de la distribución de las células sembradas inicialmente en la variación de la vascularización y la penetración de las conexiones vasculares. Se demostró que las condiciones de sembrado celular tienen un efecto significativo en la vascularización de los andamios [70]. También con el objetivo de simular el fenómeno angiogénesis se aplicó un algoritmo similar para un andamio irregular de cemento de fosfatos de calcio (CaP)[69]. Sandino et al[69] obtienen para este estudio que para magnitudes de deformaciones mecánicas totales de 0.5% y 1% no existe un efecto notable en el crecimiento de los vasos (figura 2.16). Pero son notables los cambios que se producen en términos de estímulos mecánicos y de distribución de las células.

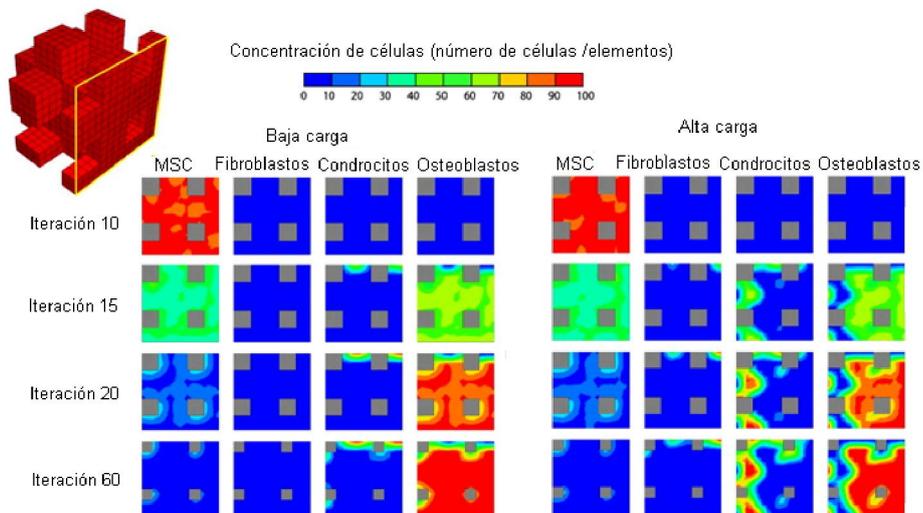


Fig 2.15. Distribución de células en un andamio simplificado usando el método de lattice (modificado desde Byrne et al.[68])

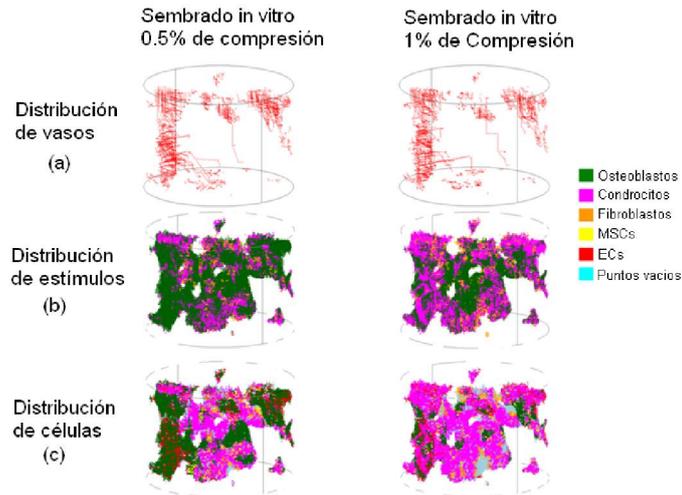


Fig 2.16. Estímulo de mecano-regulación y fenómeno angiogénico bajo condiciones de 0.5% y 1% de deformación total y sembrado de células MSCs después de 100 iteraciones son mostradas. (a) Conexión vascular (b) distribución de estímulos (c) distribución de células (Sandino et al. [69])

2.9.3 Aplicación de modelos multiescala en ingeniería de tejidos

En la literatura es posible encontrar análisis de parámetros de andamios para ingeniería de tejidos basados en aproximaciones de multi escalas. Un ejemplo es el estudio de Sanz-Herrera et al.[72] donde los autores analizan factores como rigidez, porosidad, cinética de reabsorción del material, tamaño de poro y pre sembrado en andamios para la creación de hueso. Este tipo de análisis ha sido fundamentalmente aplicado a situaciones in vivo y donde existen diferentes ambientes o escalas (tiempo o dimensionales) que se han de solapar unas con otras hasta obtener diferentes transiciones fenomenológicas. Destacar en el ejemplo seleccionado que el efecto del pre sembrado es un punto de vital importancia ya que se ha encontrado que al asumir como uniforme la distribución de las células iniciales y al tomar las mayores concentraciones, la formación del tejido óseo será mayor. También se evidencia que mediante la transición de escalas la calidad del tejido creado está directamente influenciada además de la distribución de estas células iniciales por la rigidez del andamio y por el tamaño medio del poro.

2.10 Conclusiones y perspectivas de esta tesis

En este capítulo se plantean los fundamentos principales de la ingeniería de tejidos y lo difícil y costoso que podría resultar la determinación experimental de los parámetros óptimos para la caracterización de todos los procesos para una aplicación determinada. Se recogen a través de ejemplos como se han enfocado los diferentes problemas a través de variantes numéricas y se concluye que aún queda mucho camino por recorrer en el campo de ingeniería de tejidos y sobre todo para obtener la garantía de una total efectividad en aplicaciones clínicas. Es necesario por lo tanto conocer mucho más sobre los fenómenos

que tienen lugar durante la formación del nuevo tejido, de esta manera se tendrá un mayor control. Muchas son las ventajas que presentan los métodos numéricos para visualizar, controlar e intentar predecir los procesos en los cultivos. Primero la posibilidad de caracterización mediante las reconstrucciones 3D de los andamios permitiendo obtener una aproximación de la estructura porosa de los andamios y recrear los modelos para hacer simulaciones de fluidos dinámicas y mecánicas.

Las ventajas de las nuevas técnicas de fabricación (RP) que permiten diseñar los poros de los andamios (en CAD) y hacer un estudio sobre una estructura repetible y regular. A pesar de esto, los estudios numéricos se ven limitados debido a que muchos de los fenómenos son desconocidos y otros son necesarios asumirlos a partir de otras condiciones por ejemplo ambientes in vivo. La falta de soporte experimental que puedan relacionar los modelos numéricos a los resultados in vitro son otra de las limitantes que se ha posido encontrar en este estudio bibliográfico y por estas razones se desea mediante esta tesis aportar algunos resultados y métodos que sirvan un poco de unión entre la fase experimental y la fase numérica. Algunos de los principales puntos abiertos a investigación se citan a continuación:

- a) Optimizar las arquitecturas de los andamios en función de la aplicación o el defecto a arreglar.
- b) Estudios de las condiciones de cultivo in vitro y la determinación de parámetros óptimos relacionados con las estructuras.
- c) Estudiar la influencia de los diseños de dispositivos (bioreactores), que son los encargados de proporcionar los estímulos y que permita el escalado a nivel clínico de los estudios experimentales.
- d) Verificación experimental de los resultados, para contrastar los resultados numéricos, permitiendo la cercanía de teorías (metodologías) y experimentos.
- e) Evaluar arquitecturas específicas y de factible fabricación mediante los métodos de RP existentes, permitiendo el desarrollo de modelos a partir de imágenes de microCT, con mallas de fluido y sólido congruentes.
- f) Centrar la atención en la fase inicial “el sembrado celular”, esta fase no es intuitiva y tiene gran influencia en los resultados que se han publicado hasta este momento. Además a nivel experimental se necesita el control de esta fase, para la optimización del proceso y para conocer algunos fenómenos relacionados con este paso.
- g) Incluir variantes de interacción célula-biomaterial en los modelos, que permita incluir algún tipo de bioactividad en las simulaciones matemáticas.

Capítulo 3: Bioreactor de perfusión para la generación de recubrimientos de cartílago articular

Resumen: Para los estudios *in vitro* en ingeniería de tejidos es vital el control minucioso de las condiciones físico-químicas del cultivo. Con este fin, se desarrollan sistemas de bioreactores encargados de reproducir y garantizar un ambiente que ayude a generar tejidos funcionales para aplicaciones clínicas. En este capítulo se evalúa la posibilidad de escalar un diseño de un bioreactor para el desarrollo de un cartílago articular (diámetro=50 mm). Se predicen los perfiles de fluido en el interior de las cámaras de los bioreactores mediante el uso de modelos numéricos. Las propiedades (permeabilidad del material del andamio (*Hyaff 11*) utilizado para generación del cartílago), fueron sustituidas en la simulación por un valor de viscosidad aparente (η_s) y cuya formulación es desarrollada y validada en este capítulo. Los flujos de fluido para las condiciones del sembrado de los condrocitos y para la fase desarrollo del desarrollo del cultivo fueron calculados. Se determinó que el diseño con múltiples entradas y salidas, lleva a una distribución de fluido más uniforme que el diseño que fue escalado desde una cámara de bioreactor ya existente. Finalmente se muestran los ensayos experimentales desarrollados por la *Universidad Hospital de Basel*, mostrando que experimentalmente la selección realizada fue la adecuada para el desarrollo del nuevo cartílago.

3.1 Introducción

Los estímulos mecánicos dentro del rango fisiológico pueden estimular la síntesis de la matriz extracelular del cartílago y mejorar así las propiedades del tejido desarrollado [73]. Los bioreactores son sistemas que pueden generar estos estímulos mecánicos. Este método es muy ventajoso porque disminuye la probabilidad de contaminación, presentan una buena manejabilidad y permite así una excelente repetitividad para un determinado ambiente de cultivo. Tradicionalmente, los bioreactores son usados en diferentes propósitos: 1) proliferación celular, en pequeña escala (*pacientes individuales*) y en gran escala (*conceptos de terapia alogénica*); 2) generación de tejidos 3D construidos aisladamente y con proliferación celular *in vitro*; 3) aparatos de soporte de órganos [74].

Como es ya conocido, la estimulación mecánica tiene un impacto positivo en la ingeniería de tejido musculo-esquelético, del cartílago y del tejido cardiovascular[30]. El control de las magnitudes y ambientes que se crean en los andamios o en los tejidos están directamente relacionados con los diferentes tipos de diseños de bioreactores existentes. Esta diversidad de bioreactores está relacionada con obtener diferentes regímenes de estimulación(fuerzas de compresión, cortante o de rotación) en los andamios tridimensionales [75] (figura 3.1).Después del sembrado celular se necesita haber obtenido una alta densidad de células distribuidas homogéneamente en el interior de las matrices 3D. Este hecho está

Este capítulo se ha publicado en parte en: *Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing*. Rosaria Santoro, **Andy L. Olivares**, Gerben Brans, Dieter Wirz, Cristina Longinotti, Damien Lacroix, Ivan Martin, David Wendt. *Biomaterials* 31 (2010) 8946-8952.

asociado con un posible aumento de la formación del tejido y con la posible reducción del tiempo de cultivo. Para el caso del cartílago la distribución de las células influye directamente en la formación de la estructura. Una distribución no homogénea de las células en el interior del andamio puede afectar significativamente las propiedades del tejido formado [76]. Los bioreactores de perfusión directa han demostrado experimentalmente que llevan a una mayor eficiencia en el sembrado y en el cultivo respecto a los otros tipos de sistemas *in vitro*[51]. La perfusión consiste en hacer pasar un fluido directamente a través de los poros del andamio. De manera general, los diseños de bioreactores de perfusión son muy similares (figura 3.1c). La primera consideración de diseño para los bioreactores es conocer el tamaño y forma del tejido que se desea reproducir. Pero también es muy importante que todas las células dentro del entramado (tejido-andamio) 3D reciban suficientes nutrientes y que sea efectivo a la hora de eliminar los desechos. Por ejemplo, para cultivos estáticos en andamios de diámetros inferior a 10mm , es conocido que las células sembradas en la periferia crecen fácilmente, sin embargo las que residen en el centro tienden a morir por necrosis [77], [78]. En la tabla 3.1 se resumen algunos de los tamaños de andamios utilizados en bioreactores de perfusión por ingeniería de cartílago y de hueso. Destacar que los diámetros de los cilindros utilizados en estos ensayos se encuentran en un rango desde 5mm hasta 16mm . Estas dimensiones son representativas para aplicaciones maxilofaciales o para realizar un procedimiento quirúrgico similar a la *mosaicoplastia*.

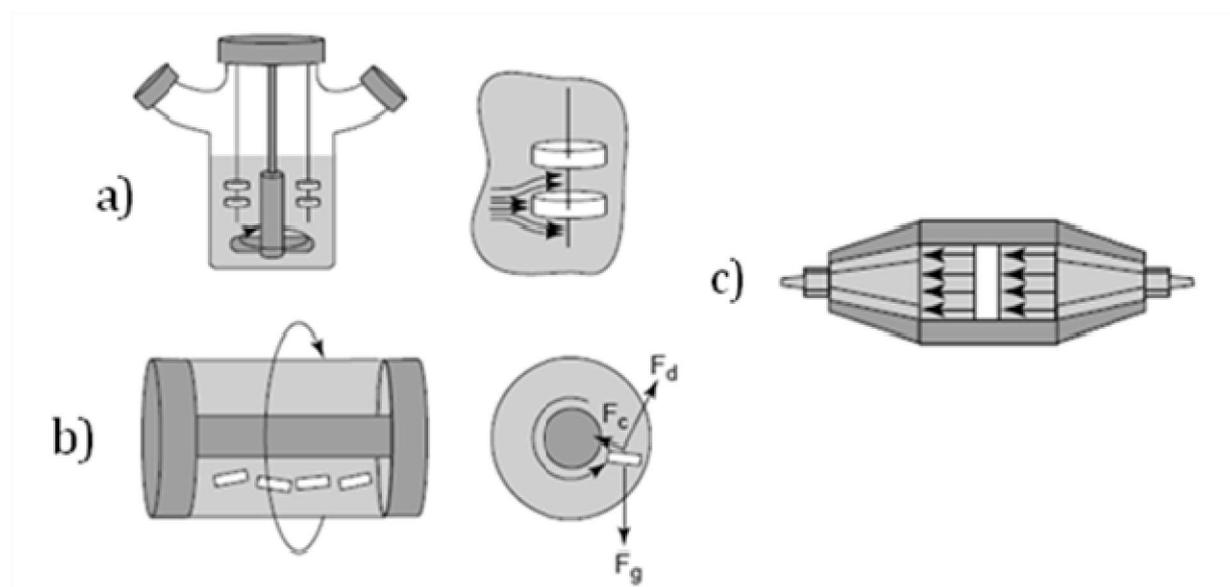


Fig 3.1. Algunos sistemas de bioreactores utilizados en biotecnología a) *Spinner-Flask*: generalmente usado para el sembrado de células en andamios 3D. Las células son transportadas por convección. En la mayoría de las ocasiones se crean turbulencias del fluido que van en detrimento del desarrollo del tejido. b) Rotación de las paredes: proyecta un ambiente dinámico favorable para el crecimiento de tejido mediante tensiones cortantes bajas y altas razones de transferencia de masa. En este caso las paredes están rotando y es importante balancear la fuerza de arrastre (F_d), la fuerza centrífuga (F_c) y la fuerza gravitatoria (F_g), para que no se produzca una caída libre de los andamios. c) Perfusión: El flujo penetra en el interior de los poros de manera directa(modificado de Martin et al. [76]).

Tabla 3.1. Dimensiones de andamios utilizados en bioreactores de perfusión

Material	Células	Dimensiones (diámetro, longitud)	Porosidad	Referencia
Hyaff	Condrocitos	5mm, 4mm	75%	Wendt et al [51]
Hyaff 11	Condrocitos	8mm,4mm	73%	Wendt et al [51]
Espuma Poliactiva	Condrocitos	8mm,4.3mm	75%	Wendt et al [51]
Matriz de PET	Mesenquimales (MSCs)	16mm, 1.2mm	89%	Zhao et al [79]
PLA modificado	Mesenquimales (MSCs)	8mm, 3mm	90%	Alvarez-Barreto[80]
Hueso descelularizado	Mesenquimales (MSCs)	4mm, 4mm	70-80%	Grayson et al [81]
Hyaff 11	Condrocitos	8mm, 4mm	93%	Timmus et al [82]

Ahora bien, como es conocido el cartílago articular es un tejido que presenta una capacidad limitada para autoregenerarse y hasta el momento los tratamientos existentes mediante Carticel[®] o Hyalograft-C[®], solamente se utilizan para la rectificación de los daños traumáticos de manera muy local y no para realizar sustituciones totales [83-85]. Por otro lado, como los valores de diámetros de andamios para ingeniería de tejidos reportados hasta el momento se encuentran muy por debajo de los 50mm de diámetro[86] que son necesarios para recubrir un cartílago en una rodilla con osteoartritis, no se conoce ningún antecedentes de estudios donde se haya intentado generar este recubrimiento *in vitro*.

De aquí que el **objetivo principal** de todo el estudio fue desarrollar un cartílago articular bajo condiciones *in vitro* de dimensiones que permita realizar el recubrimiento total del cartílago de una rodilla humana. El estudio está enmarcado en el proyecto *STEPS* y la tarea particular desarrollada por nuestro grupo fue la de simular y tomar decisiones respecto al diseño de un bioreactor que fuera capaz de crear las condiciones óptimas para el crecimiento del cartílago articular deseado. Basados en los antecedentes en este campo y según los resultados reportados por Wendt et al. en 2003 [50], la tarea inicial es la de escalar un bioreactor ya existente (para andamios de diámetro 8mm) y con el cual se han obtenido resultados satisfactorios en la ingeniería del cartílago (utilizando andamios Hyaff11(ácido hialurónico)) y desarrollar con el nuevo bioreactor escalado un injerto de 50 mm de diámetro.

El estudio presenta en dos partes los resultados obtenidos bajo el **objetivo principal** de obtener un cartílago articular de gran tamaño:

(1) Evaluar numéricamente los diseños de bioreactores propuestos. La característica principal del diseño escalado es que presenta una entrada y una salida de flujo similar a la mayoría de las cámaras de bioreactores existentes. Posteriormente y como consecuencia de los resultados obtenidos en este primer diseño se realiza una nueva propuesta de bioreactor pero esta vez con múltiples entradas de fluido. Para todas las valoraciones de diseño es utilizado el método de Dinámica de Fluido Computacional (CFD). Como criterio a seguir, se determinarán las magnitudes y perfiles de distribución de los flujos que cubren la superficie del andamio (bajo las condiciones de sembrado y cultivo celular). Dentro del método

aplicado se introduce una nueva variante para homogenizar las propiedades del material utilizado (*Hyaff 11*). La formulación para la viscosidad aparente fue verificada para otro material de permeabilidad y porosidad conocida.

(2) En la discusión de este capítulo, se incorporan los resultados experimentales in vitro obtenidos en la Universidad Hospital de Basel, Suiza. Estos resultados dan soporte al hecho de que el bioreactor seleccionado según el estudio numérico es factible para la obtención del cartílago articular.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Hyaff 11

El material utilizado fue el *Hyaff 11* (figura 3.2) que tiene como principal componente el ácido hialurónico (Fidia Advanced Biopolymers) [87]. Un análisis de porosimetría de mercurio realizado en Micrometrics Instrument Corporation, permitió obtener el tamaño promedio de poros, $68\mu\text{m}$, porosidad, $\Phi = 92\%$, y permeabilidad de la muestra $k_{Hg} = 2.13 \cdot 10^{-11} \text{m}^2$. La permeabilidad es una característica que depende de las propiedades del fluido, por esa razón como esta ha sido obtenida para el mercurio ($\rho_{Hg} = 13580 \text{kgm}^{-3}$, $\eta_{Hg} = 0.00159 \text{Pa}\cdot\text{s}$), es necesario recalcularla para el agua ($\rho_{HO_2} = 1000 \text{kgm}^{-3}$, $\eta_{HO_2} = 0.001 \text{Pa}\cdot\text{s}$). Por lo tanto, $k_{HO_2} = 1.81 \cdot 10^{-10} \text{m}^2$ será el valor utilizado para referirnos a la permeabilidad del *Hyaff 11*. En la Ec 3.1, K , es una constante denominada conductividad hidráulica o permeabilidad de Darcy.

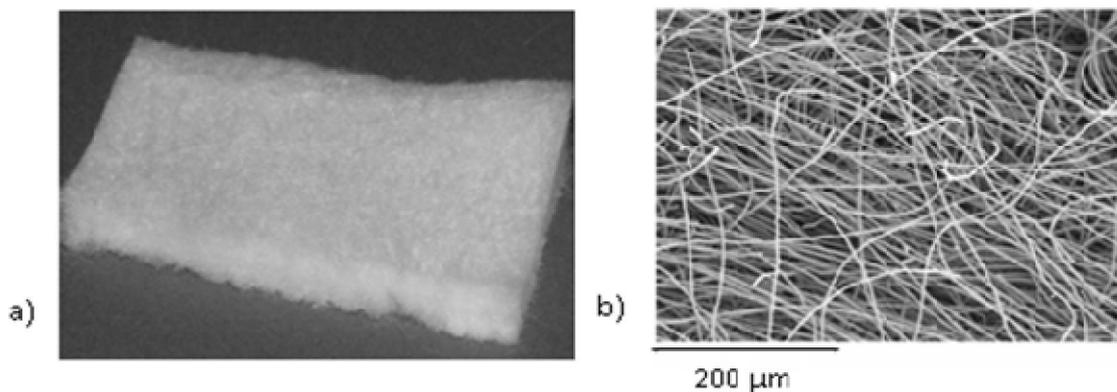


Fig. 3.2 *Hyaff 11* a) fotografía de la apariencia del material, textura suave y esponjosa (espesor 3mm). b) Imagen de microscopía electrónica (SEM) Malla de fibras de ácido hialurónico que conforman la microestructura tipo red de material (escala: 200µm)

$$k_{Hg} \frac{\rho_{Hg}}{\eta_{Hg}} = k_{H2O} \frac{\rho_{H2O}}{\eta_{H2O}} = K \quad (3.1)$$

3.2.2 Modelos de CFD para los diseños de bioreactores

El diseño a escalar fue propuesto por Wendt et al. [50] (figura 3.3a), este diseño es utilizado normalmente en andamios de 8mm de diámetro y 4mm de espesor; la característica crítica de este diseño es que presenta puertos coaxiales en la entrada y salida del flujo. Los diámetros de los tubos de conexión en los extremos son de diámetro $d_T=6mm$. Al cambiar la zona del andamio a $d_A=50mm$, la relación de forma d_A/d_T cambia de $8/6=1.3$ a $50/6=8.3$. Este cambio de sección es un factor importante para el control de los perfiles de velocidad. A partir de los resultados numéricos que se obtuvieron con el diseño descrito anteriormente, se consideró una segunda variante de diseño, esta vez un bioreactor con múltiples entradas y salidas ($n=4$). Este tipo de cámara de perfusión no es habitual.

Para las simulaciones de la geometría del diseño coaxial (diseño escalado), se desarrollo un modelo axisimétrico (total de 1,412 elementos cuadriláteros) (figura. 3.3b). Para la segunda propuesta (múltiples entradas) fue necesario un modelo 3D (total de 129,888 elementos hexaédricos) (figura 3.3c). Los cálculos fueron realizados y procesados mediante *Ansys Fluent*.

Se simulan condiciones de estado estable para un fluido laminar y newtoniano. Las paredes de la cámara del bioreactor fueron asumidas como impermeables y rígidas y con condiciones de no deslizamiento ($u=0mm/s$). Para la salida del fluido se aplicó una presión igual a cero para simular la salida libre del flujo en los bioreactores. En la entrada se aplicaron velocidades en dependencia de la fase de cultivo a simular (sembrado celular o cultivo celular). Para los ensayos de sembrado celular, el flujo fue de 30 mL/min, lo que corresponde con una velocidad en la entrada de 18 mm/s y para el caso del cultivo celular el flujo fue de 12 ml/min, por lo que la velocidad aplicada en la entrada fue de 7 mm/s. En ambas fases de cultivo estos valores de velocidad se dividieron por la cantidad de boquillas de entradas a la cámara del bioreactor. Los sistemas fueron simulados asumiendo dos fases principales. Por una parte la fase del medio del cultivo (densidad, $\rho=1000 \text{ kgm}^{-3}$; viscosidad, $\eta=0.001 \text{ Pa-s}$), que es una fase continua y por otra parte la porción porosa o andamio es representada con un continuo pero donde se utilizó una viscosidad aparente (η_s) para la simulación de la resistencia que opone la estructura porosa al paso del fluido.

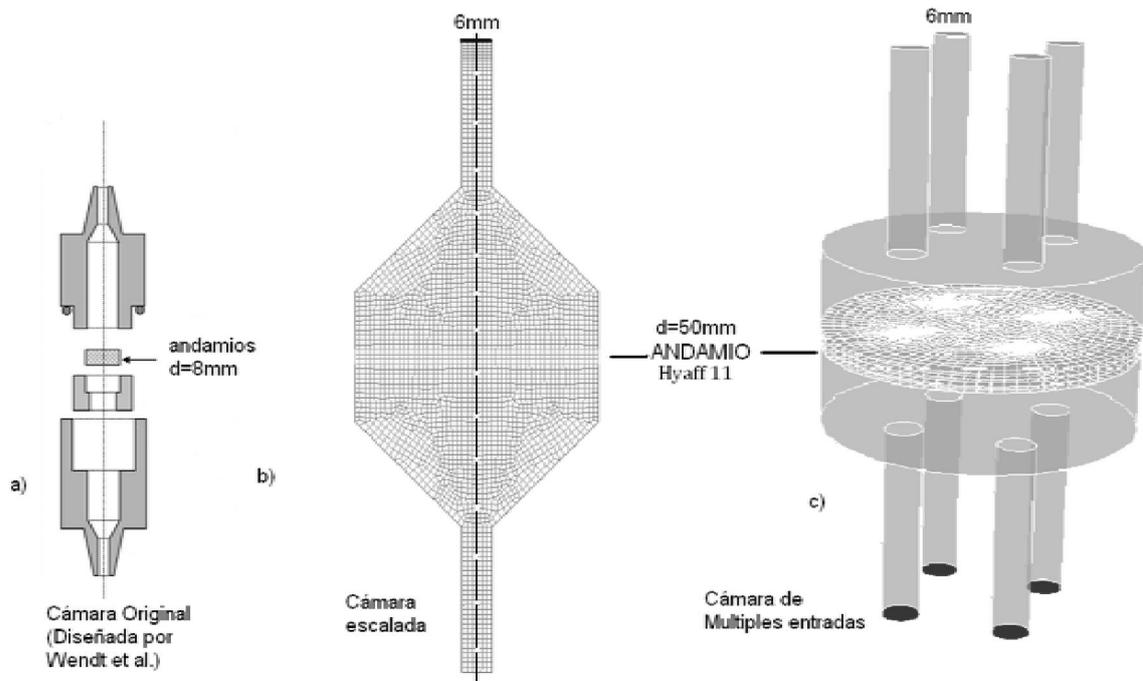


Fig 3.3. Diseños de Bioreactores a) Diseño original de Wendt et al. [50], ($d=8\text{mm}$), utilizado para el escalado. b) Diseño ya escalado para un $d=50\text{mm}$, manteniendo la coaxialidad de la entrada y la salida. Se representa el modelo axisimétrico y la malla de cuadriláteros. c) Diseño múltiples entradas ($n=4$), modelo tri-dimensional y representación de la malla hexaédrica sobre la zona que representa el andamio ($d=50\text{mm}$, $s=3\text{mm}$).

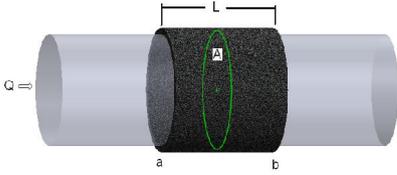
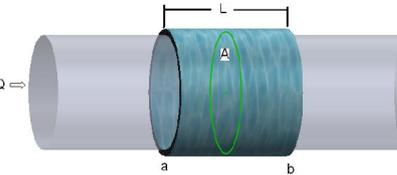
3.2.3 Ecuación de viscosidad aparente

Para obtener la ecuación de la viscosidad aparente es necesario describir brevemente las dos principales leyes que se tienen en cuenta. La primera es la Ley de Darcy (Ec. 3.2) (ver esquema (1) tabla 3.2); utilizado para la descripción del flujo de un fluido a través de un material poroso. El flujo total, Q_D es igual al producto del radio del poroso, la permeabilidad intrínseca del material, k (m^2), el área efectiva de la sección transversal al flujo, que corresponde al área total, A , multiplicada por la porosidad, Φ , y la diferencia de presiones ($p_a - p_b$) entre dos puntos (a, b); todo esto dividido por la longitud entre los puntos de presiones y la viscosidad del fluido η_F . Es necesario para indicar que el flujo se mueve desde presiones altas hacia presiones bajas. En el caso representado en la tabla 3.2, caso (1), la presión $p_a > p_b$, y por tanto el flujo será positivo en la dirección positiva del eje del tubo. El segundo principio utilizado fue el de la Ley de Poiseuille (Ec.3.3), que permite determinar la magnitud de un flujo laminar estacionario Q_P de un líquido incompresible y uniformemente viscoso (fluido newtoniano), que pasa a través de un tubo cilíndrico de sección circular constante A (ver esquema (2) de tabla 3.2). Además este flujo dependerá del cuadrado del radio del cilindro, r , y de igual manera depende de la diferencia de presiones ($p_a - p_b$), de la distancia entre estos puntos (a, b) y de la viscosidad del fluido, η_s , que será la que imitará la resistencia que opone el material poroso.

La viscosidad físicamente representa la oposición de un fluido a las deformaciones tangenciales, siempre que el líquido este en movimiento. Igualando los flujos Q_D , (Darcy) y Q_P (Poiseuille), se puede hallar una equivalencia entre la resistencia que opone el andamio y la resistencia que opone un fluido viscoso, todo esto a través de una ecuación para determinar la viscosidad aparente, η_s , resultando en:

$$\eta_s = \frac{r^2 \eta}{8 \phi k} \quad (3.4)$$

Tabla 3.2 Ecuaciones y esquemas de los principios físicos utilizados para hallar la ecuación de la viscosidad aparente η_s .

Ley de Darcy. -Ec. (3.2)-	<p>(1)</p> 
$Q_D = k \frac{r(p_a - p_b)}{L \eta_F} A \Phi$	
Ley de Poiseuille. -Ec. (3.3)-	<p>(2)</p> 
$Q_D = \frac{r^2 (p_a - p_b)}{8 L \eta_s} A$	

3.2.3.1 Verificación de la ecuación viscosidad aparente

Un análisis simple de la validez de la ecuación fue realizado para un andamio de permeabilidad conocida. Partiendo de los resultados obtenidos por Charles-Harris et al.[88] en andamios de PLA-G5 (figura 3.4a), se simuló la geometría del andamio mediante CFD, (diámetro=6mm; longitud=12mm), usando elementos hexaédricos (figura 3.4). Los datos de porosidad $\Phi=95\%$ y permeabilidad $k=8.1 \cdot 10^{-11} \text{m}^2$ reportados, fueron medidos por Charles-Harris et al. [88], mediante el uso de un permeámetro donde se hizo fluir H_2O ($\rho_{\text{H}_2\text{O}}=1000 \text{kgm}^{-3}$, $\eta_{\text{H}_2\text{O}}=0.001 \text{Pa}\cdot\text{s}$), a una velocidad de $v=1 \text{mm/s}$.

Según la ecuación de viscosidad aparente, estas propiedades del material poroso pueden ser sustituidas con un valor de viscosidad de $14.61 \text{Pa}\cdot\text{s}$. Para la verificación del método se comparan las diferencias de presiones calculadas por Charles-Harris et al. [88], mediante el uso de la ecuación de Darcy y las diferencias de presiones calculadas mediante el modelo de CFD creado con la nueva formulación.

$$\eta_s = \frac{r^2 \eta_{\text{H}_2\text{O}}}{8 \phi k} = \frac{(0.003)^2 \cdot 0.001}{8 \cdot 8.1 \cdot 10^{-11} \cdot 0.95} = 14.61 \text{Pa}\cdot\text{s}$$

Bioreactor de Perfusión para Cartílago Articular

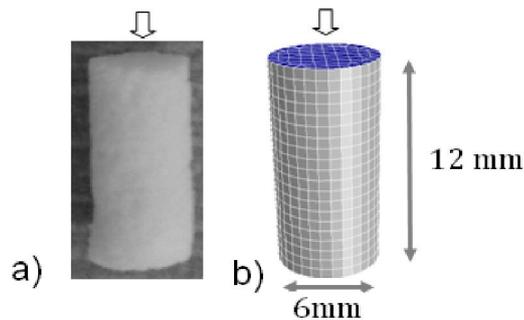


Fig 3.4 Andamios PLA-G5 utilizados para la verificación. a) Fotografía de Andamio. b) Modelo de CFD del andamio, se muestran las dimensiones del cilindro (diámetro=6mm, longitud=12mm).

3.2.4 Experimentación in vitro realizada por la Universidad de Basel

En este epígrafe se darán algunos detalles de la instalación donde se realizó la experimentación in vitro (Universidad de Basel), debido a que se hace referencia a estos resultados en la discusión del capítulo. Ambos diseños iniciales fueron propuestos por *Applikon Biotechnology*, empresa que se dedica a la fabricación de equipos de bioprocesos. Después de la selección del mejor diseño, la cámara del bioreactor fue finalmente fabricada de acero inoxidable AISI 316L electro pulido (*Applikon Biotechnology BV*, Holanda) (figura 3.5a). En el esquema de la figura 3.5b se muestra el andamio (1) fijado por los contornos mediante unos anillos de teflón (2) de 1 mm de ancho a partir de la periferia del andamio y un espesor de 3 mm. El andamio es ubicado entre dos mallas metálicas rígidas (3) de forma intercalada para proporcionar mayor soporte y estabilidad mecánica y prevenir que el andamio no sea arrastrado por las fuerzas hidrodinámicas (figura. 3.5b). Finalmente el ensamble es cerrado entre la parte superior (4) e inferior (5) de la cámara del bioreactor.

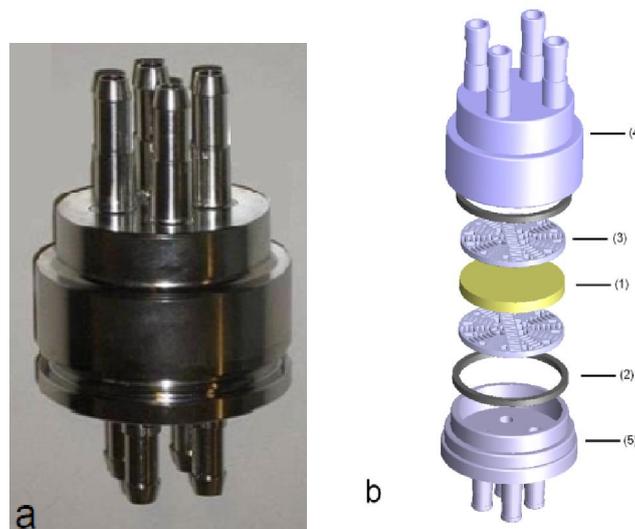


Fig 3.5 (a) Cámara del bioreactor de perfusión fabricado por Applikon Biotechnology BV, Holanda. (b) (1) Andamio de Hyaff-11 de (50 mm diámetro y 3 mm de espesor) (2) Anillos de teflón para el ajuste en la periferia del andamio (3) Malla de acero inoxidable que provee de soporte mecánico a el andamio durante el sembrado y el cultivo, (4) pieza superior y (5) pieza inferior de la cámara del bioreactor.

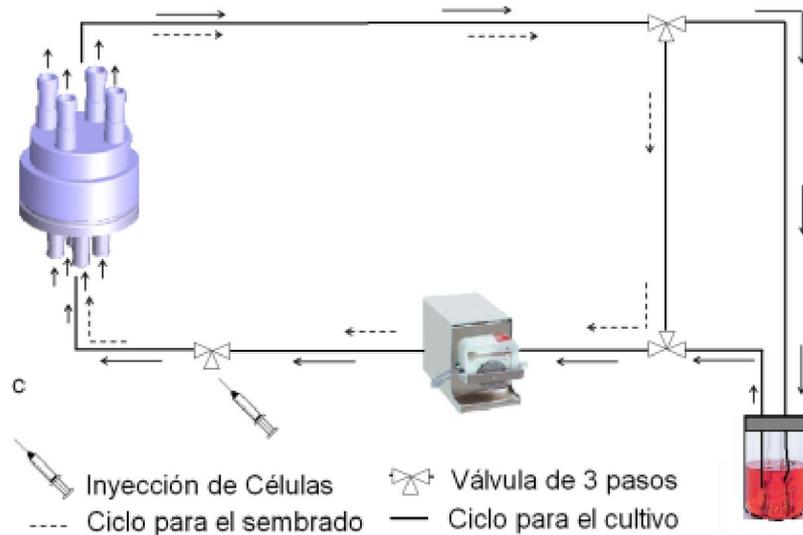


Fig 3.6 El sistema del bioreactor fue diseñado para la perfusión inicial de las células en suspensión (ciclo de sembrado) y posteriormente el cultivo de perfusión [50], [51].

La cámara fue integrada al sistema del bioreactor como se muestra en la figura 3.6, donde además se incluyen las trayectorias del fluido para las fases de sembrado y cultivo celular. En el sembrado celular aproximadamente $2.0E+08$ Condrocitos Articulares Humanos (HAC) fueron suspendidos en 90 mL de medio de cultivo. Se sembraron las células bajo perfusión a razón de 30 ml/min durante 16 h. Posteriormente en otra muestra ya sembrada se realizó el cultivo de perfusión en el bioreactor a razón de 12 ml/min durante un periodo de dos semanas para la generación del injerto cartilaginoso. En paralelo y a modo de control del cambio de diseño de bioreactor se han evaluado dos andamios a escala de investigación utilizando el sistema de bioreactor desarrollado previamente [50].

3.3 Resultados

3.3.1 Verificación de la ecuación de viscosidad aparente

Para la verificación de la formulación de viscosidad aparente (Ec. 3.3), se calculó la diferencia de presión que se obtiene mediante la Ley de Darcy, durante la filtración de agua a una velocidad de 1mm/s para el andamio de PLA-G5[88].

$$\Delta p = \frac{Q_D \cdot \eta_F \cdot L}{k \cdot A} = \frac{v \cdot \eta_F \cdot L}{k} = \frac{0.001 \cdot 0.001 \cdot 0.0012}{8.1 \cdot 10^{-11}} = 148 Pa \quad (3.5)$$

Simulando el andamio para la viscosidad aparente ($\eta_s=14.61$ Pa-s), del material PLA-G5 son mostrados la figura 3.7. La distribución de las velocidades en el interior del andamio es como se muestra en la figura 3.7b, se muestran valores máximos de velocidad de 1.92mm/s. La diferencia de presión calculada mediante la simulación es de aproximadamente 150Pa, como es representado gráficamente en la figura 3.8 (puntos dentro del recuadro verde).

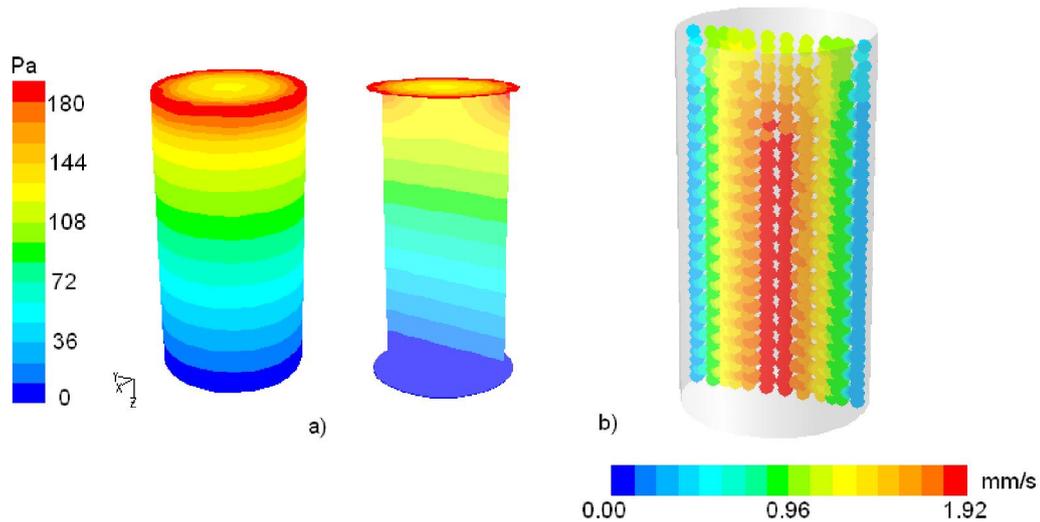


Fig 3.7. Simulación de CFD para andamio de PLA_G5, utilizando viscosidad aparente $\eta=14.61$ Pa-s, correspondiente a las propiedades morfológicas del material. (a) mapa de colores que representa la distribución de presiones en el andamio, además se muestra la misma distribución en el interior a través de un plano que pasa por el centro del andamio. (b) Magnitud de las velocidades, representadas a través de esferas en el plano central del andamio.

En la figura 3.8 se puede observar como el fluido se desarrolla a partir de los 1.2mm de altura y llega a mantener un comportamiento totalmente uniforme para la velocidad a partir de los 4mm de altura. El valor de presión calculado por la simulación es equivalente al calculado analíticamente (Ec.3.5), por lo que la ecuación de viscosidad aparente es aplicable al estudio de los bioreactores, permitiendo homogenizar y simplificar el comportamiento del fluido en el interior de un material poroso.

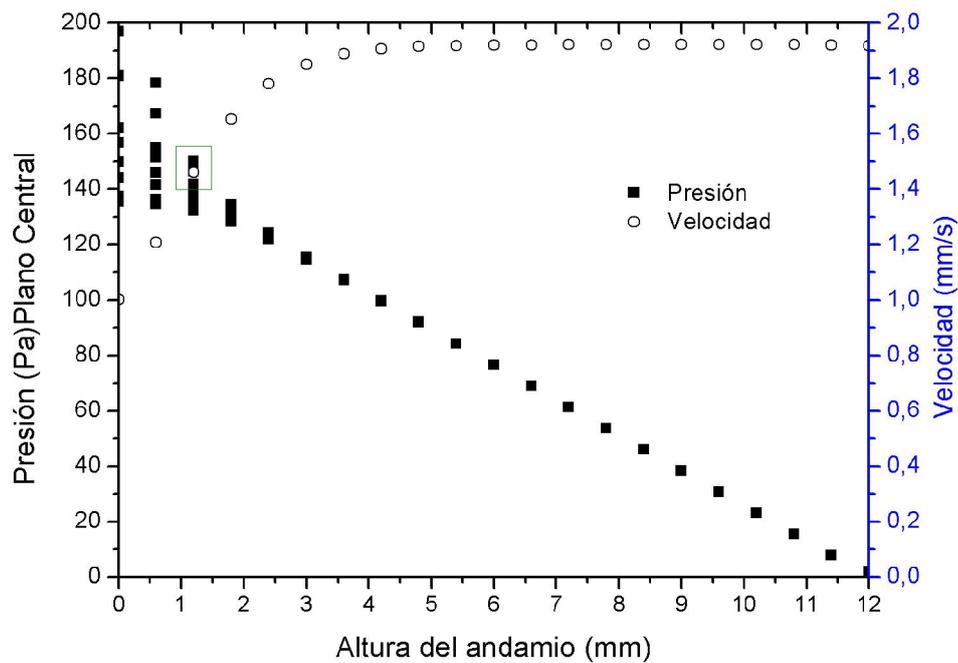


Fig 3.8. Presiones y velocidades distribuidas en la altura del andamio. Se muestra como el fluido se desarrolla a partir de una altura de 1.2mm aproximadamente.

3.3.2 Modelos de CFD para los diseños de bioreactores

Después de haber verificado la validez física de la ecuación, aplicamos la viscosidad aparente que simule el comportamiento del Hyaff11 y así realizar el estudio correspondiente de los diseños de los bioreactores. Se calculó la viscosidad aparente ($\eta_s=469$ Pa.s) con la cual se simularon los andamios de diámetro, $d=50$ mm y espesor $e=3$ mm.

$$\eta_s = \frac{r^2 \eta_F}{8 \phi k} = \frac{(0.025)^2 \cdot 0.001}{8 \cdot 1.81 \cdot 10^{-10} \cdot 0.92} = 469 Pa.s$$

Mediante los análisis de CFD, las magnitudes y perfiles de las velocidades del fluido para el sembrado y el cultivo celular son calculados y representados mediante mapas de colores como se muestran en la figuras 3.9 y 3.10. Las simulaciones prevén que para el diseño inicial (puertos coaxiales) las distribuciones del flujo no será homogénea (figuras 3.9a y 3.10a). En las condiciones de la fase de sembrado celular se muestran valores máximos de velocidad de 31mm/s y para la fase de cultivo valores máximos de 12.6mm/s. En la entrada del andamio según el mapa de colores se crea la magnitud de la velocidad que va desde valores muy altos en el centro y que va disminuyendo hacia la periferia del andamio. Este comportamiento se muestra bajo ambas condiciones (figuras 3.9a y 3.10a). El número de Reynolds máximo calculado está alrededor de 30, por lo que nos encontramos en un régimen laminar para la zona del continuo (medio de cultivo). Para la zona del andamio, donde la viscosidad es elevada el valor de Reynolds máximo es de ≈ 6 en el centro del andamio que corresponde con un régimen entre laminar-turbulento (1-10) dentro de un material poroso (régimen de Darcy).

Por otro lado, se observa como mediante la cámara de bioreactor de cuatro puertos se obtiene una distribución del fluido más uniforme para ambas condiciones experimentales (figuras 3.9b y 3.10b). Los valores máximos calculados son de 8.8 mm/s para la condición de sembrado y de 3.5 mm/s para la condición de cultivo. Se calcula el número de Re (máx.)=4, por lo cual el régimen es laminar bajo las condiciones de sembrado celular; y en la zona del andamio el $Re=0.5$ (laminar en régimen de Darcy).

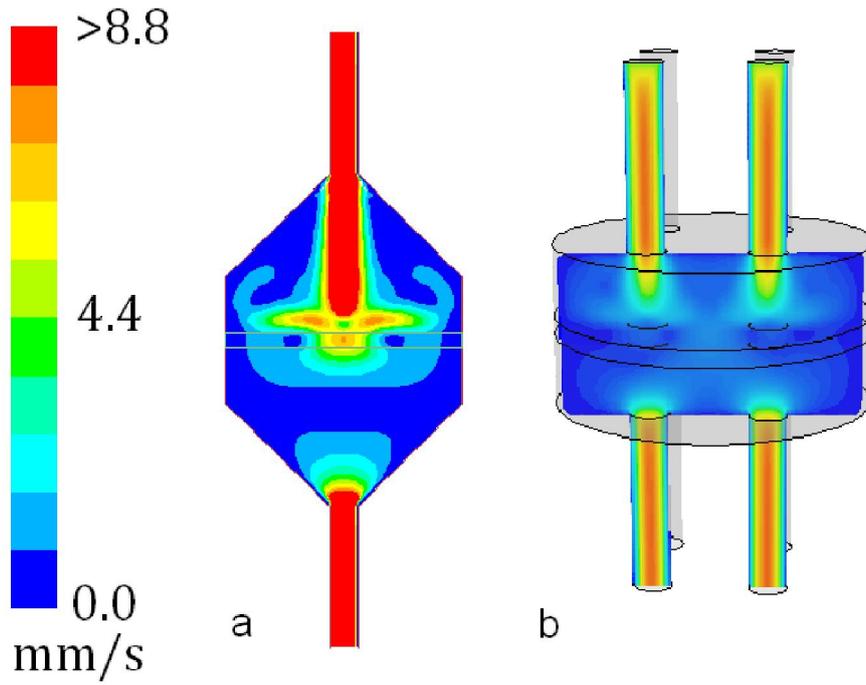


Fig 3.9. Flujo de fluido para ambos bioreactores bajo las condiciones de sembrado celular ($Q=30\text{ mL/min}$). a) el diseño de una entrada. b) bioreactor de múltiples entradas.

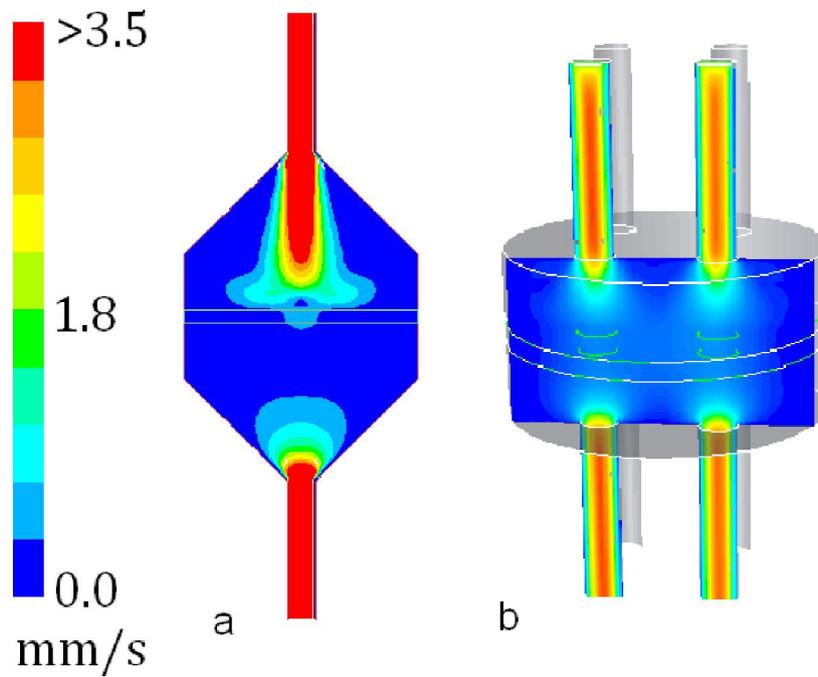


Fig 3.10. Distribución del flujo de fluido para ambos bioreactores bajo las condiciones de cultivo ($Q=12\text{ mL/min}$). a) diseño de una entrada. b) bioreactor de múltiples entradas.

Se grafica la distribución de la magnitud de la velocidad en la dirección radial (25 mm) para todos los nodos del andamio (figuras 3.11 y 3.12). Se observa como para ambos bioreactores las distribuciones de las velocidades tienden a decrecer hacia la periferia del andamio. No obstante bajo ambas condiciones el bioreactor de cuatro entradas muestra una distribución más homogénea de las magnitudes de velocidad que la obtenida para el bioreactor escalado (una entrada).

Durante el sembrado celular se muestra un pico de 7mm/s en el centro del andamio, que podría provocar que las células no puedan adherirse, mueran, o por el contrario que la mayor cantidad de células tiendan a moverse por donde existe mayor flujo. De cualquier manera la distribución de las células no se garantiza uniforme en este bioreactor. Al disminuir la velocidad para realizar el cultivo celular en este mismo diseño, se observa como existe una tendencia a acercarse las magnitudes de las velocidades del centro y la periferia. Esto es debido a que el flujo tiene más tiempo a distribuirse laminarmente, no obstante se muestra también el pico en el centro y se hacen mucho más visibles las alteraciones de flujo de fluido que ocurren en los 7.5mm aproximadamente.

Estas son las razones por las cuales hemos seleccionado el bioreactor de múltiples entradas para la creación in vitro de un cartílago articular de gran tamaño. Este segundo bioreactor al tener una distribución más homogénea del fluido distribuirá de manera más uniforme las células en el sembrado, los nutrientes y oxígeno durante el cultivo. Además como se observó en la figura 3.11, los valores de velocidad sobre el andamio (máximos valores) están entre 1mm/s y 1.5mm/s en 15mm del radio del andamio.

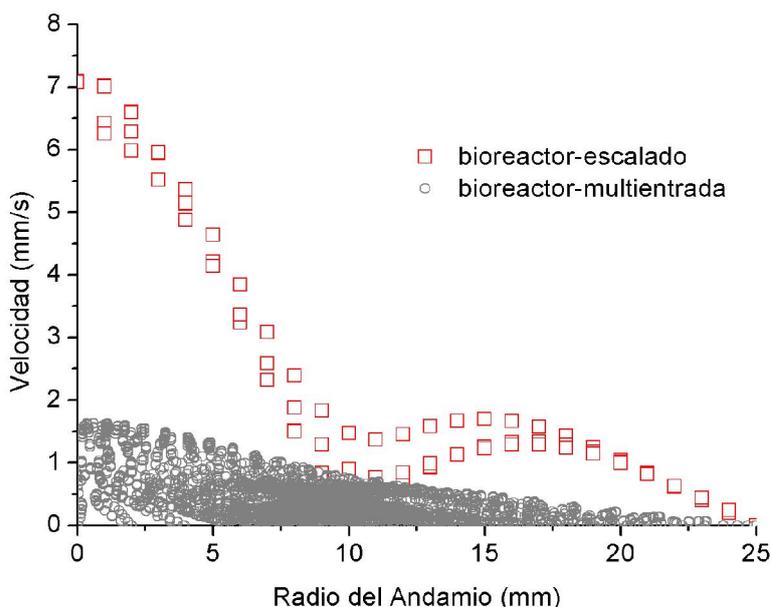


Fig 3.11. Distribución de velocidades en los todos los nodos del andamio usando el bioreactor escalado y el diseño múltiples entradas durante la *fase de sembrado*.

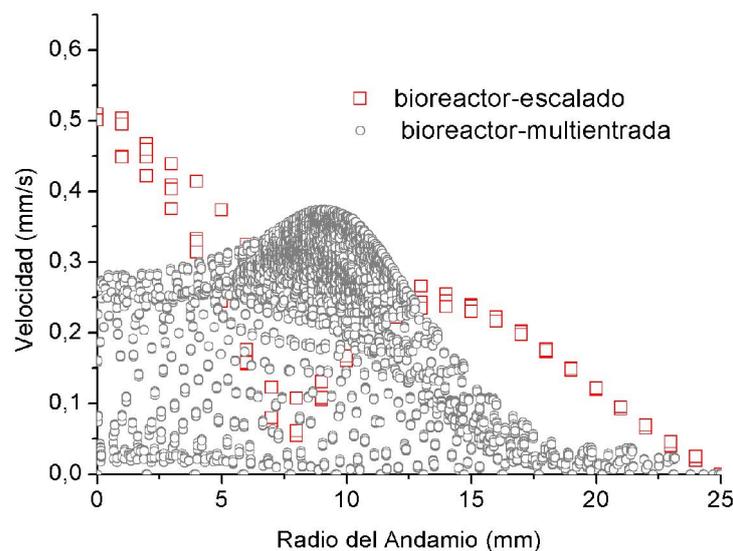


Fig 3.12. Distribución de velocidades en los todos los nodos del andamio usando el bioreactor escalado y el diseño múltiples entrada durante la *fase de cultivo*.

3.4 Discusión

Un sistema inmune artificial como lo constituyen los bioreactores, son sumamente complejos y se necesita entender los aspectos biológicos, bioquímicos e ingenieriles, ya que estos mejoraran significativamente las propiedades del tejido que se construirá [89]. En este capítulo se ha seleccionado un bioreactor teniendo en cuenta la uniformidad del flujo de fluido que este crea en el andamio. El aspecto ingenieril del diseño del bioreactor se ha vinculado a la distribución de las células y a las magnitudes y distribución del fluido en los andamios. Como se ha observado el bioreactor de cuatro puertos de entradas y salidas, suaviza y homogeniza el flujo donde están las células para ser sembradas y donde están los nutrientes, oxígeno y estímulos que llegan a las células después de ser cultivadas. Una parte importante de los modelos para llegar a esta selección lo constituyó el desarrollo de una formulación para la simulación del material poroso dentro del análisis de CFD. La ecuación de un fluido de alta viscosidad, depende de parámetros como las dimensiones del andamio, las propiedades del líquido que se hace filtrar, así como la porosidad y la permeabilidad del andamio. Esta formulación ha sido verificada con ensayos experimentales según el análisis que se ha realizado en este estudio. Otro ejemplo de esta ecuación lo podemos encontrar en el estudio de Sandino y Lacroix (2010)[65]. Aunque no se aplica exactamente la ecuación de Poiseuille y se aplica la ecuación de Newton y de igual manera se igualan los flujos y se obtiene una ecuación similar. En este caso la formulación fue aplicada para la simulación de las propiedades de los tejidos biológicos, las cuales van cambiando durante la diferenciación de las células dentro de un andamio de CaP, con una geometría irregular. En nuestra opinión las diferencias

encontradas por Sandino y Lacroix al aplicar diferentes condiciones de contornos están en que hay que tener en cuenta el volumen de cada elemento para calcular una viscosidad que es necesaria para representar ese tejido en ese volumen. De esta manera volver a señalar que la viscosidad aparente depende del cuadrado de las dimensiones a simular, por lo que este parámetro es sumamente importante.

A pesar de las ventajas que nos puede proporcionar esta formulación, ya que nos permite la simplificación de la estructura del andamio, homogeneizándola y asumiéndola como si estuviera totalmente saturada, físicamente tiene sus limitaciones. Los valores de las presiones y velocidades en la entrada y la salida del andamio fueron los verificados, pero los valores en el interior de los poros son promediados. Pero es necesario tener en cuenta la morfología del poro de los andamios y sobre todo la tortuosidad y tamaño de sus poros. La tridimensionalidad de los andamios hace que se creen a nivel de los poros perfiles de velocidades que serán los que estarán actuando realmente sobre las células que están adheridas. La matriz celular en general es un aspecto importante para la comunicación con las células, es necesario tener en cuenta las propiedades mecánicas y como las células interpretan la bioquímica del ambiente que la rodea. No obstante, las magnitudes hidrodinámicas de entrada y salida pueden ser un eslabón importante entre los análisis a nivel de bioreactores y los análisis a nivel de las microestructuras del andamio.

El sembrado celular de los andamios es un aspecto importante para establecer un cultivo 3D en un andamio macro poroso. Una alta densidad de células en el sembrado, pero también una distribución homogénea de las células dentro del andamio son fundamentales [90], [91]. Las velocidades máximas calculadas en el bioreactor escalado es elevada con respecto a las velocidades reportadas para el uso de bioreactores de perfusión experimentales (escala menor) [51], [92] y reportadas para el sembrado celular. En este punto también pensamos que juega un papel fundamental el hecho de que las dimensiones del andamio (50mm) que se está estudiando es mucho más grande que los normalmente usados y por lo tanto es necesario mantener aproximadamente una distribución constante del flujo, la distribución se dificulta para mayores dimensiones. Hutmacher et al [53] plantearon el potencial que presentarían las simulaciones del flujo de fluido para la caracterización 3D de los campos de flujo en los bioreactores y como esto permitirá mejorar las aproximaciones y aumentar la eficiencia de los sistemas de bioreactores, esta afirmación se pone de manifiesto en este estudio donde se realizó la selección de un bioreactor capaz de proporcionar las condiciones adecuadas al andamio. Otros ejemplos de aplicación del CFD en la caracterización del transporte de masa pueden ser encontrados en la literatura [93-95], pero la relación resultados numéricos y biológicos son obviados o de difícil obtención.

El estudio presenta un soporte experimental realizado en el bioreactor seleccionado (figura 3.5a) y se realizan una serie de ensayos bioquímicos, mecánicos y clínicos que pueden ser vistos en más detalles en Santoro et al. [52]. De aquí se debe resaltar que el estudio de CFD realizado disminuyó el costo total del estudio permitiendo el ahorro de células, material, la fabricación del otro bioreactor y tiempos de ensayos. Primero que todo, se muestra en la figura 3.13 la distribución homogénea de las células en los andamios mediante el uso del bioreactor de cuatro entradas, se usa el mismo protocolo experimental que se usa para

las muestras de experimentación en el laboratorio [51]. La ausencia de colorante en la periferia del andamio confirma que la fijación fue efectiva y concuerda con lo observado en la simulación CFD donde las velocidades se acercan a cero en la periferia garantizando la no existencia de fuga de fluido por los bordes de la muestra.

Después de las dos semanas de cultivo se muestra que macroscópicamente el injerto obtenido presenta similar apariencia que el tejido a escala de laboratorio a pesar de que es 70 veces más grande (figura 3.14a, b). Los injertos obtenidos son consistentes y rígidos, además de manejables mediante el uso de pinzas (figura 3.14c). Se muestra como presentan suficiente flexibilidad (figura 3.14d), lo cual sugiere el potencial que han de tener a nivel quirúrgico para el recubrimiento de un cóndilo.

Aplicando un periodo corto de cultivo (2 semanas), el injerto de 50mm tiene un 20% del valor de retención de la sutura y de un 5-10% del valor del módulo de un cartílago articular natural. Es de considerar que incrementando el tiempo de cultivo u optimizando las condiciones de cultivo (suplementos en el medio; razón de flujo; tensión de oxígeno) debería incrementarse la madurez del injerto. Sin embargo, un tejido más desarrollado y con propiedades mecánicas superiores, puede que no sea tan manejable y moldeable a los contornos de una rodilla, y por lo tanto sería necesario aplicar la ingeniería de tejido pero en una forma predefinida. En este caso, la estrategia seguida como esquema en este estudio puede servir para fundamentar el diseño de un bioreactor para el sembrado y el cultivo de injertos con una forma anatómica definida.

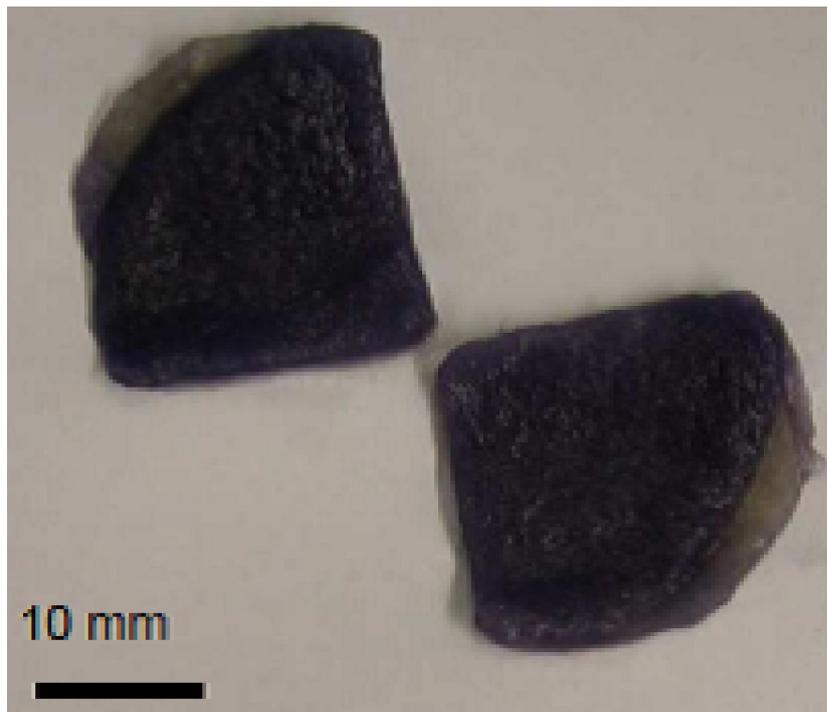


Fig 3.13. Dos secciones de mallas teñidas con MTT después del sembrado celular. La no presencia de colorante en periferia del andamio (1mm) indica la efectividad del anillo.(Santoro et al. [52])

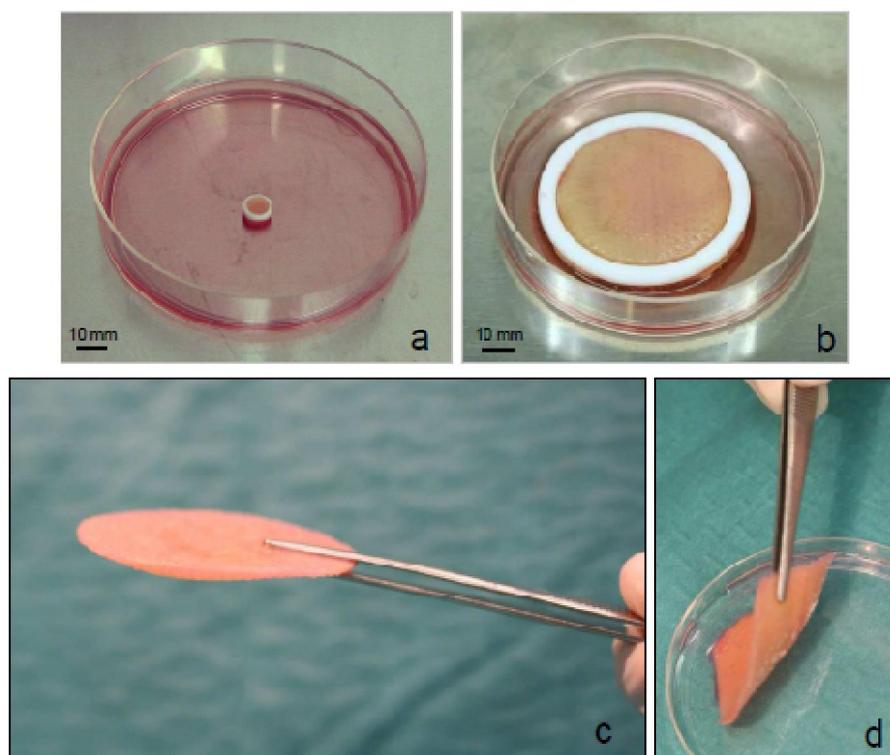


Fig 3.14. Vistas macroscópicas del cartílago articular (realizado por la Universidad de Basel) (a) construcción de cartílago a escala de laboratorio (6mm de diámetro) comparado con (b) construcción a escala grande (50mm de diámetro) después de dos semanas de cultivo (c) el tejido generado en el bioreactor fue bastante rígido y es fácilmente manejable mediante pinzas y no se flexiona por su mismo peso (d) Sin embargo, el injerto fue bastante flexible, suficiente para ser flexionado con las pinzas y podría ser moldeado a los contornos de la rodilla humana. Santoro et al. [52]

Existen antecedentes de que el Hyaff 11 (2cm x 2cm x 0.15cm) provee de mejoras clínicas para los injertos de cartílago en pacientes jóvenes cuando se trata de defectos focales en el cartílago [96]. Mientras los tamaños de injertos que se necesiten sean pequeños es posible utilizar procesos convencionales (estáticos y manuales) para el sembrado y cultivo celular, con el estudio presentado se corrobora que la perfusión mejora la calidad de los injertos de cartílago para volúmenes grandes [52]. El estudio ha sido consecuente con trabajos anteriores que plantean que la perfusión lleva a mayor viabilidad, homogeneidad y calidad de las construcciones [50][97][51]; pero se ha demostrado que el diseño de la cámara es un factor determinante. La ampliación del tejido 70 veces (de un volumen de 0.085 cm^3 a uno de 5.9 cm^3) llevo a similar calidad, mediante el uso del bioreactor diseñado, mostrando el potencial que ofrece la perfusión para obtener una mejor penetración y distribución de las células. Por otro lado, es conocido que el oxígeno que se suministra es particularmente crítico y que normalmente penetra en una capa de $100\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$, por difusión, de ahí otra importancia de la perfusión [98]. Aunque los resultados son alentadores con el bioreactor seleccionado pensamos que en trabajos futuros se puede optimizar más las condiciones en el bioreactor si se incrementa el número de entradas y salidas y si se varía la altura de la cámara, además de cambiar el flujo de entrada. Estas variaciones deben disminuir el valor de la velocidad que llega a la zona del andamio y al mismo tiempo incrementar la posibilidad de que el flujo se

disperse antes de llegar al andamio. Creemos que la formulación para simular el andamio es aplicable a cualquier material y a cualquier condición de perfusión de las aplicadas hasta el momento, siempre teniendo en cuenta las limitaciones expuestas anteriormente.

3.5 Conclusiones

En este capítulo se han estudiado dos diseños de bioreactores para la generación de injertos de cartílago humano. Las simulaciones mediante CFD fueron empleadas durante la toma de decisiones en cuanto al diseño del bioreactor adecuado, buscando la generación de un flujo de fluido más homogéneo. Hasta el momento y según lo reportado en los artículos revisados, se cree que es el primer reporte en ingeniería de cartílago humano relacionado con la generación de injertos de gran tamaño. Los estudios mediante modelos CFD para la selección de diseños de bioreactores; disminuyen tiempo y costes. Los valores de velocidad de entrada (0.1-1.5mm/s) para ambas condiciones son reportados en los modelos numéricos para el bioreactor seleccionado, se puede decir que estas velocidades han sido efectivas para la generación del cartílago que se muestran en los ensayos experimentales. Sin embargo es necesario el estudio de los efectos que tienen los estímulos en las células en dependencia de la estructura y material del andamio.

Capítulo 4: Influencia de la morfología de los andamios y optimización de las condiciones de cultivo en ingeniería de tejido

Resumen Los andamios utilizados en ingeniería de tejido proveen de soporte mecánico de manera temporal durante la regeneración del tejido, encargándose además de transferir las cargas mecánicas globales como estímulos mecánicos para las células a través de su arquitectura. En este capítulo se estudia la interacción entre diferentes morfologías de poros, estímulos mecánicos y condiciones de cultivos externas. Diseños de andamios con forma giroide y prisma hexagonal con porosidades de 55% y 70% se analizaron aplicando condiciones de flujo de fluido de perfusión o deformaciones de compresión axial. Los estímulos mecánicos iniciales fueron vinculados a la respuesta de diferenciación celular mediante una teoría de mecano regulación. Los resultados indican que las arquitecturas giroide llevan a una mejor accesibilidad del fluido, la cual puede generar una mayor eficiencia durante el sembrado celular. Además, según la teoría de mecano-regulación se determinó que el proceso de diferenciación fue más sensitivo a la aplicación de flujos de fluidos, que al empleo de las deformaciones axiales sobre el andamio.

4.1 Introducción

Los estímulos mecánicos afectan los procesos biológicos como son la proliferación y la diferenciación celular, jugando de esta manera un rol importante durante la selección y el desarrollo de andamios funcionales para la ingeniería de tejidos. Los andamios tridimensionales (3D) imitan la función de la matriz extracelular y sirven como soporte a las células para que estas se adhieran, proliferen y diferencien. Experimentalmente se ha demostrado que la distribución inicial de las células después de la fase de sembrado está vinculada con la distribución final del tejido creado [76], [99]; sugiriendo que a partir de un sembrado uniforme, se pueden establecer las pautas para la generación de un tejido uniforme [50].

Los andamios obtenidos mediante métodos tradicionales de fabricación presentan por lo general una morfología de poros irregular. Se ha demostrado que esta irregularidad induce a una distribución heterogénea de los estímulos mecánicos y contribuyen a que la distribución del tejido sea no uniforme [36], [100]. Mediante novedosas técnicas de fabricación como pueden ser los métodos de prototipado rápido, es posible fabricar andamios de morfologías controladas, uniformes y repetibles en 3D [101], [102].

La selección de un diseño óptimo de andamio ha sido el objetivo de muchos investigadores en el área de ingeniería de tejidos [46], [49], [103]. Mediante la combinación de los métodos de fabricación de

Este capítulo ha sido publicado en parte en: *Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering*. **Andy L. Olivares**, Elia Marsal, Josep A. Planell, Damien Lacroix. *Biomaterials* 30 (2009) 6142-6149.

prototipado rápido y los modelos computacionales se hacen más viable la posibilidad de validación y optimización de una estructura para el andamio. En una estructura porosa como suelen ser los andamios, los principales parámetros microestructurales que destacan son: el tamaño de poro, la interconectividad de los poros, la porosidad y la forma del poro [46], [48], [54]. La comprobación biológica-experimental es complicada para medir los estímulos mecánicos específicos que sienten las células ya adheridas o por adherirse en el andamio tridimensionalmente. Esta es una de las razones principales por la cual aún no existe una relación bien definida entre la arquitectura del andamio, las condiciones mecánicas y la respuesta biológica.

Los andamios transmiten las señales mecánicas desde una escala macroscópica (condiciones *in vitro*), a través de toda su estructura hasta llegar a una escala microscópica (célula). La arquitectura del andamio funciona como simulador de la síntesis del tejido, regulando el fenotipo celular y las propiedades del tejido formado. En ingeniería de tejido óseo tradicionalmente se aplican cargas de compresión, tracción o torsión como estimuladores de la formación del tejido [45]. Por lo tanto es necesario un control de las propiedades mecánicas del andamio, las cuales a su vez se ven afectadas por el diseño, distribución y tamaño de los poros.

Hollister [47] propuso algunas consideraciones a tener en cuenta para el diseño de andamios regulares. Primero prever la disponibilidad tecnológica para fabricar el diseño de poro propuesto debido a que el método de prototipado rápido está directamente relacionado con las propiedades físico-químicas del biomaterial. Después de conocer la disponibilidad y posibilidades de fabricación entonces se estudian fundamentalmente la permeabilidad y las propiedades mecánicas del andamio en dependencia de la forma y la porosidad del andamio [47], para esto se sugiere la aplicación de modelos tratados en multiescala y donde se aplica la teoría de la homogenización trasladando las propiedades de la microestructura a las propiedades macroestructurales [48].

Por otro lado, los sistemas de flujo de perfusión usados en cultivos *in vitro* son utilizados para estimular las células. Además estos sistemas dinámicos ya han demostrado una alta eficiencia y uniformidad en el sembrado celular [76]. Boschetti et al. [54] han demostraron numéricamente que las distribuciones de las tensiones cortantes del fluido en la superficie del andamio dependen de la porosidad y del tamaño de poro del andamio (figura. 4.1). Obtienen valores de tensiones cortantes en las paredes de entre 2 y 5 mPa para una misma razón de perfusión de 0.5 mL/min. En la figura 4.1 además se muestra que existe una relación inversa entre los tamaños de poros y porosidad con los estímulos de tensión cortante calculas en las paredes.

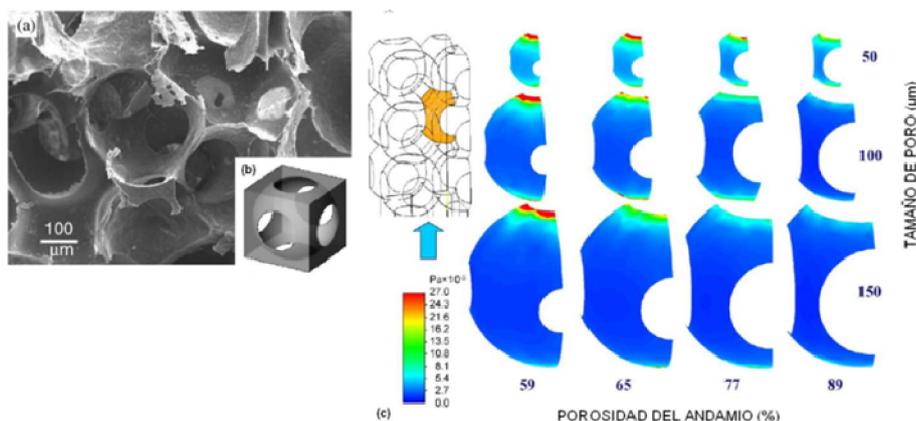


Fig 4.1. Ejemplo de simulación en andamios a) Imagen de microscopía electrónica de la microestructura del andamio biodegradable fabricado de ácido poli-láctico amorfo (PDLLA), aplicando la técnica de separación de partículas (diámetro promedio de poro de $200\mu\text{m}$ y porosidad de 89%). b) Unidad básica para el modelo CAD de la fase sólida del andamio simulado. c) resultados de las simulaciones de CFD para diferentes tamaños de poros y porosidad del andamio; se muestra como la magnitud de la tensión cortante influenciados por los cambios de porosidad y por la variación del tamaño de poro (modificada desde Boschetti et al. 2007[54]).

En la literatura se encuentran rangos bastante amplios de estímulos fluido-dinámicos (tabla 4.1) que son asociados a diferentes actividades celulares. Nuestra hipótesis es que estas discrepancias pueden estar relacionadas fundamentalmente con el uso de diferentes arquitecturas, dimensiones, biomateriales y condiciones (razón de flujo, frecuencia, tipos de bioreactores, etc). Además, se ha demostrado que a nivel local las interacciones células-biomaterial se ven afectadas por la rugosidad y las propiedades químicas de la superficie del biomaterial [104]. Las condiciones del transporte de nutrientes y oxígeno [105] así como el transporte de las mismas células en la fase de sembrado [106] también deben ser controlados durante los experimentos in vitro para garantizar la vida de las células.

Tabla 4.1. Algunos rangos de tensiones cortantes del fluido reportadas en la literatura

Magnitud de la tensión cortante(Pa)	Fenómeno	Células	Referencia
0.6-2.4	Proliferación osteoblástica	osteoblastos	Reich et al.[108]
0.8-3	Rango fisiológico	osteocitos	Cowin [109]
0.2-6	Rango in vitro	osteocitos	Klein-Nulend et al.[19]
$5 \cdot 10^{-5}$	Proliferación osteoblástica	osteoblastos	Porter et al.[110]
$5.7 \cdot 10^{-2}$	Muerte celular	osteoblastos	Porter et al.[110]
$2 \cdot 10^{-2}$ - $3 \cdot 10^{-2}$	Incremento de la deposición de calcio en el paso de 0.03 Pa a 0.02 Pa, cuando la porosidad cambia de 75% a 50%.	Células del estroma de un hueso de ratón	Gomes et al.[111]
$0.5 \cdot 10^{-2}$ - $1.5 \cdot 10^{-2}$	Bajo una razón de flujo constante, se incrementa la mineralización y se acelera la diferenciación osteoblástica de las BMSCs.	BMSCs	Li et al[112]

Las teorías de mecano-regulación relacionan fenómenos celulares a través de los estímulos mecánicos. Fundamentalmente estos algoritmos han sido incorporados en los modelos computacionales para simular las interfases con implantes [55], curación de fracturas[63] y la distracción ósea [79]. Recientemente han comenzado a ser aplicadas en ingeniería de tejidos incluyendo fenómenos de diferenciación, proliferación y migración de las células, además de incluir predicciones angiogénicas [39], [68], [69], [71]. Un ejemplo que ilustra la aplicación de estos algoritmos en ingeniería de tejidos fue el propuesto por Byrne et al. [68] donde se estudió la diferenciación celular y la regeneración de hueso en andamios regulares (prisma cúbico) bajo diferentes condiciones de carga, de esta manera se proponen algunos valores como: un módulo de Young de 1200MPa, porosidad de 70%, y carga de 1MPa mediante los cuales se obtienen los máximos porcentajes de hueso formado.

El **objetivo** del estudio presentado en este capítulo es evaluar computacionalmente la influencia de la morfología de diferentes andamios en el desarrollo de tejidos in vitro. Se asume que se utilizan células mensenquimales, capaces entonces de diferenciarse en diferentes fenotipos (condrogénicos, osteogénicos o fibrogénicos. Se asume que estas células están adheridas en toda la superficie del andamio. De esta manera se vinculan directamente las variaciones de los diseños de los poros con la capacidad de generar diferentes tipos de tejidos a través de los andamios. Los perfiles de flujo de fluido son relacionados a la fase inicial de sembrado suponiendo que se emplee un sistema de perfusión. Los diseños analizados fueron seleccionados de acuerdo con la literatura [34], [113], basados principalmente por la disponibilidad y repetitividad que es posible lograr durante su fabricación. En ambos casos son posibles de fabricar mediante estereolitografía (figura 4.2), mediante la máquina de Envisiontec Perfactory que se encuentra en la Universidad de Twente, Holanda (colaboradores). Para la simulación también se utiliza las propiedades de un biomaterial aprobado por la Food & Drug Administration (FDA). Las propiedades mecánicas de los andamios porosos fueron estudiadas numéricamente bajo condiciones de compresión axial y además los estímulos asociados a la fase sólida fueron acoplados con los obtenidos en la fase fluido mediante un modelo de mecano regulación [55] modificado. La hipótesis es que el diseño de la micro morfología del material puede influir en los estímulos que perciben las células y en la posible respuesta de éstas tanto en los cambios relacionados con el sembrado celular, como con el proceso de diferenciación que tienen lugar en el cultivo.

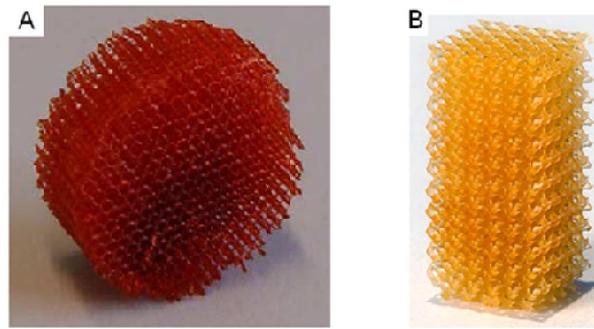


Fig 4.2. Disponibilidad de fabricación de los diseños estudiados en este capítulo. a) Estructura de prisma hexagonal fabricada de trimetilpropano tetraacrilato mediante *estereolitografía* en la máquina Envisiontec's Perfactory® SLA [113]. b) Estructura giroide de PDLA fabricada por *estereolitografía* en la máquina Envisiontec Perfactory Mini Multilens SLA[34].

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1 Diseños de andamios porosos

Con el fin de analizar la influencia de los diseños de poros se estudiaron los elementos representativos de volumen de cada arquitectura.

Prisma hexagonal

Chua et al. propusieron algunas morfologías de andamios regulares para aplicaciones en ingeniería de tejidos [101], [114]. Ellos estudiaron diferentes formas poliédricas y vincularon el diseño de la unidad base con la viabilidad del método de fabricación. A raíz de las selecciones realizadas por los autores se decidió para esta investigación utilizar como unidad base el prisma hexagonal (figura 4.3).

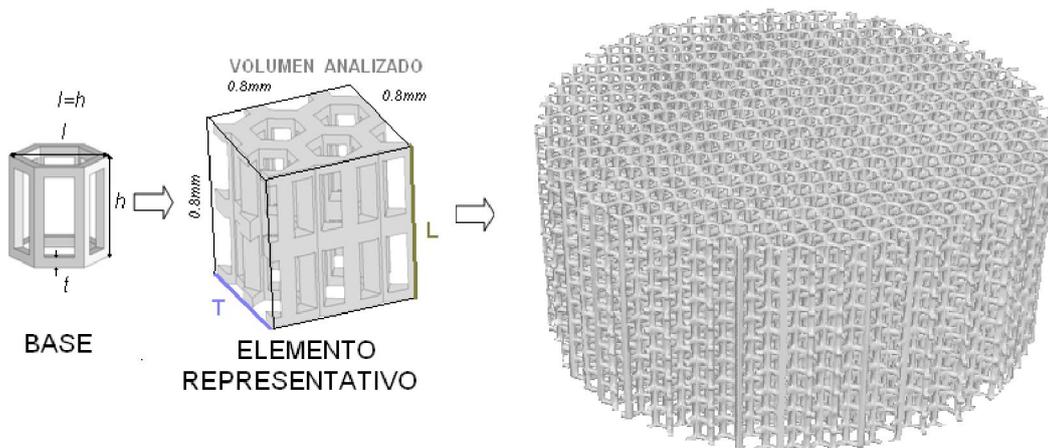


Fig 4.3. CAD del prisma hexagonal. Multiplicación de la unidad BASE del andamio hasta obtener las posibles dimensiones del andamio (8mm de diámetro y 4 mm de altura) para ser utilizada por ejemplo en un bioreactor de perfusión [50]. El elemento representativo de volumen (ERV) tiene unas dimensiones de $0.8 \times 0.8 \times 0.8 \text{ mm}^3$.

Las razones son que la estructura hexagonal permite: 1) la posibilidad de ser fácilmente repetible en 3D y presenta una buena integridad mecánica, 2) la posibilidad de reproducción mediante RP, estereolitografía (figura 4.2a) y 3) debido a que tiene superficies planas y perpendiculares similares a la mayoría de las estructuras que se fabrican mediante deposición de material [115], [116]. Se estudian dos posiciones del elemento representativo de volumen (ERV) por separado, una es de manera longitudinal (L) y la otra es transversal (T) (ver figura 4.3), debido a que el posicionamiento del andamio en el defecto puede ser importante al implantar este tipo de estructuras ortotrópicas.

Giroide

Este diseño ha sido propuesto y fabricado por Gabbrielli et al.[42] y Melchels et al.[117] para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Este diseño lleva a una mayor suavidad en los contornos descritos por sus superficies. De igual forma es fácilmente reproducible mediante estereolitografía. Para la obtención de estos modelos CAD se ha acudido a la utilización de ecuaciones triples periódicas [118], [119] que definen las superficies mediante funciones trigonométricas implícitas (ver Ecs 4.1). Se utilizó el programa K3DSurf v0.6.2 (<http://k3dsurf.sourceforge.net>) para la generación de las superficies de giroide (figura 4.4a).

$$\left. \begin{aligned} GYR70: \cos(x) \operatorname{sen}(y) + \cos(y) \operatorname{sen}(z) + \cos(z) \operatorname{sen}(x) &= 0.60 \\ GYR55: \cos(x) \operatorname{sen}(y) + \cos(y) \operatorname{sen}(z) + \cos(z) \operatorname{sen}(x) &= 0.15 \\ RG: \cos(x) \operatorname{sen}(y) + \cos(y) \operatorname{sen}(z) + \cos(z) \operatorname{sen}(x) \\ &+ 0.0015(x^2 + y^2) = 0.90 \end{aligned} \right\} (4.1)$$

Siguiendo las funciones trigonométricas planteadas en las ecuaciones 4.1 se delimitaron las superficies interiores de los andamios giroide. El valor de 0.60 corresponde a una porosidad de aproximadamente 70% y el de 0.15 a una porosidad de 55%. Esta metodología de diseño presenta la ventaja de obtener gradientes de tamaños de poros, similares a la transición existente en los tejidos naturales. Para los andamios con gradientes se tiene un valor de salida de 0.90 que corresponderá con valores en las coordenada $(x,y)=(0,0)$ y que equivale a una porosidad de 80% en el centro de la estructura. Mediante un desplazamiento incremental de $x^2 + y^2$ se disminuye la porosidad cuadráticamente en el radio del andamio hasta obtener un 30% de porosidad en la periferia del poroso. La porosidad global de la estructura (RG) es del 55%. Se estudio un gradiente en la dirección longitudinal mediante una ecuación similar pero donde los poros estarían más abiertos en la parte superior (80%) y en una altura de 4mm hasta 30% de porosidad en la parte inferior, la porosidad global es de $\approx 70\%$.

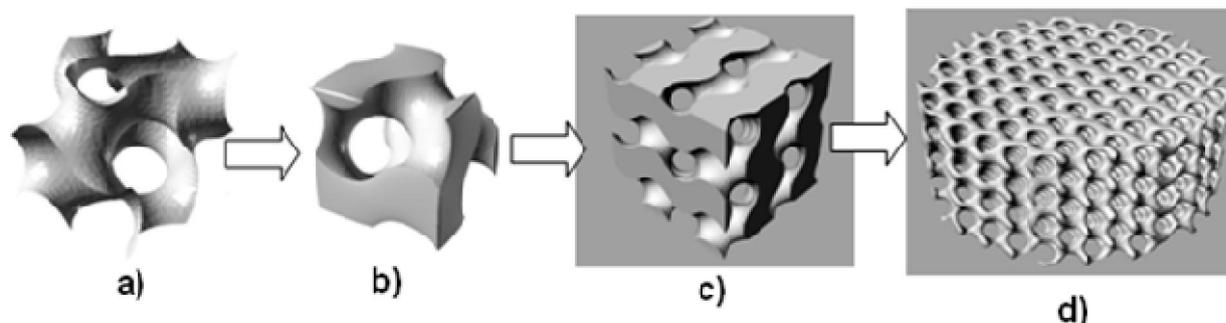


Fig 4.4 Construcción CAD de la forma giroide (55% de porosidad) mediante ecuaciones de superficie. a) Se obtiene la superficie mediante el programa K3DSurf v0.6.2. b) Se procede al cerrado de la malla se superficie del tamaño y la forma deseada para el modelo. En este caso se analizan (c) ERV ($0.8 \times 0.8 \times 0.8 \text{ mm}^3$) (d) andamio.

4.2.2 Propiedades de las fases sólidas y fluidas

Dos diferentes fases, fluida y sólida, fueron analizadas, representando el material del andamio y el volumen del poro. Los elementos representativos de volumen (ERV) para cada andamio fueron seleccionados de acuerdo con la distribución de los poros (figura 4.5). Las mallas triangulares fueron cerradas y remalladas a través del módulo MIMIC Remesh (Materialise). El mallado volumétrico (sólido y fluido) fue generado usando el programa Patran (MSC. Software), partiendo de una superficie común se controló la conexión de los nodos de los tetraedros para las dos fases. Los valores de porosidad (Φ) se calcularon mediante la relación entre el volumen del fluido y el volumen total del material poroso (tabla 4.2). Se incluye en esta tabla 4.2 los números de elementos de cada fase y por último el valor de la superficie específica, importante para valorar la cantidad de espacio libre disponible para que las células se adhieran.

Tabla 4.2: Número de elementos tetraédricos de la malla. Porosidad y superficie específica

Andamios	# elementos malla del sólido	# elementos malla en poros	Porosidad (%)	S/V of ERV (mm^2/mm^3)
HEX55_L	17,278	31,611	55	54
HEX70_L	28,289	214,990	70	45
HEX55_T	17,278	31,611	55	54
HEX70_T	28,289	214,990	70	45
GYR_55	297,760	442,076	55	48
GYR_70	128,543	732,628	70	44
GYR_LG	189,404	451,013	70	28
GYR_RG	1,041,043	1,914,647	55	34

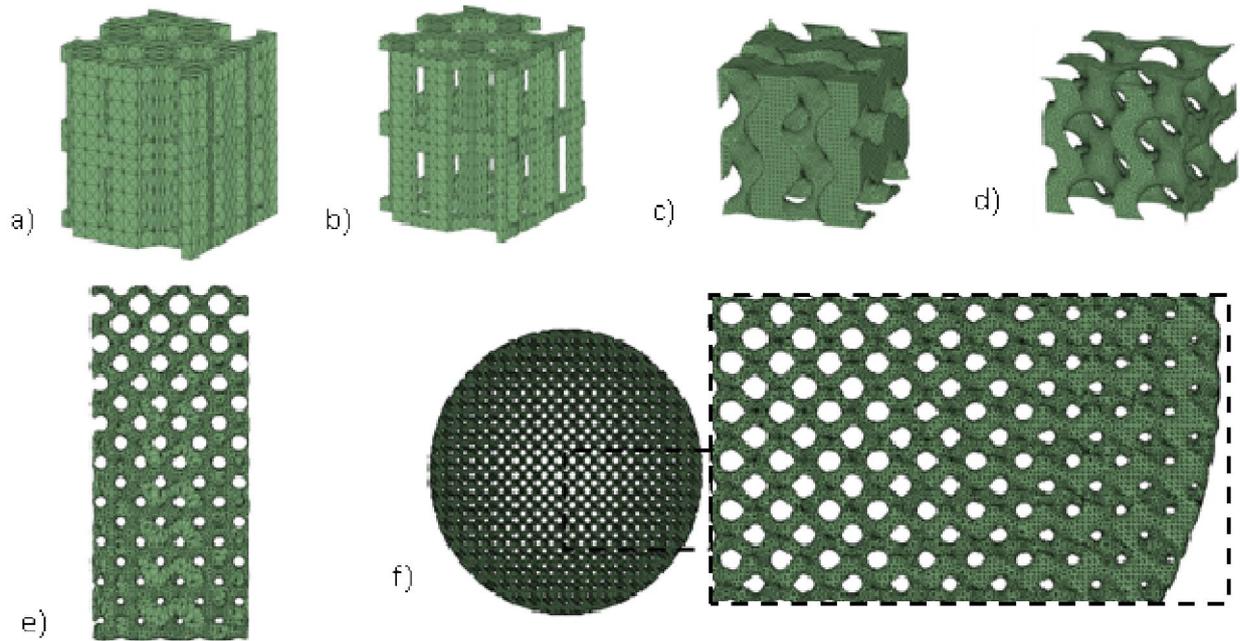


Fig 4.5. Malla de los elementos representativos de volumen (ERV) de cada una de las morfologías analizadas. a) Prisma hexagonal, con porosidad 55% (HEX55_L), se utilizará L o T para diferenciar entre posiciones longitudinal y transversal; b) Prisma hexagonal, con porosidad 70% (HEX70_L); c) Giroide, con porosidad 55% (GYR_55) d) Giroide, con porosidad 70% (GYR_70) e) Giroide, con gradiente de porosidad longitudinal (GYR_LG) f) Giroide, con gradiente de porosidad radial (GYR_RG).

La fase sólida (andamio) fue simulada con un ácido poli (D, L-láctico) (PDLA) de propiedades lineal elásticas con un módulo de Young de 3.3 GPa [117] y un coeficiente de Poisson de 0.3 (ver descripción de ecuaciones de linear elástico anexo A). Se aplicó una deformación axial constante, para distintos niveles de magnitud: 0.5%, 1%, 2.5% y 5%, simulando así una compresión no confinada como se muestra en la representación que se ha hecho para el modelo giroide LG (figura 4.6a). Se calcularon los valores de fuerza de reacción, tensiones y deformaciones usando Marc Mentat 2007r1 (MSC Software). La distribución de las deformaciones fue calculada para los nodos de las superficies. El módulo de Young efectivo, E_f , para cada diseño de andamio poroso fue obtenido según la Ec.4.2 [38]; donde R es la fuerza de reacción; A es el área de la sección transversal del andamio y $\varepsilon = (\Delta l / l)$ es la deformación axial.

$$E_f = (R / A) / (\Delta l / l) \quad (4.2)$$

La fase fluida fue representada con el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) a 37°C (viscosidad de $\eta=1.45 \cdot 10^{-3}$ Pa-s, densidad de $\rho=1000$ kg/m³) [120] (ver descripción de ecuaciones de fluido newtoniano anexo). El programa que se utilizó fue Fluent (Ansys). Una velocidad de entrada constante se aplicó en la fase fluida y se calculó bajo diferentes niveles de magnitud: 0.01, 0.1, 0.5, y 1 mm/s. En la salida del fluido se asumió una presión igual a cero y se simuló un flujo estacionario dentro del andamio (figura 4.6b). En las superficies del andamio y en las paredes exteriores a cada volumen se aplicaron condiciones no deslizantes correspondiendo con zonas que son suficientemente rígidas e impermeable. Se calcularon las velocidades del fluido, la presión del fluido y las tensiones cortantes del fluido. El valor de permeabilidad k fue calculado mediante la ecuación (Ec. 4.3), propuesta por Wang y Tarbell y utilizada para estudios macroscópicos de permeabilidad en estructuras regulares; en esta ecuación v es la velocidad del fluido en la entrada del andamio, η es la viscosidad del fluido y τ es el valor de la tensión cortante las paredes del andamio [121].

$$K = \left(\frac{\eta v}{\tau} \right)^2 \quad (4.3)$$

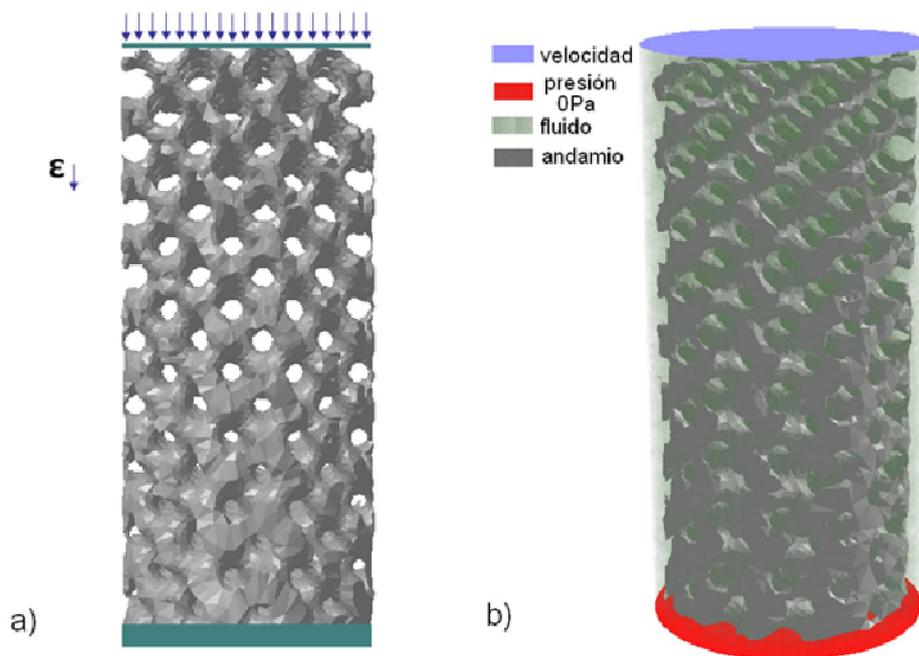


Fig 4.6: Condiciones de contornos para la simulación en los andamios, la representación se muestra en el andamio GYR_LG. a) Carga axial (compresión) b) Flujo de fluido.

4.2.3 Superficies de diferenciación celular

La teoría de mecano-regulación propuesta por Prendergast et al.[55] fue modificada para incluir las tensiones cortantes del fluido FSS desde la fase fluida, además de la deformación cortante octaédrica SS (Ec. 4.4) desde la fase sólida. La determinación de FSS se realizó empleando la ecuación 4.5, donde (dv / dx) es el gradiente de la velocidad en la dirección longitudinal y describe la cortante que perciben las células. Esta variación en el modelo de mecano- regulación es descrita por Sandino y Lacroix [65], y donde se explican las razones por la cual seleccionan el nivel máximo de 60mPa, los cuales son asociados con la muerte de la célula.

$$SS = \frac{2}{3} \sqrt{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)^2 + (\varepsilon_2 - \varepsilon_3)^2 + (\varepsilon_3 - \varepsilon_1)^2} \quad (4.4)$$

$$FSS = \eta \frac{dv}{dx} \quad (4.5)$$

$$S = \frac{SS}{a} + \frac{FSS}{b} \quad , \text{ donde } a=3.75 \% \text{ y } b=10 \text{ mPa} \quad (4.6)$$

El estímulo S fue calculado en la pared del andamio usando la ecuación 4.6. Dependiendo del valor de S , diferentes fenotipos para las células pueden ser predichos para cada elemento según el diagrama de la figura 4.7. Donde para $S > 6$ el estímulo será alto para inducir la diferenciación, asociándolo con el fenómeno de apoptosis [65], [110]; si $6 > S > 3$, entonces ocurre la diferenciación en tejido fibroso; si $3 > S > 1$, entonces ocurre la diferenciación en tejido cartilaginoso; si $1 > S > 10^{-2}$, entonces ocurre la diferenciación ósea y si es menor a 10^{-2} el estímulo es demasiado bajo para inducir a la diferenciación. Para el análisis del efecto y sensibilidad al cambio de la condición de cargas, se utilizaron diferentes niveles de magnitudes de velocidad de entrada del fluido y de deformaciones axiales en el sólido (figura 4.7). Los resultados más relevantes son analizados para los porcentajes de área superficial asociadas a los fenómenos de diferenciación de hueso y cartílago.

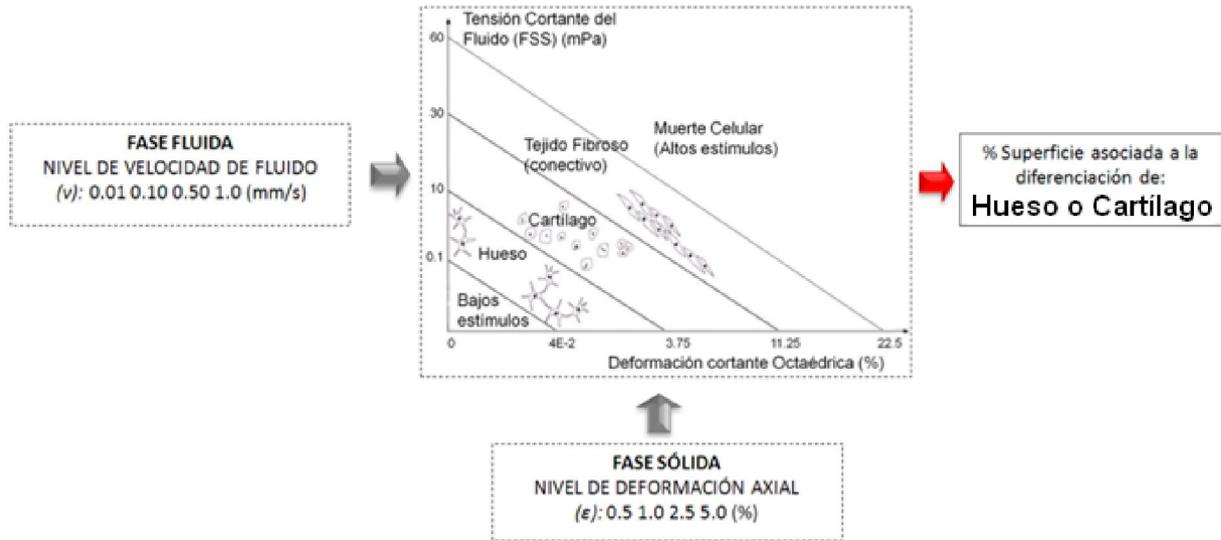


Fig 4.7. Esquema de análisis de los estímulos mecánicos en cada arquitectura. Se muestran los niveles de magnitud aplicados como condiciones de contorno en el modelo (ϵ , la deformación en la fase sólida y v , velocidad en la fase fluida). Se muestra la modificación del diagrama de mecano-regulación propuesto por Prendergast et al 1997[55] y que es detallado por Sandino et al 2010 [65]. Y finalmente los resultados más relevantes analizados que son la diferenciación en hueso o cartílago.

4.3 Resultados

4.3.1 Resistencia mecánica de los andamios

La respuesta a compresión de los andamios se ha evaluado mediante el módulo de Young efectivo (E_f). Evidentemente y como se muestra en la tabla 4.3, un incremento de la porosidad produce una disminución de E_f . Se ha podido constatar que la orientación de los andamios (prismas hexagonales) disminuye notablemente ($\approx 60\%$) el valor de la rigidez, si se cambia de una posición longitudinal (L) a una transversal (T). El máximo valor de E_f de todas las arquitecturas es en el andamio $HEX55_L$ (1514 MPa). Se muestra como los valores de $E_f(HEX_L)$ son mayores que los $E_f(GYR)$, lo que demuestra que un cambio de diseño afecta directamente la rigidez de la estructura. Sin embargo, los valores de $E_f(GYR)$ llegan a ser superiores a los $E_f(HEX_T)$.

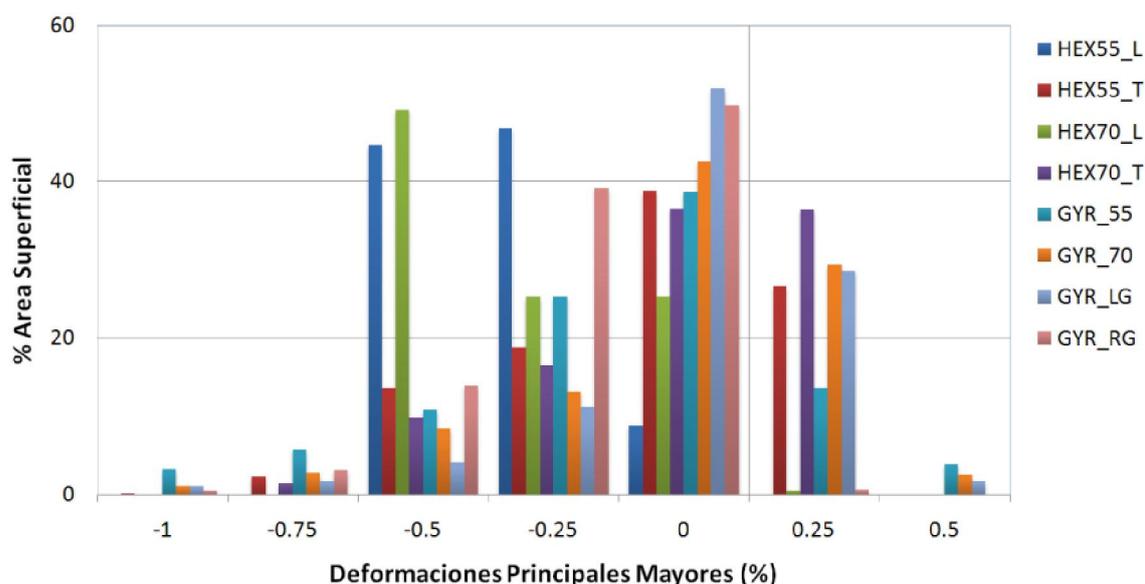
La estructura GYR_LG que presenta una porosidad igual a 70 % resultó tener un módulo de Young efectivo de 181 MPa que es 35% menor que el andamio GYR_70 (290 MPa); de donde se deduce que la distribución con gradiente en la dirección de la aplicación de la carga ha debilitado la estructura. La muestra con gradiente en la dirección radial GYR_RG presentó un valor de $E_f(1011 MPa)$ similar que para su homólogo ($\Phi=55\%$) la estructura GYR_55 (1008 MPa).

Tabla.4.3 Propiedades calculadas para las estructuras de los andamios. (Para $v=1\text{mm/s}$; $\epsilon=0.5\%$)

Andamios	E_F (MPa)	Velocidad Máx. (mm/s)	FSS Máx. (Pa)	K (10^{-10}m^2)
HEX55_L	1514	5.70	0.657	1.17
HEX70_L	904	4.11	0.443	3.84
HEX55_T	594	6.13	0.747	0.65
HEX70_T	274	4.22	0.450	2.06
GYR_55	1008	6.39	0.783	0.52
GYR_70	290	3.81	0.447	1.51
GYR_LG	181	5.18	0.340	3.95
GYR_RG	1011	5.17	0.594	2.61

4.3.2 Estímulos en la fase sólida

Para el análisis de los estímulos mecánicos de la fase sólida se evalúa la distribución de las deformaciones principales en las superficies del andamio bajo una carga compresiva equivalente a una deformación uniaxial de 0.5%. Para todas las estructuras se muestra una mayor proporción de material que está experimentando una deformación a compresión si se compara con la proporción de material que experimentó deformaciones a tracción (figura 4.8). La posición longitudinal en la estructura prisma hexagonal conlleva a menor variabilidad de las deformaciones, moviéndose en el rango a compresión desde 0.25% hasta 0.75%. Ahora bien, las estructuras giroide y las *HEX_T* amplían sus rangos desde valores de tracción (+) de 0.25% hasta valores de deformación a compresión (-) de 1%.

**Fig 4.8.** Distribución de las deformaciones principales en las paredes superficiales de los andamios para 0.5%.

4.3.3 Estímulos fluido-dinámicos.

Los valores máximos de velocidades de fluido y de tensiones cortantes en las superficies del andamio para una velocidad de entrada de 1 mm/s se muestran en la tabla 4.3. La tensión cortante máxima en los modelos de fluido para esta magnitud de entrada fue de 0.783 Pa para la estructura *GYR_55*. La estructura hexagonal (*L*) lleva a valores menores de los parámetros de fluido que las estructuras hexagonales (*T*), debido a que en la posición normal los andamios son más permeables (Figure 4.9a, b). El incremento de la porosidad de los andamios afecta directamente la trayectoria del fluido y los valores de tensiones cortantes en las paredes del andamio. La accesibilidad del fluido en las estructuras tortuosas como son giroides y hexagonales (*T*) fue mejor que para las estructuras hexagonales (*L*) (figura 4.9). Las estructuras de giroide con gradientes llevan a valores similares de velocidades máximas de fluido, 5.17 mm/s; sin embargo es importante señalar que las máximas tensiones cortantes son 0.6 Pa para *GYR_RG*, mientras que para *GYR_LG* el máximo valor es de 0.34 Pa, mostrando así, la influencia que tiene el volumen y la distribución del material sólido de la estructura sobre los perfiles de fluidos creados (figura 4.10 a, b).

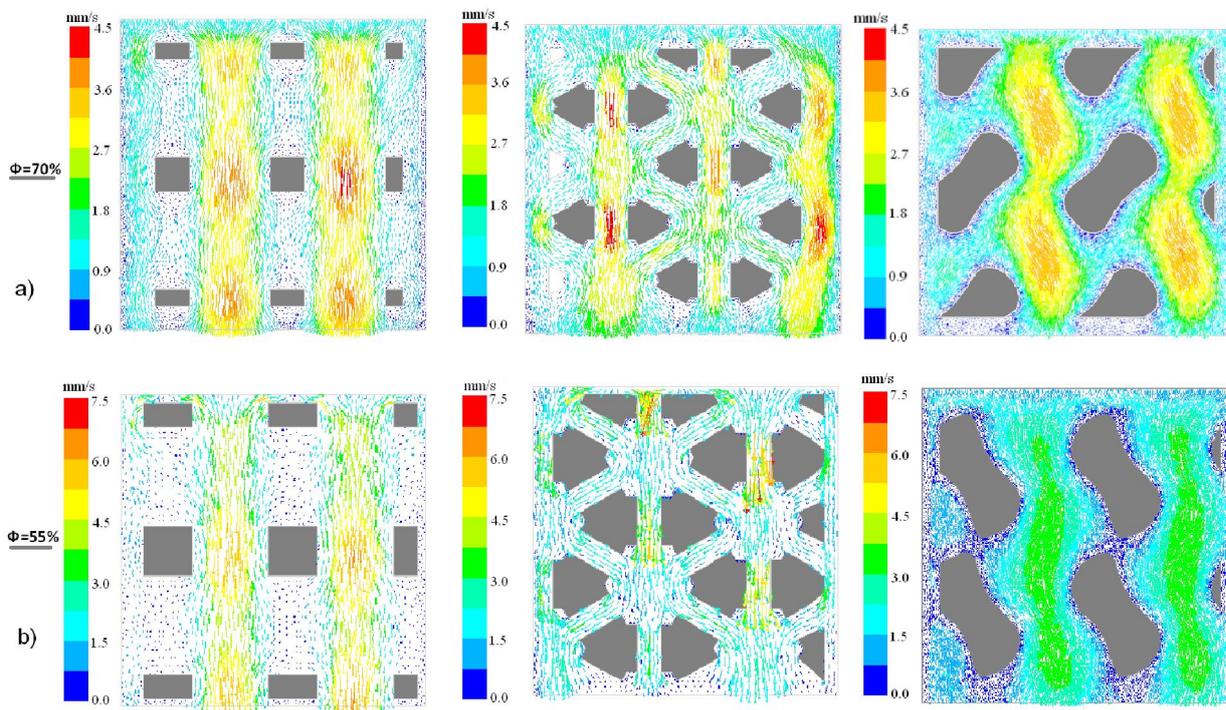


Fig 4.9. Vectores de velocidad en planos cortantes característicos para cada estructura (gris) para una la velocidad de entrada de fluido igual a 1 mm/s. a) Estructuras isotrópicas con 70% de porosidad. *HEX70_L* (izquierda); *HEX70_T* (medio); *GRY_70* (derecha). b) Estructuras isotrópicas con 55% de porosidad. *HEX70_L* (izquierda); *HEX70_T* (medio); *GRY_55* (derecha).

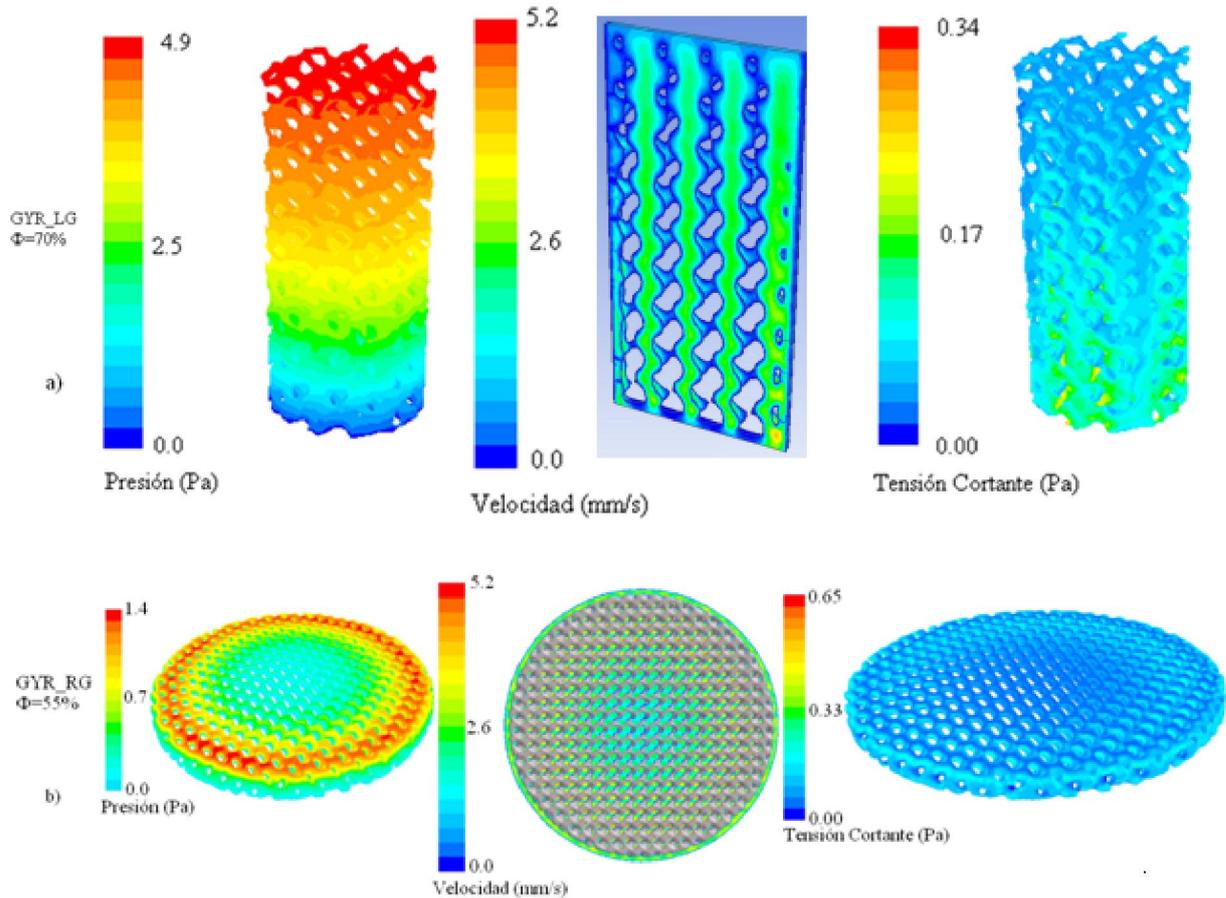


Fig. 4.10. Parámetros fluido-dinámicos (1mm/s) en los andamios giroide con gradientes de distribución de poros. a) *GYR_LG*, distribución de presiones en la pared del andamio (izquierda), la velocidad del fluido en una sección transversal del andamio (medio) y la distribución de las tensiones cortantes (derecha) en la pared del andamio. b) *GYR_RG*, distribución de presiones en la pared del andamio (izquierda), la velocidad del fluido en una sección transversal del andamio (medio) y la distribución de las tensiones cortantes (derecha).

Las estructuras *GYR_LG* y *GYR_RG* presentan mayores dimensiones en las direcciones donde presentan la variación gradual de tamaños de poros. La distribución de los parámetros fluido-dinámicos (presión, velocidad, tensión cortante) es gradual correspondiendo así con el diseño analizado y con las teorías básicas de mecánica de fluido (figura 4.10). Para el andamio *GYR_LG* se muestran variaciones de los estímulos mecánicos bien definidas en la dirección de la altura del andamio (figura 4.10a), en la zona inferior y donde los poros son menores se muestran los máximos valores de parámetros fluido-dinámicos (0.34Pa). Para la arquitectura *GYR_RG* se crean perfiles de tensiones cortantes y de velocidad del fluido que van en aumento desde el centro hacia la periferia del andamio (figura 4.10b). Esto es posible debido a que la velocidad de entrada está distribuida uniformemente sobre los andamios.

4.3.4 Predicción de fenotipos de tejidos

La influencia de la variación de las magnitudes de deformación axial y de la velocidad del fluido en la predicción de los fenotipos de tejidos según cada diseño, fueron evaluadas de manera independientes. Los porcentajes de áreas que corresponden con la diferenciación en células osteogénicas y condrogénicas fueron determinados mediante el modelo de mecano-regulación y representados en porcentajes de área superficial (figura 4.11 y 4.12). Los cambios de fenotipos de tejidos según cada arquitectura mostraron de manera general mayores cambios para las variaciones de niveles de velocidad de fluido en la entrada (figura. 4.11) que para las variaciones de los estímulos estudiados en la fase sólida (figura 4.12). En el análisis de las predicciones según la estimulación en un sistema de perfusión (figura 4.11) para velocidades de entrada mayores a 0.1mm/s, los valores de los estímulos son muy elevados para inducir una diferenciación ósea. El valor de 10 μ m/s es favorable para obtener estímulos en el rango osteogénico de más de un 95% del área superficial total. Los valores de fluido mayores de 0.5mm/s, son elevados para la obtención de hueso o cartílago en este tipo de estructuras y se pasaría a estar en zonas de estímulos correspondientes a tejidos conectivos fibrosos o donde la magnitud del estímulo puede sobrepasar el rango fisiológico y provocar apoptosis.

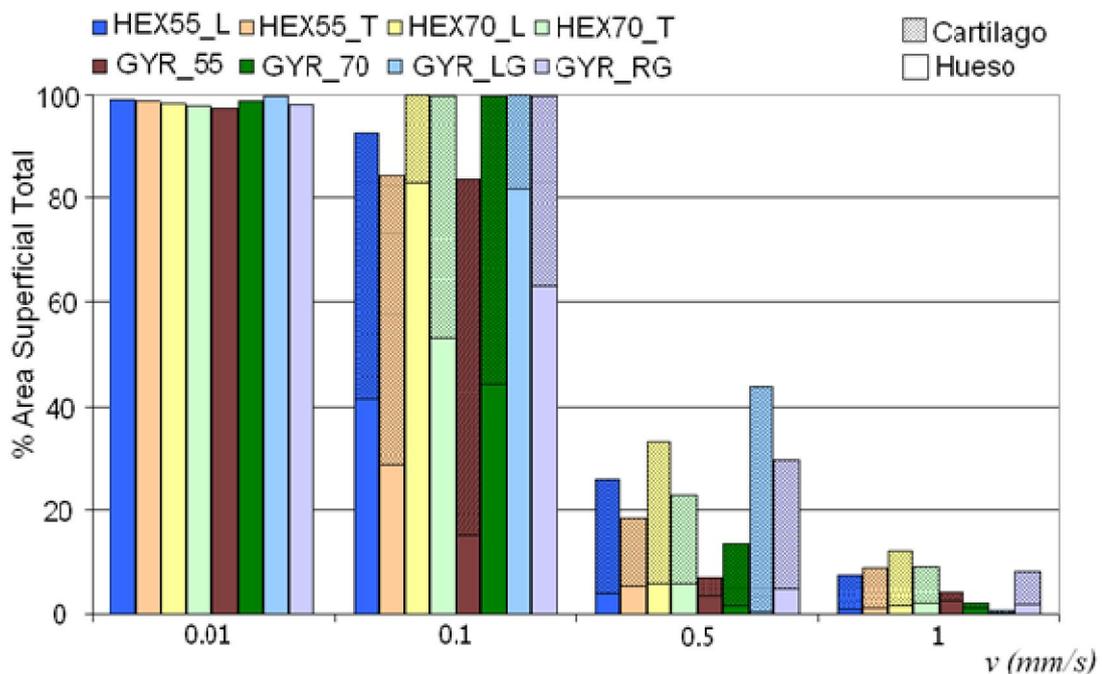


Fig 4.11. Influencia de la magnitud de la *velocidad del fluido* en el total del área superficial (% de los valores en los nodos) de los diseños de andamios estudiados que corresponden a estímulos mecánicos que favorecen la diferenciación de las MSC en linajes de células correspondiente a hueso (porción lisa) o cartílago (porción punteada).

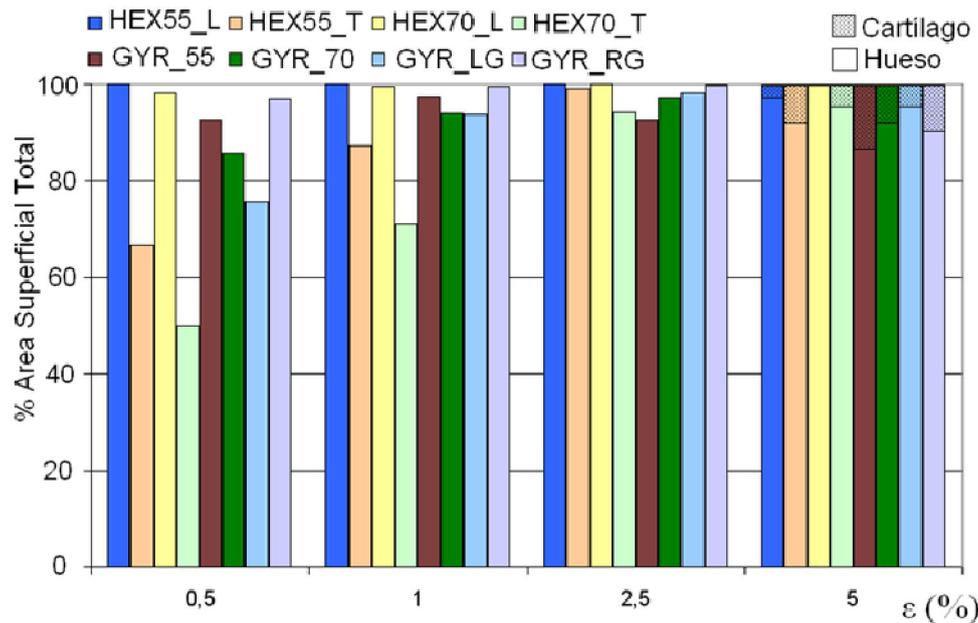


Fig 4.12. Influencia de la magnitud de la *deformación axial* en el total del área superficial (%) de los valores en los nodos) de los diseños de andamios estudiados que corresponden a estímulos mecánicos que favorecen la diferenciación de las MSC en linajes de células correspondiente a hueso (porción lisa) o cartilago (porción punteada), que favorecen la formación de hueso o de cartilago según el diseño de los poros de los andamios.

Para una deformación axial de 5%, se muestra como todas las estructuras presentan más de un 90% de área superficial donde los estímulos favorecen la osteogénesis y aparecen pequeños porcentajes en el rango de condrogénesis (figura 4.12). Entre los niveles 0.5-2.5%, prevalecen las áreas de formación de hueso, siendo los estímulos muy bajos en algunos casos. Se muestra cierta estabilidad en la posible creación de hueso para las estructuras de mayor rigidez que son: los diseños *HEX55_L*, *HEX70_L*, *GYR_RG*, *GYR_55*.

Los mapas de resultados de la diferenciación bajo una velocidad de fluido de 0.1 mm/s son mostrados para algunas estructuras (Fig. 4.13). El efecto que tiene la tortuosidad de las estructuras en la distribución de las magnitudes de los estímulos es claramente mostrado. Estructuras con menores cambios en las trayectorias del fluido (*HEX55_L* y *HEX70_L*) llevan a una más homogénea distribución de la diferenciación del fenotipo hueso (azul). Esto se debe al hecho de que en zonas transversales los vectores de velocidad de fluidos y por tanto de tensiones cortantes son muy bajas, y se traduce en estímulos correspondientes a diferenciación en hueso. Las estructuras giroides (*GYR_70*) y las hexagonales transversales (*HEX70_T*) inducen una estimulación más distribuida en el interior de los poros, mostrando porcentajes significativos de diferenciación de linajes de condrocitos, osteoblastos e incluso fibroblastos, si utilizamos por ejemplo la porosidad de 55% (figura 4.13d). Para las estructuras con gradientes de tamaños de poros se muestran distribuciones graduales de posible formación de tejidos. Según las figuras 4.14 y 4.15 es posible el control del porcentaje de superficies induciendo diferenciación en osteoblastos y en condrocitos, mediante el acoplamiento de las condiciones de cultivo (bioreactor), lo cual

nos permitiría obtener una óptima formación de tejidos dependiendo de la morfología de la estructura. Se muestran como la variación de la velocidad de entrada en el andamio cambia bruscamente los resultados en el proceso de diferenciación.

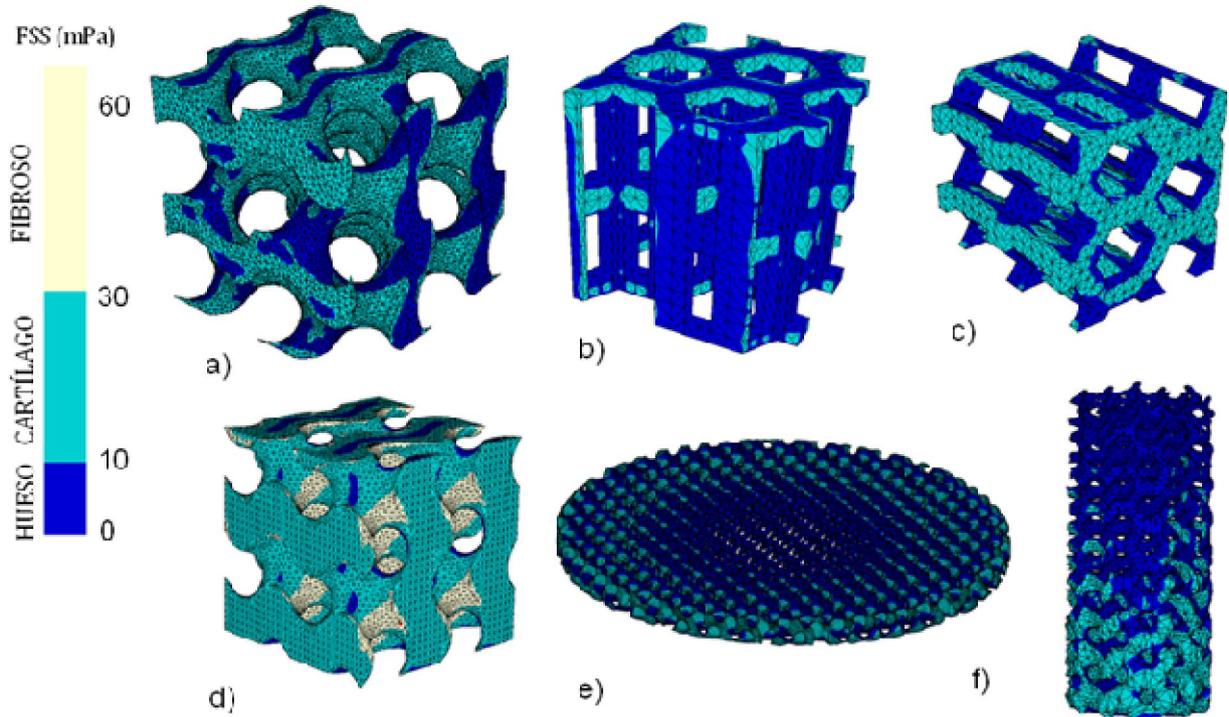


Fig 4.13 Estímulo bajo perfusión para 0.1mm/s, se representan las zonas que corresponden los diferentes fenotipos según el mecanismo de mecano-regulación utilizado. a) GYR_70 b) HEX70_L c) HEX70_T d) GYR_55 e) GYR_RG f) GYR_LG.

En las graficas de la figura 4.14 se puede ver como para un valor de 0.01 mm/s se asocia con un adecuado porcentaje de área en diferenciación ósea independientemente de la estructura. Así mismo pero con un 0.1 mm/s comienza la aparición de áreas significativas de formación de cartílago (figura 4.15). Con valores de aproximadamente 0.3 mm/s el porcentaje de estos fenotipos es despreciable y comienzan a aparecer estímulos correspondientes a tejidos fibrosos o estímulos muy altos. Para la estructura GYR_LG, se presenta una gran área con un alto porcentaje (>90%) de posible formación de hueso, indicando que es factible la utilización de diversas combinaciones de condiciones de cultivo en esta estructura. Así mismo se muestra que un incremento de la porosidad para un mismo diseño provoca que áreas con porcentajes de estímulos correspondientes a hueso sean mayores (se eleva la probabilidad de obtener hueso al incrementar la porosidad). En la figura 4.15 sin embargo se muestra como es difícil encontrar elevados porcentajes de áreas indicando diferenciación en cartílago, a excepción de la estructura HEX70_L, para la cual existen estas posibilidades para combinaciones de altos estímulos tanto de fluidos y como de sólidos.

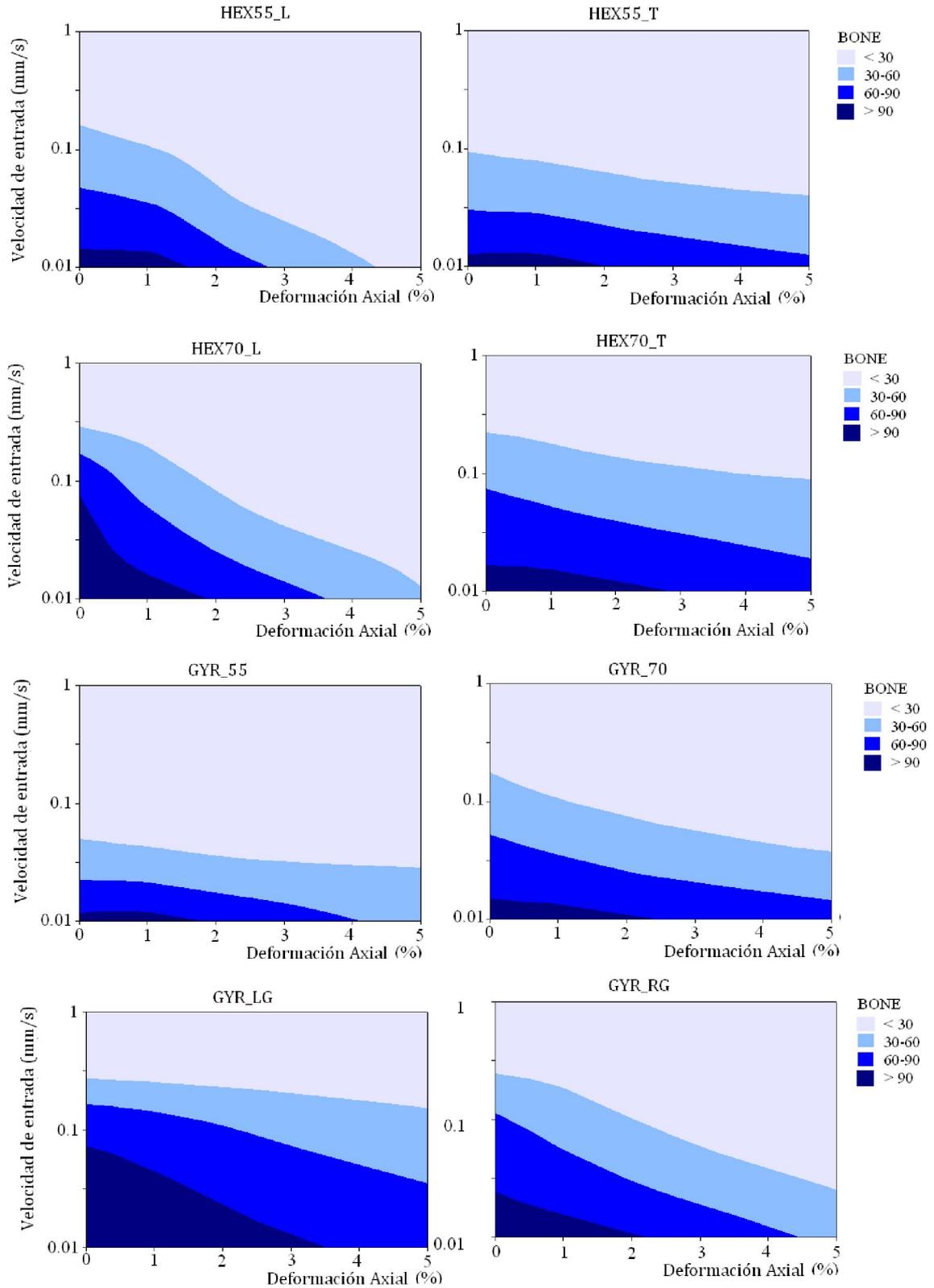


Fig 4.14. Área de diferenciación osteogénicas de acuerdo con la variación de las condiciones en la fase fluida y sólida.

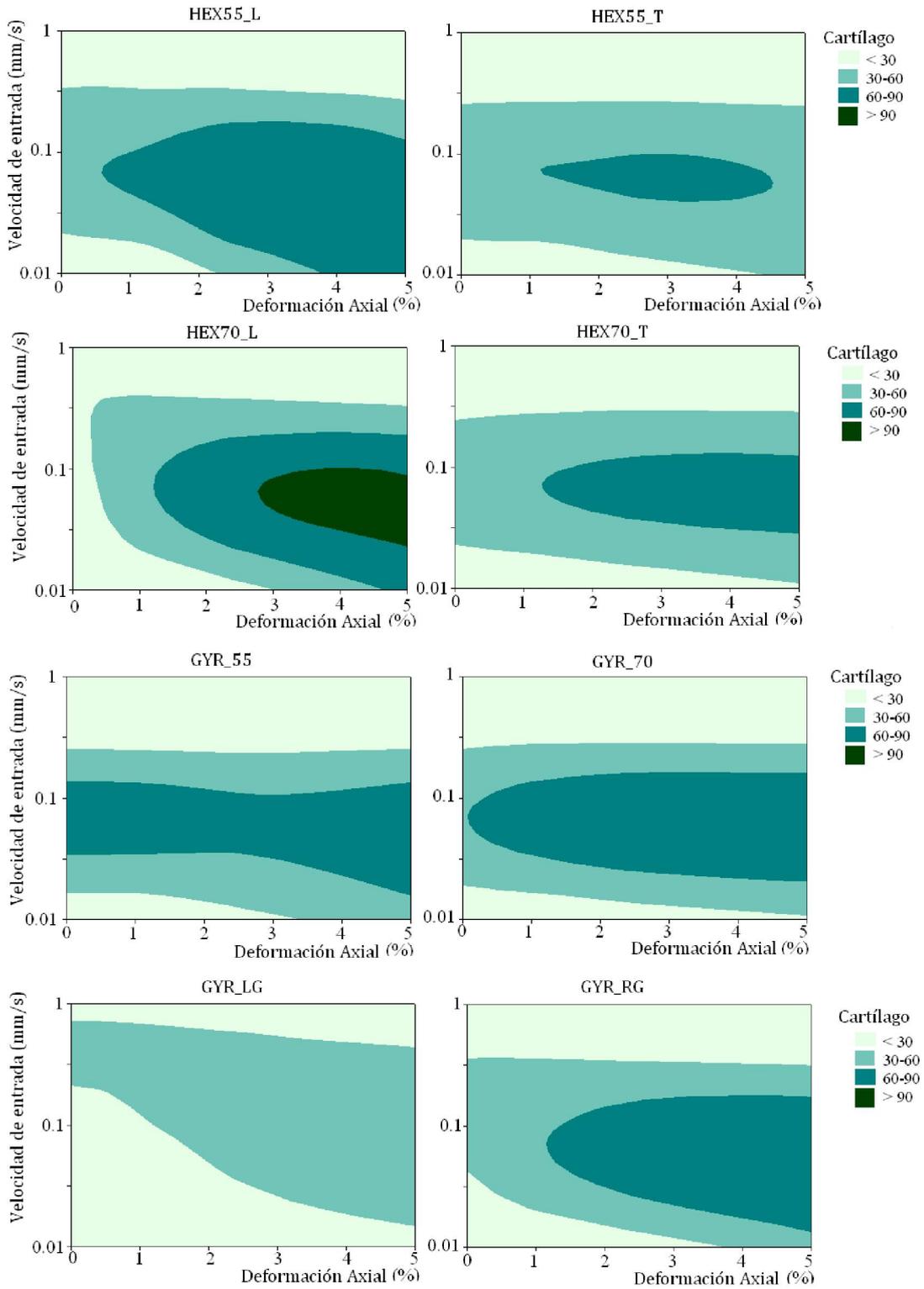


Fig 4.15. Áreas de diferenciación condrogénicas de acuerdo con la variación de las condiciones en las fases fluido y sólido.

4.4 Discusión

Utilizando el proceso de diseño propuesto por Hollister[47] el primer paso que se ha tenido en cuenta para la evaluación de las morfologías de los andamios, fue que el diseño de estructuras sean viables para ser fabricadas mediante los métodos existentes de prototipado rápido, en este caso fue comprobada mediante estereolitografía[113],[34]. A partir de aquí se ha desarrollado un proceso de caracterización numérica, que ha permitido visualizar y llegar a algunas hipótesis y respuestas de fenómenos que ocurren en la ingeniería de tejidos.

Los diseñadores de andamios tienen como objetivo obtener una alta regeneración de cartílago o de hueso en dependencia de la aplicación. En este estudio se evaluaron estructuras abiertas que presentan una distancia entre las paredes ($\approx 150\text{-}500\mu\text{m}$) y no han de ser del todo positivas en el ambiente que es deseado para el cultivo de cartílago. Esto se debe a que los condrocitos (diámetro de $10\mu\text{m}$) necesitan de un ambiente 3D para un mejor desarrollo [122] y el distanciamiento entre las paredes puede representar para este tipo de célula que está en un ambiente 2D. De manera que los valores con respecto a formación de cartílago tender a cambiar experimentalmente debido a estas razones, pero evidentemente se comprueba que existe una continuidad del modelo de mecano-regulación y que la posible transición de niveles de estímulos puede ser aprovechada para obtener zonas de cambios graduales. Las limitaciones de los modelos presentados en estos estudios están fundamentalmente vinculadas a los aspectos biológicos y químicos y por esta razón deben ser analizadas como una guía a nivel mecánico, pero no serán totalmente determinantes, de aquí la necesidad de realizar estudios experimentales que permitan verificar los resultados expuestos.

Otra suposición importante es que se asume que todo el espacio limitado por las superficies del material poroso está colonizado por las células y por lo tanto se supone que las células han llegado a todas las zonas en el interior del andamio y que durante el cultivo están todas sembradas y cubriendo las paredes del andamio. Esto limita el estudio debido a que la distribución de las células está directamente relacionada con la distribución del tejido construido y por lo tanto con la fase de diferenciación que se estudia.

No obstante, con este capítulo quedan claros los posibles beneficios que tiene la porosidad interconectada en el sembrado celular y que dependerá además del diseño de los canales, ya que guiarán la migración y la formación del tejido. Además se muestra la posibilidad de dar paso a la formación de múltiples tejidos y a la regeneración de la interfase entre los tejidos. La orientación de algunos andamios tiene efectos totalmente diferentes y de ahí la importancia de tenerlo en cuenta a la hora de buscar una aplicación específica. En este aspecto las morfologías giroides al ser totalmente isotrópicas poseen menos restricciones en el momento de ser implantadas.

El incremento de la porosidad induce una disminución de los valores máximos de velocidades y de las tensiones cortantes para todas las arquitecturas, este efecto también ha sido encontrado anteriormente por Boschetti et al. [54]; pero en nuestro estudio se le adiciona el efecto de los diseños de los poros (prisma

hexagonal y giroide) y se comprobó que es un factor determinante. En este punto es importante tener en cuenta que en la entrada del fluido no existe distancia suficiente para obtener un flujo completamente desarrollado antes de llegar al poro. Por lo tanto, se está asumiendo que la entrada del fluido es homogénea a lo largo de todo el radio de los andamios y se desprecia la influencia que puedan tener los diseños de la cámara del bioreactor, conociendo y como bien se ha demostrado en el estudio del Capítulo 3 que estos tienen efecto en el transporte del fluido [52], que llegan a la entrada del andamio.

Para velocidades de entrada mayores a 0.1mm/s, los valores de los estímulos (tensiones cortantes) obtenidos son muy elevados para inducir la diferenciación ósea en andamios que presentan una porosidad abierta. También se demuestra que el comportamiento en cada diseño es diferente bajo varias condiciones de cultivo; y que es posible controlarlo mediante los mapas numéricos como los propuestos en la sección anterior (figuras 4.14 y 4.15). La interconexión de los poros en los diseños giroides hacen que exista cierta suavidad en los perfiles de velocidad y que el fluido pueda llegar a todas las zonas del andamio.

Para este estudio el cálculo del módulo de Young efectivo, refleja el grado de ortogonalidad para estas estructuras prismas hexagonales ($E_f 55\%$ (L; T) = (1514; 594) MPa y $E_f 70\%$ (L; T) = (904; 274) MPa). Similares comportamientos pueden ser encontrados en estructuras fabricadas por métodos de prototipado rápido, que se basan en la deposición capa por capa del material [123], [124]. Este aspecto es de suma importancia tenerlo en cuenta, sobre todo a la hora de implantar o estudiar en condiciones in vitro; ya que la respuesta para una misma estructura no será igual. Por otro lado, encontramos estructuras como las giroides (fabricadas por estereolitografía [117]) que como se ha dicho anteriormente tienen una morfología isotrópicas y es posible implantarlas o analizarlas indiferentemente en cualquiera de las direcciones. Ahora bien, se presentó un caso interesante que es cuando se introducen gradientes de porosidad semejantes a los encontrados en la estructura ósea [42], [125]; en estos casos hay que tener bien controladas las propiedades mecánicas en referencias a las diferentes direcciones, ya que como se muestran en los resultados un gradiente de poros en la dirección de la carga aplicada debilitará la rigidez de la estructura. Existen muchos casos en la anatomía humana donde se necesita la variación gradual de tejidos o capas de tejidos, esto puede ser una excelente manera de obtener estas capas acopladas sobre una misma estructura. El diseño de los poros juega un papel fundamental en la creación del tejido (óseo o cartilago) y creemos que es importante su introducción para estudiar y entender las teorías de control biológico en andamios in vitro. Para los andamios con gradientes de porosidad, tanto la trayectoria del fluido como el comportamiento mecánico brindan variaciones graduales en la distribución del estímulo mecánico. Esto último puede significar la posibilidad de obtención de zonas osteocondral en una misma matriz porosa de biomaterial.

Con el uso del material polimérico fotopolimerizable PDLA ($E=3.3\text{GPa}$) [117], las estructuras porosas estudiadas mantienen una rigidez que es superior o está dentro en el rango de la rigidez del hueso trabecular (0.02-0.5 GPa). Por otro lado, para estructuras con una forma uniforme giroide, la rigidez pueden ser verificadas si las comparamos con ensayos experimentales realizados por Melchels et al.

2010 [34], donde la magnitud del experimento fue de 169 ± 21 MPa para 70% de porosidad, para un módulo de Young del material macizo de $E=2.1$ GPa; si se disminuye el módulo de Young en el modelo desarrollado *GYR_70* este valor de módulo efectivo es de 175 MPa.

En el nivel microscópico la distribución de las tensiones cortantes inducidas por el fluido de perfusión depende de la distribución de poros dentro del andamio. Los rangos de tensiones cortantes para la velocidad máxima utilizada (1mm/s) estuvieron en el rango fisiológico encontrados por Cowin (2002) [109](tabla 4.1). La mejor accesibilidad de fluido fue obtenida en las estructuras giroides y este resultado sugiere la posibilidad de obtener un mejor sembrado celular y mejor transporte de nutrientes con respecto a la distribución que se puede obtener en los diseños hexagonales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a nivel de integridad y rigidez mecánica las arquitecturas hexagonales son más rígidas y que en la fase sólida las estructuras giroides inducirán a estímulos mecánicos menos homogéneos que las estructuras hexagonales.

En general todas las estructuras son más adecuadas para la formación de hueso que para la formación de cartílago; objetivo deseado por Grabielli et al. 2008[42] y Chua et al.2003 [114], pero que ha quedado demostrado mediante este estudio, donde se aplicó una teoría de mecano regulación. La sensibilidad del análisis de diferenciación realizado para el modelo de mecano regulación muestra que existe una mayor influencia bajo el flujo de fluido en el rango estudiado con respecto a la variación de deformaciones axiales. Sin embargo, Geris et al.[126] aplicando el mismo modelo de mecano regulación llega a la conclusión de que el modelo es más sensible a la deformación axial que al movimiento del fluido. Las diferencias pueden encontrarse en los rangos de magnitud aplicados, pero también hay que tener en cuenta que para su estudio Geris et al. [126] utilizaron un modelo poroelástico y en este estudio se discretizó el sólido y el fluido respetando una estructura definida por las morfologías. Como es conocido en un modelo poroelástico se aplica una compresión y la velocidad del fluido se genera por medio de la deformación del material y en este capítulo se aplica una perfusión directa del fluido en el interior de los poros de las estructuras que se están deformando.

También en este estudio se confirma que la deformación axial es un estímulo eficiente para la diferenciación ósea como proponen Claes and Heigle (1999) [17] y Carter et al. (1988) [127]. El flujo de fluido con velocidad de 0.01mm/s lleva a resultados muy similares a los obtenidos mediante la deformación axial. La estructura abierta y la interconexión de la arquitectura giroide facilita la penetración del fluido y lleva a una distribución homogénea de células después del sembrado para las estructuras con distribución homogéneas [128], esto nos ha llevado a seleccionar este diseño para realizar los siguientes estudios basados fundamentalmente en la fase de sembrado celular.

4.5 Conclusiones

En este capítulo se propone una vía de análisis de diseños regulares de andamios 3D para ingeniería de tejidos. Se demuestra que andamios con estructuras como la giroide permiten mejor distribución del fluido, fenómeno asociado a un mejor sembrado celular y distribución de nutrientes y oxígeno. El diseño giroide también permite la obtención de estructuras con gradientes de poros, que muestran la posibilidad de obtener crecimientos de diferentes tejidos, como por ejemplo para una sustitución osteocondral. Los diseños hexagonales se caracterizaron por tener mayor rigidez que los giroides, pero hay que tener en cuenta su comportamiento ortotrópico en el momento de implantarlos o cultivarlos *in vitro*. Las propiedades mecánicas de las estructuras analizadas se encuentran en el rango del módulo de Young del hueso trabecular. El modelo de mecanoregulación aplicado muestra mayor sensibilidad a las variaciones de velocidad del fluido, lo que constituye un aspecto destacable en el uso de bioreactores de perfusión para cultivos *in vitro*. Este tipo de estudios y metodología ayudan a entender y predecir fenómenos de difícil acceso mediante la experimentación. Se puede afirmar que existe un fuerte vínculo entre las condiciones de cultivo y los diseños de las morfologías de los andamios, lo cual puede ser una manera de optimizar el sistema bioreactor-andamio en experimentos *in vitro*.

Capítulo 5: Sistema modelo para el control del sembrado celular por perfusión

Resumen: En este capítulo se estudia la influencia que tienen las arquitecturas de los andamios en la distribución de las células después del sembrado en condiciones de perfusión. Aplicando métodos computacionales (CFD) se calculan las magnitudes de estímulos en las paredes de las arquitecturas de andamios donde las células son depositadas. Las estructuras fueron fabricadas con el diseño giroide y usando la técnica de estereolitografía. Un tipo de andamio fue fabricado con una distribución de tamaño de poro isotrópico ($412 \pm 13 \mu\text{m}$) y el otro con una variación gradual de tamaño de poro (250-500 μm). Los máximos valores de estimulación fueron calculados resultando en que la tasa de cortante es de entre 15s^{-1} y 24s^{-1} para el tipo isotrópico y de 12s^{-1} - 38s^{-1} para el andamio con gradiente de porosidad. Se encuentra que existe relación entre la distribución de las células sembradas y los estímulos. Mayor densidad de células donde el tamaño de poro es mayor y donde el transporte de flujo es mayor. De aquí que se proponga este método como análisis predictivo de la posible calidad del sembrado celular.

5.1 Introducción

La gran mayoría de las investigaciones en ingeniería de tejidos están dirigidas a obtener un sembrado homogéneo de las células a través de la estructura del andamio y proveer a las células sembradas con suficiente oxígeno y nutrientes para que estas proliferen y generen un nuevo tejido. En los tejidos biológicos como cartilago articular, menisco o tejido osteocondral, existen variaciones significativas en cuanto a funciones biológicas, composición y propiedades mecánicas de la matriz extracelular, lo que significa que de manera natural estas propiedades varían por capas y no son del todo homogéneas. No obstante, se continúa apostando por una regeneración e integración del tejido con injertos que presenten una composición y propiedades más isotrópicas, buscando así un mejor entendimiento de los complejos fenómenos que se producen (ejemplos del capítulo 4). El sembrado celular en andamios es una fase importante dentro de los estudios *in vitro*, ya que precede a todas las otras fases del comportamiento celular *in vitro* (la extensión, proliferación y la diferenciación de las células [129]). La perfusión directa para sembrado celular, es un método eficiente [51]; pero a pesar de esto existe muy poco conocimiento de los parámetros necesarios para su optimización y controlen andamios 3D [50], [51], [130]. Muchos investigadores han planteado la necesidad del control de dos factores fundamentales, la arquitectura de los andamios [36], [44], [88] y las condiciones de cultivo [92], pero es inminente la necesidad de unir el comportamiento experimental con las predicciones numéricas. Son varios los estudios que se pueden

Este capítulo se ha publicado en parte en: *The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding*. Ferry P.W. Melchels, Beatrice Tonnarelli, **Andy L. Olivares**, Ivan Martin, Damien Lacroix, Jan Feijen, David J. Wendt, Dirk W. Grijpma. *Biomaterials* 32 (2011) 2878-2884.

extraer de la literatura donde condiciones de perfusión han sido aplicadas, ya sea para comparar diferentes tipos de materiales con microestructuras irregulares[36], [110] o regulares [44], [53], [54], pero realmente los valores de los estímulos que pudieran vincularse a esta distribución de la densidad celular en el sembrado a pesar de ser desconocidas tendrán magnitudes muy diferentes a nivel local. En el capítulo anterior se han desarrollado modelos que demuestran la influencia que tienen las formas y distribuciones de poros en los perfiles de fluido creados en el interior de cada andamio y como las técnicas de prototipado rápido (por ejemplo la estereolitografía) permiten la fabricación de andamios tamaños de poros, porosidad o rigidez [34] que pueden ser replicadas posteriormente. Otro punto a señalar es que el proceso de adhesión de las células esta directamente influenciado por el ambiente fluido dinámico [51].

Los estudios de fluido dinámico computacional hasta el momento presentados son empleados para caracterizar la morfología de los andamios o para intentar optimizar los parámetros en los bioreactores de perfusión [44], [53], [54]. Los efectos de la magnitud de la fuerza cortante inducida por el fluido y la distribución de las células después del sembrado son desconocidos. La teoría plantea que bajo un flujo de células en suspensión a lo largo de una capa que cubre la superficie del andamio y cuando esta célula contacta con la superficie del andamio, esta se deforma por el flujo y en este punto ella incrementa su área de contacto. La célula inicia entonces las uniones a la superficie a través de receptores y de ligantes que están en constante formación y rotura debido a la fuerza del fluido, pero finalmente la célula se sujeta a la superficie e inicia extensión. Este fenómeno presenta una gran complejidad y su calidad dependerá de diferentes factores asociados (biomaterial, superficie, estructura del andamio, tipo de célula, fluidodinámica, etc), además de existir una dificultad añadida que es la tridimensionalidad de los andamios.

Este capítulo tiene como **objetivo** desarrollar un *sistema multidisciplinar* que permita vincular la distribución de las células después del sembrado por perfusión con los parámetros experimentales y numéricos que dependen de los diseños de los andamios. En el marco del proyecto STEPS, se ha colaborado para el desarrollo de este estudio mediante la implicación de tres universidades. La fabricación de los andamios ha sido llevada a cabo por la Universidad de Twente, Holanda; los ensayos in vitro en el sistema de perfusión fueron realizados en la Universidad Hospital de Basel, Suiza y la reconstrucción y desarrollo de los modelos de CFD para los andamios fueron realizados en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), España. De esta manera, se espera vincular los estímulos fluidos en la pared del andamio con la arquitectura del andamio y con la densidad de células adheridas experimentalmente. La hipótesis seguida en el estudio es que es posible relacionar los estímulos que producen la aplicación del flujo de fluido con la distribución de las células que se pueden observar en andamios con estructuras controladas. Los andamios estudiados fueron fabricados con poli (D, L-láctico) (PDLLA) foto-polimerizable, detalle por Melchels et al.[131]. Se estudian dos distribuciones de poros; una isotrópica (Tipo I) y la otra con un gradiente de porosidad (Tipo G). Ya en la figura 5.1 se muestra la reproducibilidad del método de fabricación empleado, donde se compara el diseño CAD de cada andamio con la morfología que realmente se obtuvo de la estereolitografía[131].

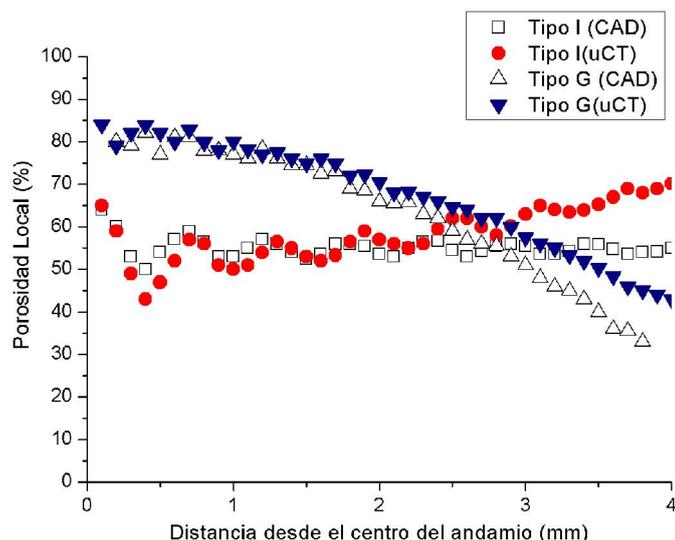


Fig 5.1. Porosidad local como función de la distancia desde el eje central del andamio, para los andamios cilíndricos Tipo I y Tipo G. Los datos de μ CT fueron analizados para dos muestras y comparados con los diseños computacionales utilizados para la fabricación. La porosidad local es determinada en intervalos de 100 μ m. Adaptado desde Melchels [131].

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Diseños de los andamios

Se fabricaron dos andamios con diferentes distribuciones de poros. Uno fue diseñado con una distribución isotrópica (Tipo I), con tamaños de poros homogéneos en el volumen cilíndrico. El otro andamio fue diseñado con un gradiente de tamaño de poros en la dirección radial (Tipo G) del cilindro. El objetivo de estos diseños es que posibiliten la creación de diferentes perfiles de flujo de fluido en el interior del andamio, como se ha demostrado en el capítulo anterior [44]. Los poros son diseñados basados en la arquitectura giroide, la cual demostró que presentaba una mejor accesibilidad del fluido en el interior del los diseños de poros analizados. Para los diseños estudiados se delimitan las superficie descritas mediante las funciones triple periódicas estudiadas y propuestas por Schwarz and Schoen [118], [119]. Los modelos CAD se desarrollaron utilizando el programa K3DSurf v0.6.2.

Para lograr el balance de las ecuaciones un valor de salida es añadido, mediante el cual es posible obtener el valor de porosidad del andamio en correspondencia con la forma diseñada. Para el Tipo I un valor de -0.15 fue escogido, correspondiendo a una porosidad de 55 %. En el andamio Tipo G, el valor de compensación fue de 0.90 cuando $x, y=0$ (en el centro del cilindro), este valor corresponde con un 80 % de la porosidad. Esta compensación se incrementó además (0.0015 veces) con una función cuadrática x^2+y^2 , de modo que a medida que va aumentando el radio, la porosidad va disminuyendo hasta un valor mínimo de un 30% (periferia). Los contornos cilíndricos fueron controlados mediante las siguientes

condiciones: $(x^2 + y^2 < (10\pi)^2)$ y $(|z| < 5\pi)$. El valor global de la porosidad es de 55% igual a la porosidad del diseño isotrópico.

$$I: \cos(x) \sin(y) + \cos(y) \sin(z) + \cos(z) \sin(x) - 0.15 = 0$$

$$G: \cos(x) \sin(y) + \cos(y) \sin(z) + \cos(z) \sin(x) - 0.0015 \cdot (x^2 + y^2) - 0.90 = 0$$

Partiendo de los diseños de CAD y usando la máquina de estereolitografía EnvisionTec Perfactory Mini Multilens [117], fueron construidos los andamios (diámetro de 8mm y una altura de 4mm) en la Universidad de Twente, Holanda.

5.2.2 Reconstrucción y simulación del flujo de fluido

Para determinar la precisión del proceso de fabricación y verificar la distribución de los tamaños de poro se tomaron imágenes de micro-tomografías computacionales (μ CT, *GE eXplore Locus SP* operado a 80 kV, 80 μ A y 15 μ m de resolución sin filtro). A partir de estas imágenes se crearon los modelos a utilizar en este capítulo utilizando así las estructuras reales ensayadas. Las mallas se obtienen mediante el programa MicroView y del cual se extraen los archivos de las superficies reales fabricadas mediante estereolitografía. Los datos de escáner fueron usados para calcular los parámetros estructurales de los andamios (porosidad y tamaño de poro). Diferentes calidades de mallas en formato (*.stl) fueron exportadas y se determinó cual optimizaría el número de elementos de la superficie en relación con mantener la forma de los modelos. Posteriormente y mediante el módulo de MIMIC Remesh (Materialise), las mallas fueron tratadas para la obtención de triángulos de calidad 0.7, teniendo en cuenta obtener una malla cerrada y que mantenga los contornos logrados mediante la reconstrucción. Partiendo de la malla superficial de los andamios se procede a obtener el volumen del fluido analizado (figura. 5.3), para lograrlo se trazan en el programa Patran las superficies externas que delimiten el modelo, teniendo en cuenta las dimensiones del sistema del bioreactor de perfusión (anillo de 1mm de espesor, tubos de 6mm conectados a la bomba).

El flujo de fluido a través de los poros de ambos andamios fue modelado usando aproximaciones de método de volumen finito mediante el programa Fluent (Ansys). El fluido fue modelado usando una viscosidad ($\eta=1.45 \cdot 10^{-3}$ Pa·s) y una densidad ($\rho=1000$ kg·m⁻³) de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, a T=37°C) [120]. Las condiciones de contornos usadas en la modelación, corresponden a los ensayos de perfusión descritos más abajo (figura 5.2). En las superficies de los andamios y de la cámara del bioreactor las condiciones aplicadas fueron de no deslizamiento, rigidez e impermeabilidad. Solamente una dirección del flujo fue simulada para los máximos valores de flujos y en la salida se asume una presión igual a cero simulando la libertad de movimiento del fluido en esa cara. Se analizan resultados como perfiles de velocidades, tensiones cortantes y razón cortante.

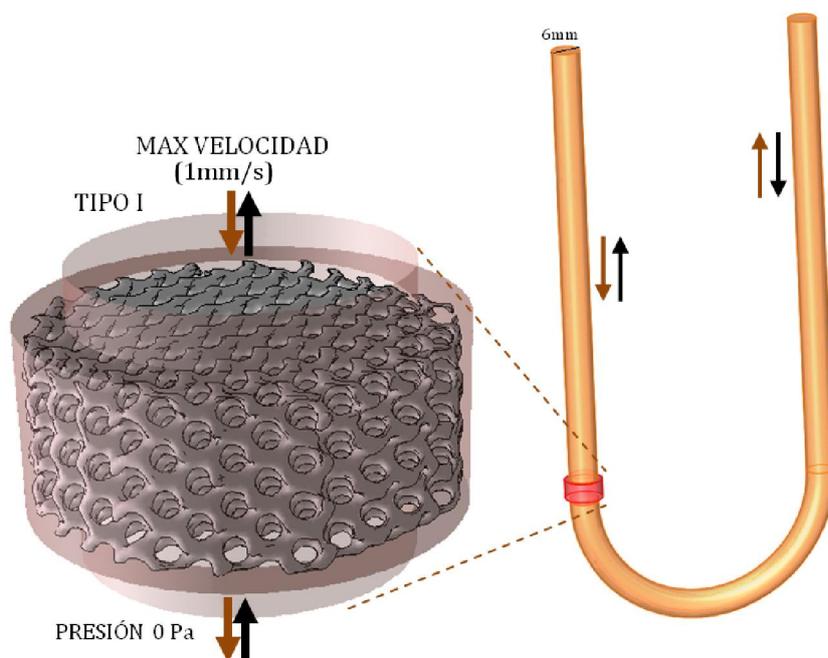


Fig 5.2. Volumen de fluido analizado en el sistema de perfusión oscilante. Las condiciones máximas de velocidad 1mm/s son simuladas.

5.2.3 Descripción del experimento de sembrado celular

Un bioreactor de perfusión diseñado por Wendt et al.[50] fue utilizado para la realización de los experimentos de sembrado celular mediante perfusión oscilante. Se expanden un total de 5 millones de Condrocitos Articulares Humanos (HAC) en 8mL de medio de cultivo (DMEM) y se siembran en los andamios (3 muestras por arquitecturas) durante un periodo de 16h. Un flujo de perfusión de 1.6mL/min fue utilizado en la bomba, correspondiendo con una velocidad del flujo de fluido de 1mm/s (diámetro 6mm).

Las células fueron teñidas con *SYTO-13*, ayudando a dar visualizar el sembrado obtenido, resaltando de color verde las células que están vivas en la superficie del andamio. Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio confocal laser (CLSM, 7500-Zeiss), con un objetivo de 10x y una apertura correspondiente a 10 μ m. Secciones transversales del andamio fueron tomadas hasta una profundidad de 500 μ m en el eje z. Posteriormente las imágenes de microscopía confocal fueron tratadas en blanco y negro y se determinó la densidad celular. Esta densidad celular fue expresada en relación con el área relativa de la imagen cubierta con las células (la fracción de píxeles negros). Para obtener la distribución cuantitativa en la dirección radial, se necesitó primero determinar las coordenadas del centro del andamio. Las imágenes fueron particionadas en forma de anillos equidistantes (incremento radial 100 μ m) desde el centro hasta la periferia del andamio. La densidad de células en cada anillo concéntrico fue determinada, como el área cubierta con células. Los resultados cuantitativos de la distribución de las células son

promediados sobre las 21 imágenes confocales obtenidas para cada muestra. Los momentos polares de inercia para la densidad de células fue calculada usando la ecuación:

$$J = \iint r^2 \rho(\bar{r}) dA = \sum_i^N r_i^2 \rho_i \pi (r_i^2 - r_{i-1}^2)$$

Donde r es la distancia desde el centro del andamio, ρ es función de la densidad de células resultados de los experimentos y $dA = \pi(r_i^2 - r_{i-1}^2)$.

5.3 Resultados

Las imágenes comparativas de los CAD y de las reconstrucciones de μ CT de los diseños de andamios se muestran en la figuras 5.3 a y b. Para el andamio Tipo G se muestra que la porosidad va desde valores de un 85% en zonas centrales hasta unos 35% próximos a la periferia, mostrando un decrecimiento visualmente significativo del tamaño de los poros. Estos tamaños de poros también calculado por medio de los μ CT, resultan en valores de aproximadamente 500 μ m en el centro del andamio y de 250 μ m en la periferia del andamio. Se pudo comprobar que la interconexión de los poros es continua en el interior de los andamios y que el tamaño de los poros es mucho mayor que un supuesto tamaño de las células ($\approx 10\mu$ m), es decir que el bloqueo de los canales interiores de los andamios (acumulación de células) es poco probable que ocurra. El andamio Tipo I presentó menos variación en los niveles de porosidad ($62\pm 1\%$) y de tamaño de poro ($412\pm 13\ \mu$ m). Para este andamio se muestra una oscilación regular de la porosidad radial que está alrededor del valor diseñado por CAD (55%), pero en el análisis de los datos de μ CT se muestra que la porosidad tiene un ligero aumento desde el centro a la periferia (ver resultado de Melchels et al. figura 5.1 [131]). Partiendo de los arreglos de mallas superficiales (paso 3-4, figura 5.3) se obtienen los volúmenes de fluidos a analizar. Los modelos de los andamios son partiendo de los datos de μ CT (paso 2). Un volumen de fluido (0.215mL) con un total de 2 375 010 elementos tetraédricos fue obtenido para el andamio Tipo I y un volumen de 0.209mL con un total de 2 253 778 de elementos tetraédricos para el andamio tipo G.

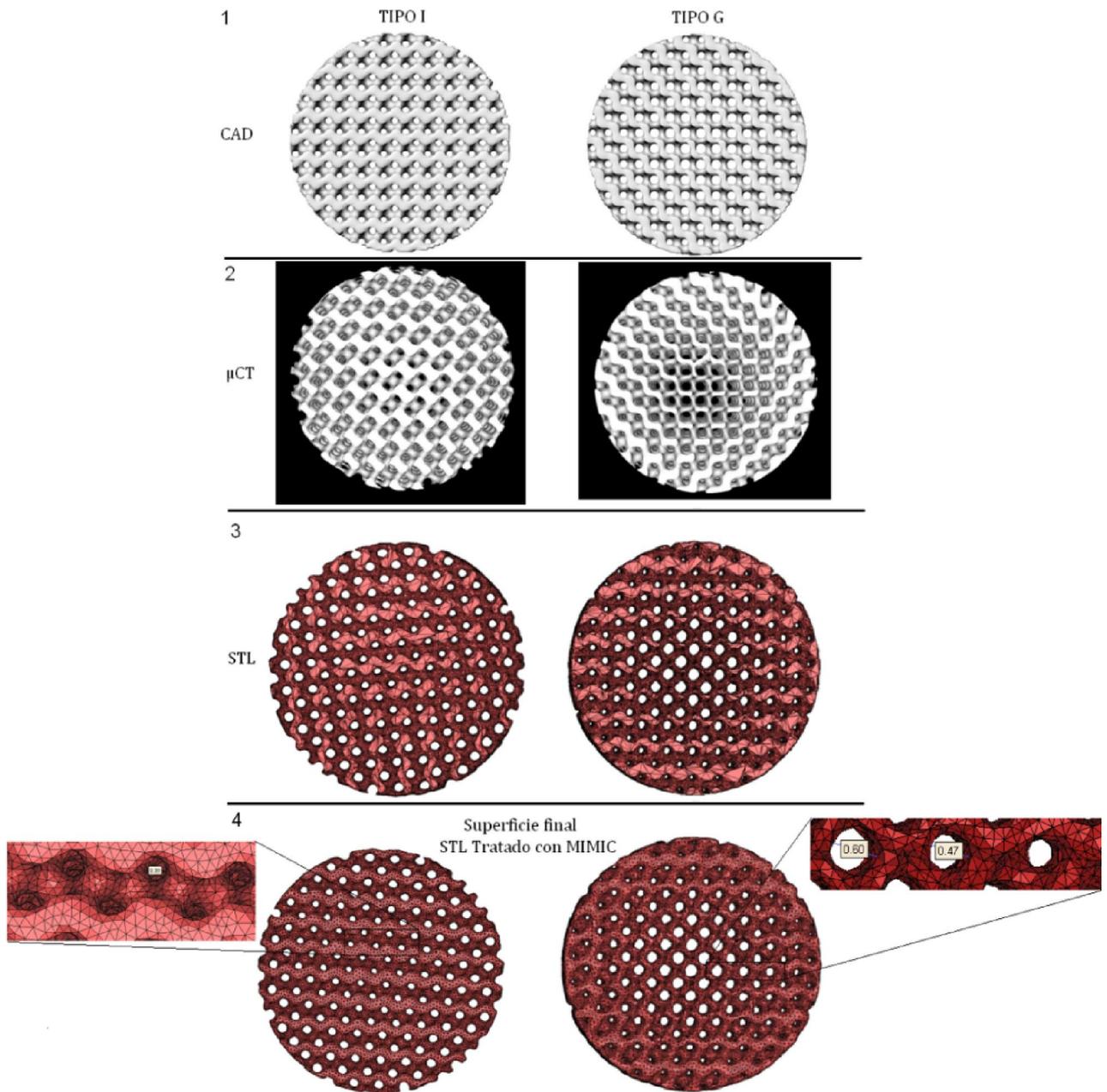


Fig 5.3. Andamios Tipo I (Izquierda) y Tipo G (Derecha). Fases computacionales de creación de los modelos: 1- Diseño CAD utilizado para la fabricación mediante estereolitografía. 2- Reconstrucción a partir de imágenes μ CT (MicroView). 3- Superficie STL para iniciar el tratamiento de las mallas. 4- Superficies tratadas mediante MIMICS (Materialise) y que son la base de partida de los modelos para CFD.

Los perfiles de velocidad son mostrados en la figura 5.4a mediante mapas de colores. La conectividad de las estructuras permite el fácil acceso del fluido a todas las partes del andamio. El número de Reynolds máximo calculado en los modelos es de 0.12, reafirmando así el hecho de que estamos en presencia de un flujo laminar. Una velocidad promedio de 0.86mm/s fue calculada para ambos tipos de estructuras. Existe una mayor velocidad del fluido en el centro de los poros debido a los perfiles parabólicos en cada canal. Para el andamio Tipo I los perfiles de flujos son bastantes uniformes con un máximo de velocidad de 2.8 mm/s.

En el andamio Tipo G este flujo muestra un claro gradiente relacionado con la variación de la porosidad. Para este último, el valor máximo de velocidades en el centro del andamio (≈ 4 mm/s), mientras que hacia la periferia el flujo se mueve con velocidades mínimas muy cercanas a cero. Las tensiones cortantes promedios son muy semejantes para ambos andamios, el Tipo I con 31mPa y para el Tipo G de 27mPa; el valor máximo encontrado fue de 130 mPa (puntualmente en la entrada del fluido (figura. 5.4b). El efecto de las tensiones cortantes en la adhesión ha sido estudiado por diferentes autores [132], [133], pero la tensión cortante crítica reportada para despegar las células de la pared depende también de factores como: el tipo de material y el fenotipo de células, de aquí que se marque un amplio espectro desde 1Pa hasta 3Pa [134].

Un total de 400 ciclos en 16 horas fueron experimentados con las células suspendidas en 8mL de cultivo. Si se considera que el tamaño de una célula es de 10 μm y que el tamaño de poro calculado es de entre 250-500 μm , se asume que la presencia de las células no adheridas, no cambia los perfiles del flujo. Además también se asume que las células suspendidas se distribuyen de manera homogénea en el medio después de cada ciclo. Las células vivas fueron teñidas con *SYTO-13* y visualizadas usando microscopía de confocal (figura. 5.5). En esta figura se observan las células sembradas en una sección cortante del andamio Tipo I (10 μm de espesor de confocal). Las imágenes son obtenidas con una alta resolución 26 mega píxeles, lo cual hace posible distinguir las células individuales.

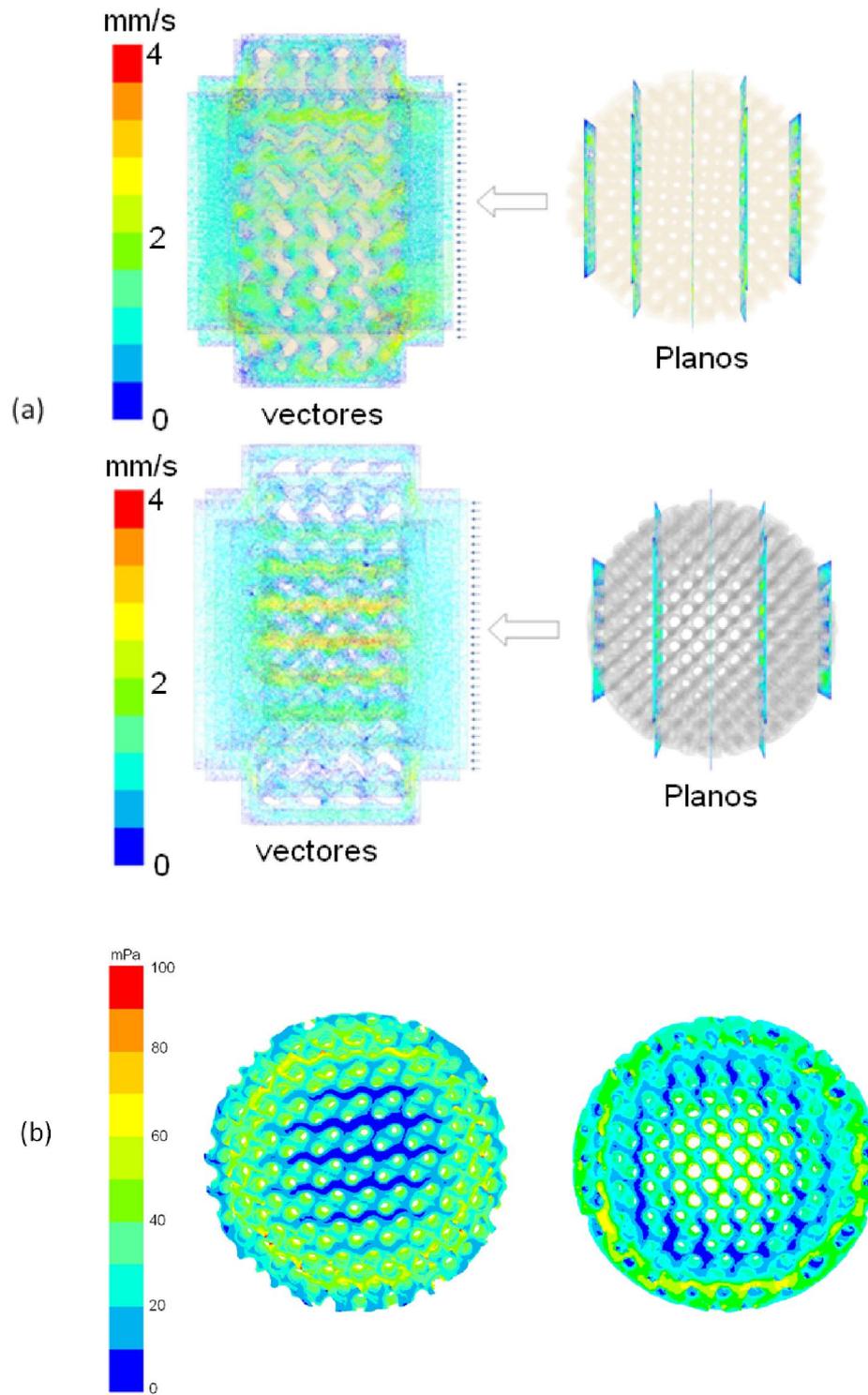


Fig 5.4. a) Distribución de las velocidades de fluidos en diferentes planos de cortes para los andamios Tipo I (Superior) y Tipo G (Inferior). b) Distribución de la tensión cortante del fluido en toda la pared de los andamios tipo I (izquierda) y tipo G (derecha).

Es conocido que la tensión cortante es un parámetro importante en el proceso de adhesión celular. En la figura 5.5b se muestra la razón cortante $\dot{\gamma} = dv/dr$, calculada en las paredes del mismo diseño de andamio pero en una sección cortante. Esta razón de cortantes en las paredes fue usada para describir la velocidad con la cual el flujo de células suspendidas pasa por las superficies de los poros. Las distribuciones de las razones de cortantes indican como las distribuciones de los perfiles de velocidades son reflejados en la distribución de las magnitudes de la cortante. Se muestra como dentro de un poro el rango de la razón cortante está entre 0 y 30s^{-1} (figura 5.5b). La distribución de las razones cortantes vistas globalmente (sección) son distribuidas homogéneamente y existe muy poca diferencia entre los valores que podemos encontrar en el centro con los de la periferia. Estas imágenes locales permiten correlacionar los estímulos provocados por el fluido de perfusión y los valores de densidades de células adheridas, pero es necesario un control puntual del fenómeno. Para un área superficial total de 1200 mm^2 y un volumen de 250 mm^3 ; las áreas de superficies específicas calculadas desde los datos de μCT fueron de 4.8 mm^{-1} para ambos andamios. El área superficial específica depende del tamaño de una unidad básica repetible, donde para menor tamaño de la unidad, el tamaño del poro será menor y el área superficial específica será mayor. Si el tamaño de la unidad es el mismo para ambos andamios $800 \times 800 \times 800\ \mu\text{m}^3$.

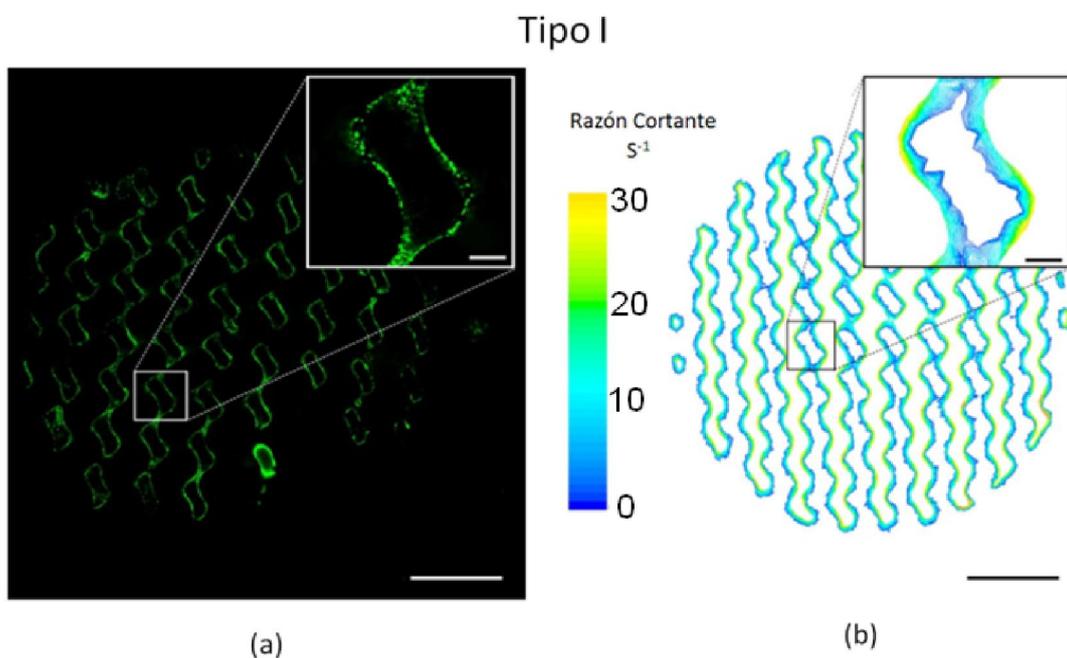


Fig 5.5:a) Imagen de microscopía confocal de un andamio Tipo I después del sembrado. Se muestra la distribución de las células vivas (verde) a través de la sección cortante de los andamios. b) Imagen similar de sección cortante en los modelos de CFD muestra las razones cortantes del fluido distribuidas según un análisis estático bajo las condiciones máximas de flujo. La escala es de 2mm para las imágenes y 200 μm para las imágenes insertadas.

Las imágenes colocadas progresivamente en el eje z se reconstruye en una única imagen (figura 5.6a). Estas imágenes fueron tratadas (blanco y negro (células) y esto se muestra en la figura 5.6b para un espesor de 500 μm . La densidad de células en las imágenes de microscopía confocal dependerá del área superficial disponible para la adhesión. En un caso donde la arquitectura fuera irregular el área superficial disponible en una capa fina como la seleccionada puede variar grandemente en todas las secciones cortantes y esto hace que el trabajo de cuantificación de la distribución de las células sea prácticamente imposible. De aquí que la repetitividad de la arquitectura giroide lleve a una mayor uniformidad y control de la distribución de células permitiendo sus comparaciones.

Un homogéneo sembrado celular es deseable y algunos de los métodos de sembrados han sido solamente diseñados con el objetivo de lograr ese fin [51], [52]. Por otro lado la anisotropía mostrada sobre la superficie del andamio Tipo G es también deseada clínicamente, ya que imita la mayoría de las zonas de transición de tejidos. En la figura 5.6 se muestra de manera marcada que existen valores más altos de densidad de células en el centro de las estructuras Tipo G que hacia la periferia. Y sin embargo para el andamio Tipo I esta distribución es bastante uniforme.

Durante el sembrado, suponemos que el número de células que se adhieren decrecen en el tiempo a medida que decrece la disponibilidad de área superficial de los poros (superposición). Esto puede que afecte en alguna medida a la razón de deposición de las células y la densidad celular finalmente adherida. Desde las imágenes tratadas (figura 5.6b), se calculan las densidades celulares, un 7 % para el andamio Tipo I y un 8% para el andamio Tipo G. También al final de los ensayos se determinó que las eficiencias calculadas respecto a las células suspendidas (5 millones) estuvieron para ambos andamios entre 40% y 60 %. De manera que si comparamos la poca densidad con la alta eficiencia podríamos especular y plantear que no existe una dispersión eficiente de las células y que el sembrado puede que esté ocurriendo formando multicapas y/o *clusters* de células en las superficies de los andamios.

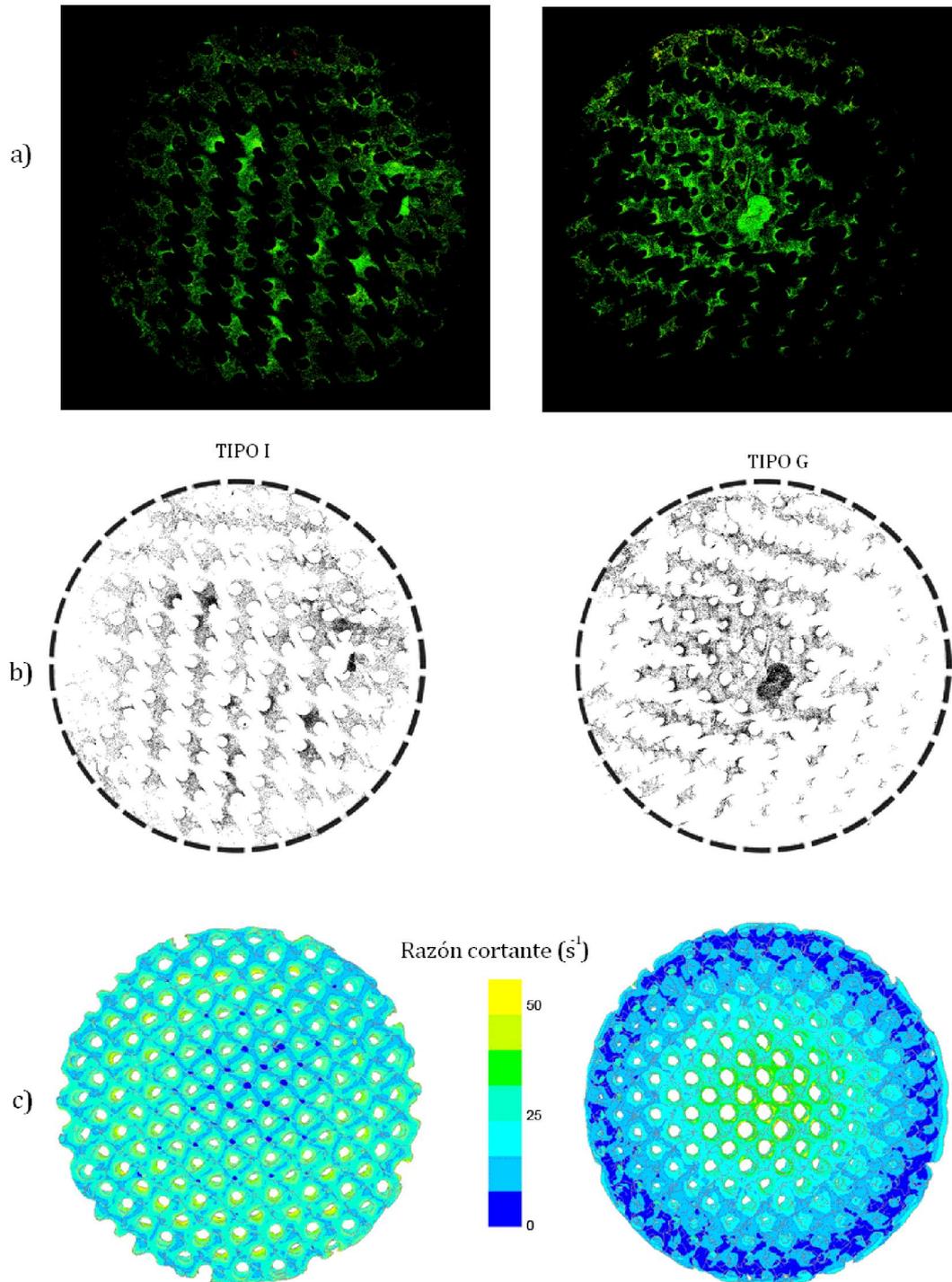


Fig 5.6. a) Distribución de las células mediante imágenes confocal (Tonnarelli et al.[135]. b) Imágenes confocal tratadas en pixeles blancos y negros Melchels et al.[131]. c) Distribución de la razón de cortante en las paredes de los andamios.

5.4 Discusión

La distribución de las células adheridas fue cuantificada para determinar la densidad de células como función de la distancia en la dirección radial desde el centro del andamio. En la figura 5.7 se muestra el histograma comparativo de las distribuciones de los valores máximos del fluido y las distribuciones de la densidad de células en las imágenes tratadas. En el andamio isotrópico (tipo I), una distribución uniforme en la densidad de las células y de los parámetros analizados del modelo son graficados. Los valores de tensión cortantes (15-18mPa) y velocidades (0.7-1.2mm/s) se muestra uniformes para el andamio Tipo I, correspondiendo con una variación de 4-11% de densidad de células. Para el andamio con gradiente de poros, Tipo G, se obtienen distribuciones de valores gradualmente cambiantes del sembrado de células. Una densidad de células (27%) es calculada en el centro del andamio y un valor mucho más bajo (4%) en la periferia de la estructura. Similar comportamiento ocurre con la velocidad (1.6mm/s) y la tensión cortante (24mPa) en el centro y estos valores son mucho más bajos (0.83mm/s; 14mPa) en la periferia del andamio. Por lo que se puede decir que existe alguna relación entre la distribución de estímulos y la distribución de sembrado, pero esto no significa que al estar visualmente relacionadas exista un efecto físico-biológico relacionado con la adhesión en este tipo de sistemas dinámicos.

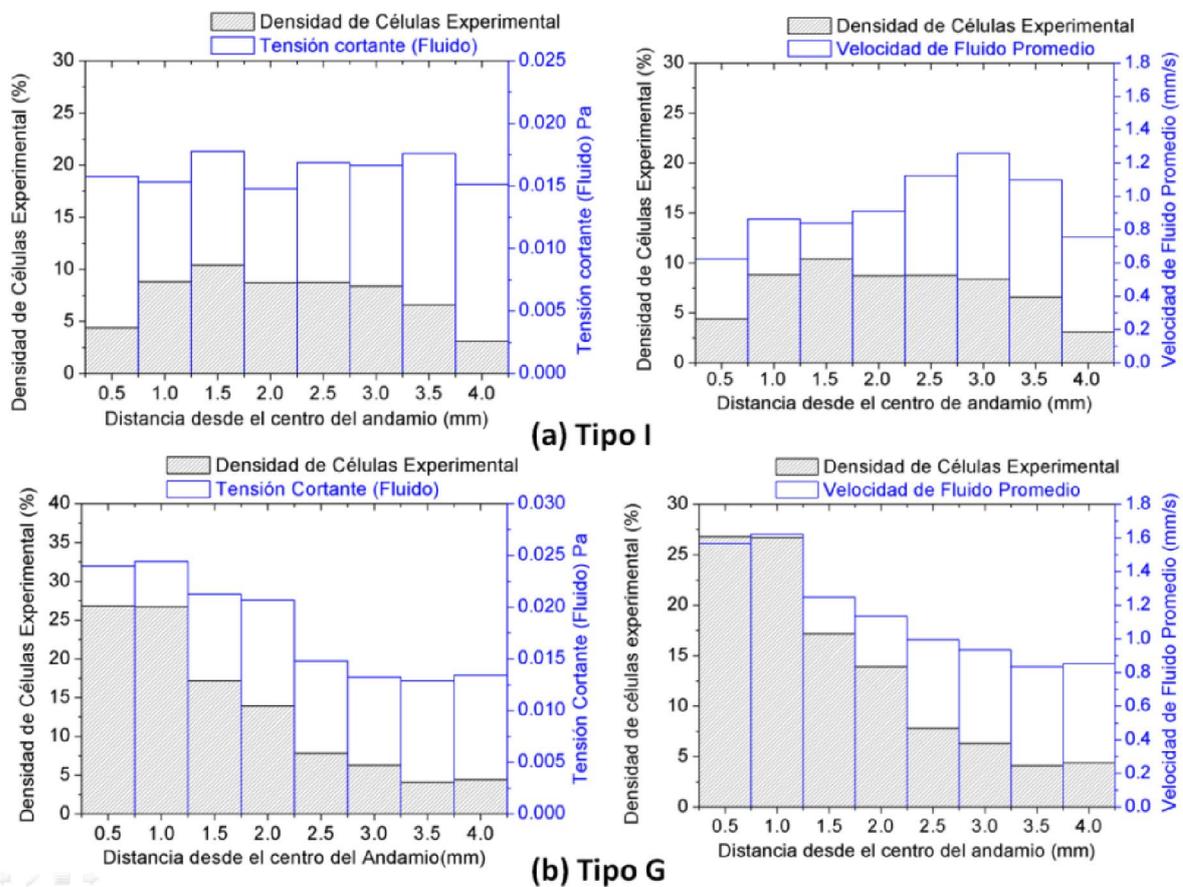


Fig. 5.7: Cuantificación de las distribuciones de las tensiones cortantes y de las velocidades de fluido, comparadas con las densidades de células distribuidas en las superficies del andamio. A la derecha andamio Tipo I, y a la Izquierda andamio Tipo G.

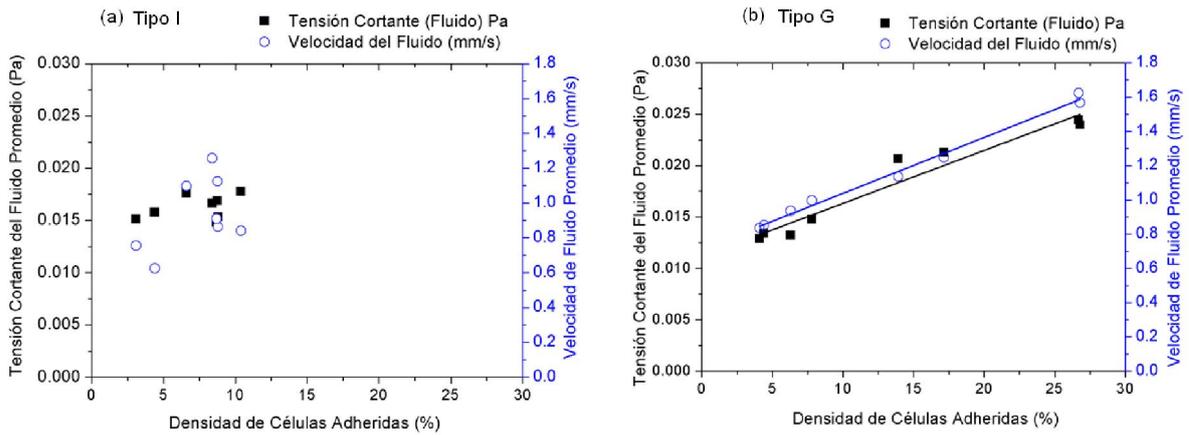


Fig 5.8. Tendencias de la deposición de células en relación con los estímulos fluidos (Tensión cortante, Velocidad de fluido) a) Tipo I b) Tipo G.

Con este estudio se demuestra que mediante el control de la arquitectura del andamio es posible guiar el sembrado celular y obtener una distribución de manera que se pueda prever unas propiedades homogéneas o graduales para el tejido. El rango de tensión cortante se encuentra por debajo de la magnitud que es necesaria para que se despeguen las células, aproximadamente entre 1-3 Pa [136], [137]. Esto último nos permite asumir que para el sistema analizado el despegue de las células no ocurre.

Para los experimentos realizados bajo flujo laminar se puede especular al decir que el comportamiento de las células suspendidas seguirán un perfil de flujo semejante al que siguen las partículas guiadas con un mínimo de transporte advectivo para las direcciones perpendiculares al flujo. Únicamente las células cercanas a las paredes del andamio entrarán en contacto con la superficie. Algunos estudios muestran como las razones de cortante pueden ser una medida importante al representar la velocidad de las células próximas a las paredes[138], [139], y esto pueden ser determinante si son vinculadas a el número de células pueden estar viajando cercanas a las superficie del andamio. Esta correlación es corroborada por ejemplo en la figura 5.7, donde un elevado número de células son adheridas en el centro del andamio Tipo G y donde las razones de cortantes son mayores.

Por otro lado, el hecho de que el mayor número de células adheridas esté en los poros más grandes ha sido mostrado en otros trabajos[140]. La arquitectura del andamio afecta las velocidades de flujo de las células en suspensión y afecta el número de contactos entre las células y la superficie del andamio por unidad de tiempo. Mediante este sistema es posible controlar el efecto de otros diseños de andamios de manera simple con solo estudiar la distribución de los estímulos, y esto es flexible a otras magnitudes de flujos. El problema es que existen otros factores como concentraciones de células en el medio, tipos de células, tipo de material que no se tienen en cuenta y es conocida su importancia durante el sembrado celular[92], [141], [142].

Otros autores como SeHeang et al [143] han estudiado la influencia de incrementos graduales de tamaños de poro, pero en la dirección longitudinal desde 88 hasta 405 μm (tamaños de poros) y 80-94% (porosidades), el material utilizado fue PCL (poli caprolactona) y se fabricó mediante centrifugación, la

arquitectura obtenida no es totalmente regular pero se encuentra bien interconectada. En el estudio de SeHeang et al. [143] destaca que diferentes tipos de células mostraron diferentes comportamientos, por ejemplo hubo un crecimiento de la cantidad de los condrocitos y de osteoblastos en la zona de mayores tamaños de poros y para una zona intermedia entre 186-200 μm , fue más viable para el desarrollo de los fibroblastos. Esto sugiere que el posterior comportamiento de los condrocitos adheridos en las estructuras Tipo I y Tipo G estará guiado nuevamente por la distribución de los tamaños de poros. Por otro lado, es importante la concentración de células en el fluido, pues un incremento del número de células iniciales lleva a un incremento de las células adheridas [144]. Autores como Vunjak-Novakovic [145], plantean que el fenómeno del sembrado celular es importante conocerlo por diversas razones:(1) la necesidad de maximizar el número de células adheridas en el andamio, (2) conocer la cinética de las células adhiriéndose y para (3) controlar la distribución de las células dentro del andamio. De estos puntos el sistema propuesto permite obtener un control de la distribución de las células según los diseños de los andamios y conocer los valores de razones cortantes que pueden estar teniendo lugar en cada zona, esto puede llevarnos a encontrar un valor crítico de este estímulo provoque el despegue de las células de la superficie del andamio.

La configuración del bioreactor (anillo) influye en los perfiles de flujo en los andamios, esto puede tener influencia en la densidad de células que se siembran en las entradas de los andamios. Existen antecedentes de que la configuración del bioreactor influye en la distribución de las células adheridas (perfusión [52]; spinner flask [146]). Para el andamio Tipo G debería ocurrir un fenómeno semejante al que sucede en el capítulo 4 para la estructura Gyroid_RG, pero en este caso no sucede así por diferentes motivos: uno es la entrada del flujo en las simulaciones y otro son la cantidad y tamaños de poros de los andamios. Además el flujo está completamente desarrollado en el tramo inicial y el perfil de flujo laminar es parabólico, creando mayores velocidades en el centro del andamio.

Ahora bien, como solamente un punto en el tiempo (máxima velocidad) ha sido simulado se desconoce realmente cual es la cinética del proceso de sembrado celular. Por esta razón, sugerimos que para el desarrollo de otros modelos se simulen los experimentos de adhesión celular usando un sistema de flujo en función del tiempo (transitorios) [147]. La razón cortante es dependiente de la razón de adsorción y puede ser determinado experimentalmente y numéricamente. El efecto de la arquitectura tri-dimensional de la estructura de los poros podría entonces ser investigada separadamente (micro-fluidos-3D), para un mejor entendimiento y control de las diferentes zonas en la deposición de las células. El desarrollo de estos sistemas modelos es necesario para validar teorías del comportamiento mecano-regulador de las células. Estas teorías son basadas en modelos computacionales en las cuales el comportamiento probabilístico de las células y los enfoques a partir de los estímulos mecánicos pueden alejarnos de los comportamientos biológicos de las células. En esta dirección pueden encontrarse diferentes trabajos que predicen fenómenos de proliferación, diferenciación y la formación de la matriz extracelular [44],[39], [69], [71], [107]. Particularmente se necesita visualizar a las células individuales y calcular su ambiente

hidrodinámico provisto por un marco experimental, ajustado y soportado por algunas de las teorías planteadas alrededor de este sistema.

5.4 Conclusiones

Un sistema modelo es desarrollado para evaluar la influencia de las características del flujo de fluido local en andamios diseñados en la distribución de células después de un sembrado por perfusión in vitro. Bajo las condiciones de perfusión analizadas la distribución de los máximos valores de las tensiones cortantes en las paredes estuvo en correspondencia con la distribución de las células. Obteniendo distribuciones homogéneas para el andamio isotrópico y una variación gradual en el andamio de gradiente de tamaño de poros. Mayor densidad de células correspondió con mayores estímulos y mayores tamaños de poros. El diseño de la cámara de bioreactor mantuvo su influencia en el flujo en la entrada del andamio. Este sistema puede ser fundamental para los estudios de otras múltiples estructuras para aplicaciones en ingeniería de tejidos con organizaciones estructurales bien definidas.

Capítulo 6: Simulación del sembrado celular en andamios porosos mediante el movimiento de partículas

Resumen: El sembrado celular es un momento crítico dentro de la ingeniería de tejidos. Esta fase precede a todos los otros fenómenos que tienen lugar en los cultivos o regeneraciones *in vitro* o *in vivo*. Un elevado número de células y una uniforme distribución de ellas están asociados con resultados beneficiosos para el cultivo. En este capítulo una *nueva metodología* es propuesta para evaluar el sembrado de las células bajo condiciones de perfusión. El proceso de sembrado fue simulado usando un modelo multifases Lagrangiano y siguiendo las condiciones experimentales de perfusión oscilante que se desarrollaron en el capítulo anterior. Se obtiene una descripción cinética del proceso de sembrado y se demuestra el dominio que se puede establecer mediante la morfología controlada de los poros de los andamios. El modelo permite verificar la correspondencia de distribución de las células adheridas con respecto a los resultados experimentales y las posiciones de las células pueden representar una fase inicial de los procesos de mecano-biología que tienen lugar posteriormente.

6.1. Introducción

La ingeniería de tejido inicia con el sembrado de las células en los andamios. Después de este paso el conjunto andamio-células es cultivado y finalmente implantado[148]. Después del sembrado se desea obtener un alto número de células vivas y una adecuada distribución, ya que estos aspectos son asociados con un apropiado crecimiento del tejido[90]. Esta alta densidad de células es vinculada con la posibilidad de reducir el tiempo de cultivo o con el incremento de la formación de tejido. De manera más específica es conocido que la alta densidad de células está vinculada con una mayor producción de matriz extracelular, con una mayor mineralización de hueso[149] y con una mayor formación y estructuración del tejido cartilaginoso [150]. Además, la distribución inicial de las células sobre el andamio está fuertemente relacionada con las propiedades mecánicas finales del tejido [52].

Por otro lado, el uso de las células humanas como fuente para la experimentación, encarece los protocolos en el laboratorio y requieren de la optimización o aumento de la eficiencia del proceso del sembrado celular. De aquí que sea crucial maximizar la utilización de estas células obtenidas desde las biopsias en pequeñas cantidades[74].

En capítulos anteriores se ha demostrado que el control de las características de los bioreactores y fundamentalmente las propiedades de los andamios 3D, juegan un papel fundamental en el sembrado

Este capítulo se ha publicado en parte en: *Simulation of cell seeding within a porous scaffold under perfusion using computational fluid discrete particles motion*. **Andy L. Olivares** and Damien Lacroix. *En revisión en Tissue Engineering Part C: Methods*.

celular. Estos controles son importantes además para garantizar una mejora en la migración, proliferación y diferenciación de las células, que llevarán a la obtención final del tejido deseado.

Normalmente el sembrado celular se realiza a través de una deposición estática de las células reportándose eficiencias muy variables desde 18 % hasta 85 % [51], [79], [149], [151-153]. El problema principal en este proceso simple es que la distribución de las células no es homogénea, presentándose en ocasiones más células adheridas en la periferia del andamio y muy pocas en el centro o en el interior del andamio [51], [151], [153]; o puede que se depositen en un solo lado del andamio, debido a la precipitación de las células suspendidas en el medio [92]. Por otro lado, encontramos reportes que muestran altos valores de eficiencias y de uniformidad en la distribución de las células para los diferentes sistemas de bioreactores [154]. De los bioreactores presentan especial interés los de perfusión directa debido a que han demostrado ser los más efectivos para la distribución de las células en andamios 3D [76]. La eficiencia del sembrado encontrada para este último puede estar entre 40 y 90 % en concentraciones de células de entre 10^5 y 10^7 células/mL [51], [79], [151], [155]. Uno de los principales problemas para estos sistemas es la selección de los parámetros como: concentración de células en el medio, razón de flujo de fluido o parámetros relacionados con la sincronización de las oscilaciones para el sembrado celular [74], [92]. Por ejemplo: Wendt et al [51] concluyó que para el sistema diseñado por ellos a altas velocidades de flujos las células puede que no tengan tiempo a adherirse al material, también plantean la necesidad de controlar que no sea tan baja esta velocidad llegando a ser un régimen estático. Pero realmente las magnitudes de flujo de fluido que pueden estar guiando estos fenómenos son desconocidos y dependerán de los estímulos mecánicos que se crean en el interior de los andamios.

Los ensayos experimentales conllevan a variabilidades inevitables y esto sumado a la complejidad de los diferentes fenómenos lleva a la necesidad de desarrollar un modelo teórico que permita idealizar y optimizar los procesos dinámicos del sembrado celular. En la literatura es posible encontrar estudios enfocados en esta dirección. Por ejemplo Li et al. [153], desarrollaron un modelo matemático siguiendo sus resultados experimentales. Ellos evaluaron la máxima densidad del sembrado probable bajo experimentos de filtrado de células, encontrando una correlación matemática empírica para sus experimentos. El modelo matemático sugiere que la variación espacial de las densidades de células puede llevar a variaciones semejantes de las concentraciones espaciales de productos metabólicos y nutrientes en andamios en 3D. Otro modelo simple e empírico del sembrado celular fue el propuesto por Vunjak-Novakovic et al. [145], ellos proponen ciertos comportamientos cinéticos y posibles mecanismos del sembrado celular relacionados con la formación de los agregados para ingeniería de tejido de cartílago utilizando un bioreactor del tipo *spinner flask*.

Estos modelos conocidos hasta el momento, describen los resultados específicos de los autores y se hace necesario un modelo que prediga el posible comportamiento de las células en un ambiente dinámico. Un modelo de estas características sería muy útil para inicializar los modelos ya existentes usados para describir la mecanobiología en ingeniería de tejido. Hasta el momento, el sembrado celular

numéricamente hablando es asumido, ya sea como uniforme[44], [70], o de manera aleatoria[68], [70], o distribuido estadísticamente [69]. Se ha demostrado que este fenómeno no es trivial y que en él están inmersos muchos factores como: biomaterial, porosidad, distribución de poros, tipo de células, condiciones de sembrado, etc, que marcan diferencias significativas durante el proceso de sembrado.

En el capítulo 5, se desarrolló en el marco del proyecto “*STEPS*” un sistema modelo capaz de realizar aproximaciones del sembrado celular en un sistema de perfusión [156]. Se combinan diferentes disciplinas como: el control de la morfología del andamio (prototipado rápido), se calculan los máximos estímulos provocados por la perfusión (método CFD) y se obtienen las imágenes experimentales y eficiencias experimentales después del sembrado[156]. Para el estudio presentado en este nuevo estudio se hará referencia a algunos de los resultados obtenidos en el capítulo anterior; esto debido a que se ha replicado las condiciones experimentales anteriores con el **objetivo** de desarrollar una nueva metodología que permita predecir y describir el sembrado celular bajo condiciones de perfusión. La hipótesis es que mediante un modelo de sembrado celular se podrá optimizar el proceso de sembrado a través de la descripción física del fenómeno y para lograrlo se ha propuesto discretizar las células y proponer un proceso de adhesión controlada.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1 Construcción de los modelos y descripción de las condiciones del sembrado

En el capítulo 5, se describe que un total de aproximadamente 5 millones de condrocitos articulares humanos fueron suspendidos en 8mL de medio de cultivo y que se aplicó un flujo de perfusión oscilante durante 16h[156]. Dos diseños de andamios fueron fabricados por estereolitografía con fotopolimerizable poli (D, L-láctico) (PDLA) (densidad del sólido, 1279 kg/m³, [117]), permitiendo obtener un andamio con un diseño isotrópico (Tipo I) (figura 6.1a) y con un tamaño de poros constante en la dirección radial y otro andamio con un gradiente de tamaño de poros en la dirección radial (Tipo G) (figura 6.1b), ambos con unas dimensiones globales de 8 mm de diámetro y 4 mm de altura.

Los modelos para el estudio fueron creados partiendo de las iso-superficies de μ CT obtenidas digitalmente con el programa MicroView. Las mallas superficiales fueron tratadas y el volumen desarrollado representó a todo el medio de cultivo en el experimento y fue desarrollado en los programas Mimics (Materialise), Patran (MSC. software), Fluent 12.1 (Ansys). Los modelos fueron desarrollados con un total de 3 142 140 de elementos mezclados (tetraedros y pentaedros) para el andamio Tipo I y con 3 066 382 elementos mezclados (tetraedros y pentaedros) para el andamio Tipo G. El volumen total de fluido (V_f) analizado para ambos andamios fue de 9 mL.

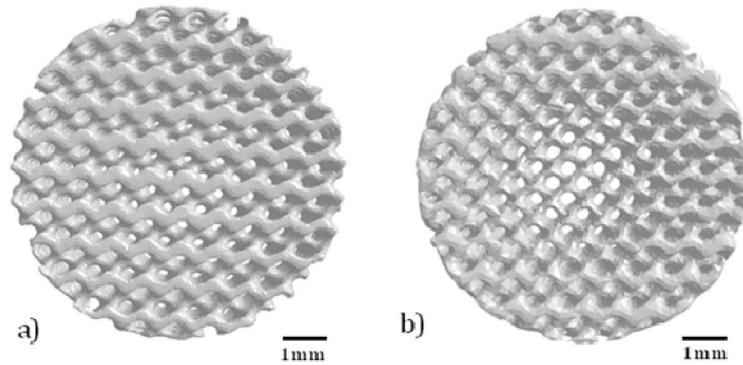


Fig 6.1. Las superficies reconstruidas desde las imágenes de μ CT de los andamios. (a) Distribución del tamaño de poro isotrópico [Tipo I] (b) variación gradual de los poros en la dirección radial [Tipo G].

Los valores de los tamaños de poros determinados en el capítulo anterior fueron para el Tipo I, $412 \pm 13 \mu\text{m}$; y para el Tipo G (en el centro $\approx 500 \mu\text{m}$ y en la periferia $\approx 250 \mu\text{m}$) y porosidad (Tipo I, $62 \pm 1 \%$; Tipo G, $56 \pm 3 \%$). El área superficial total disponible para la adhesión de las células es de 635 mm^2 para el andamio *Tipo I* y de 659 mm^2 para el andamio *Tipo G*, calculadas ambas a partir de las mallas de elementos finitos.

6.2.2 Descripción numérica del sembrado celular de perfusión

El proceso de sembrado celular fue simulado usando un modelo discreto lagrangiano implementado en Ansys Fluent 12.1 [157] y que sigue una aproximación numérica *Euleriana-Lagrangiana*. El medio de cultivo DMEM a 37°C (viscosidad, $\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$; densidad, $\rho = 10^3 \text{ kg/m}^3$) [120] es tratado como un fluido de medio continuo y laminar guiado por la ecuación de Navier-Stokes (Ec. 6.1) y la ecuación de continuidad (Ec. 6.2), donde u y ∇p son la velocidad de fluido y el gradiente de presión respectivamente. El medio de cultivo es la fase principal del modelo y es la encargada de arrastrar y guiar el movimiento de la fase dispersa, que en este caso serán las células. Las células serán simuladas como partículas esféricas inertes de diámetro de $d_c = 10 \mu\text{m}$ (similar al tamaño promedio de un condrocito [145]) y se aplica una viscosidad a las células de $\eta_c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ [158], una densidad de las células de $\rho_c = 10^3 \text{ kg/m}^3$ [159], y una tensión superficial $\gamma_s = 0.03 \text{ N/s}$ [160].

El movimiento de las células en el fluido fue gobernado mediante la ecuación del movimiento traslación de las partículas (Ec. 6.3), no se tiene en cuenta la posible rotación de las células en el medio. En la Ec. 6.3 los términos relacionados fueron u , velocidad del fluido; u_c , velocidad de las células; $F_D(u-u_c)$, fuerza de arrastre por unidad de masa de células y F_L , que es la fuerza de suspensión. Una fuerza de arrastre esférica (F_D) fue aplicada como fuerza principal que gobierna el movimiento de las células (Ec. 6.4). Esta fuerza depende de las propiedades del fluido y de las células, del número de Reynolds (Re) y del coeficiente de suspensión (C_D) (Ec. 6.5) que es calculado mediante coeficientes a_1, a_2, a_3 , en este caso para partículas esféricas para diferentes Re , estos valores son propuestos por Morsi y Alexander [161].

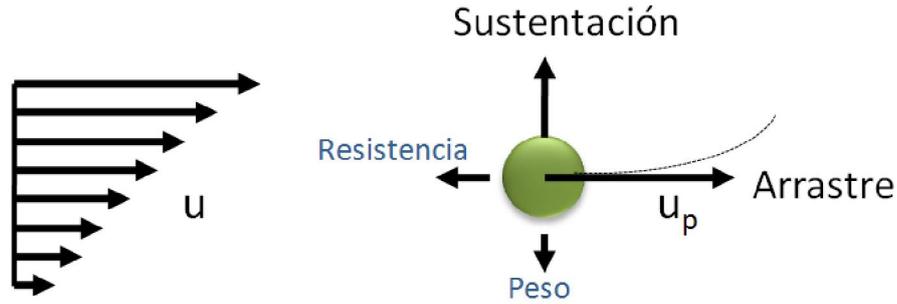


Fig 6.2. Representación esquemática de las fuerzas que están actuando en la partícula y que guían su movimiento. Fuerza principal la de arrastre y fuerza estabilizadora la de sustentación. Las otras fuerzas son despreciadas.

$$\rho \vec{u} \cdot \nabla \vec{u} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{u}; \quad (6.1)$$

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0; \quad (6.2)$$

$$\frac{du_c}{dt} = F_D(u - u_c) + F_L; \quad (6.3)$$

$$F_D = \frac{18\eta}{\rho_c d_c^2} \frac{C_D Re}{24}; \quad (6.4)$$

$$C_D = a_1 + \frac{a_2}{Re} + \frac{a_3}{Re^2} \quad (6.5)$$

La fuerza de sustentación de Saffman (Ec.6.6), resulta del efecto de las tensiones cortantes del fluido y se muestra como una distribución no homogénea de presiones alrededor de la partícula. Su dirección es perpendicular al movimiento del flujo (figura 6.2), lo cual ha sido vinculado con la estabilidad del fenómeno deposición [162]. Esta fuerza depende de la velocidad del fluido, de la velocidad de la partícula de la razón cortante $\gamma = du / dy$, del diámetro de la célula y de las propiedades del fluido (Ec. 6.6). Hay que señalar que F_L , será positivo en la dirección y si $u > u_c$ [157], [163].

$$\vec{F}_L = \frac{2K_L \eta^{\frac{1}{2}} \rho d_{ij}}{\rho_p d_p (d_{lk} d_{kl})^{\frac{1}{2}}} (\vec{u} - \vec{u}_p) \quad (6.6)$$

Otras fuerzas tales como las causadas por los efectos de la gravedad y de los impactos entre las células son despreciadas. El efecto de la fuerza de gravedad para cada partícula no es importante debido a que el tamaño de las partículas es muy pequeño ($d_c=10\mu m$) y no es relevante comparado con la energía con que el fluido arrastra a las células en cada oscilación, además analíticamente se puede demostrar que según las propiedades que se han asumido para las células ($\rho_c = \rho$), la fuerza de gravedad es cero (ver anexo c). Por otro lado las interacciones entre las partículas son despreciadas, debido a que la volumen total de las células es muy pequeño (0.026mL) comparado con el del fluido (9mL) y por lo tanto el efecto que puedan

generar sus impactos no van a ejercer ningún cambio en el movimiento de todo el flujo. Otras fuerzas como las brownianas o termoforéticas han sido despreciadas debido a que no nos encontramos en presencia de gases o de partículas submicrónicas que sería condiciones más específicas para aplicar estas fuerzas (ver más detalles en el anexo C).

Un flujo de fluido laminar, incompresible y transitorio ha sido aplicado, donde inicialmente un total de $N_c \approx 5$ millones células fueron suspendidas mediante inyección bajo un movimiento constante de fluido desde una de las caras de los modelos (figura 6.3a). Para lograr una uniformidad en la suspensión de las células, un total de 845 inyecciones cada 0.15 s (a una velocidad de 1 mm/s) se realizaron teniendo en cuenta que las células inyectadas no deben tocar las paredes del andamio, cuando finalicen estas inyecciones. Después de la suspensión de las células en paso anterior y de manera continuada se aplica un movimiento oscilante del fluido simulando la acción de la bomba peristáltica en el experimento de sembrado celular (figura 6.3b). El control de las condiciones de flujo que se han descrito se logra mediante la aplicación de un flujo de masa \dot{m} impuesto en ambos extremos de los tubos de silicona. El máximo flujo \dot{m}_{max} corresponde con la velocidad máxima 1 mm/s y que es multiplicada por la función cosenoidal que dependerá del periodo (T) y del tiempo real (t) (Ec. 6.7) (figura. 6.3c), para la modelación de la fase de flujo oscilante (ver subrutina anexo D). El periodo usado fue igual a 144 s correspondiendo con la relación proporcionada por los experimentos de 400 ciclos en 16 h reportado para los experimentos de capítulo 5 [156]. El paso de tiempo usado para la lectura de los datos durante el flujo alternante fue de 36 s. Para cada paso de tiempo la eficiencia del sembrado celular (e) fue calculada (Ec. 6.8) como el porcentaje que representan las células adheridas (N_a) respecto a las células iniciales suspendidas (N_c).

$$m_f = m_{f_{max}} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right) \quad (6.7)$$

La concentración de células en el fluido (C) (Ec.6.9) fue también calculada como la relación existente entre las células que se van quedando suspendidas en el volumen inicial de medio de cultivo (V_t). El modelo fue simulado hasta un total de 2 h de sembrado celular correspondiente con 50 ciclos. Para el análisis de la distribución de las células en la superficie del andamio, el número de células normalizado en relación al volumen correspondiente a anillos de espesor 100 μ m y de esta manera fueron comparadas con las densidades de células de las imágenes confocal de los experimentos del capítulo 5.

$$e = \frac{N_a}{N_c} * 100 (\%) \quad (6.8)$$

$$C = \frac{N_c - N_a}{V_t} (\text{Cells/mL}) \quad (6.9)$$

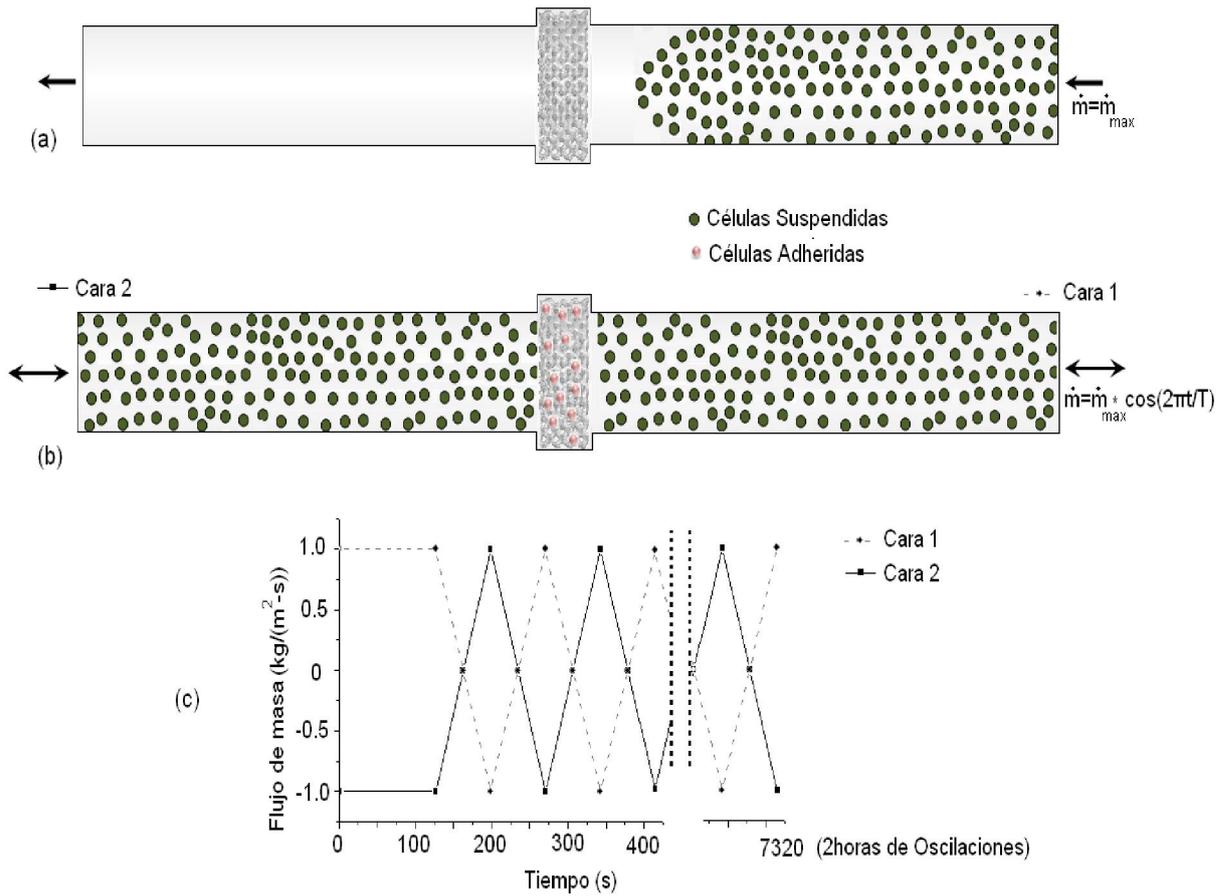


Fig 6.3. Esquema de las condiciones dinámicas a) Proceso de inyección bajo velocidad constante de 1mm/s. Representación del volumen de fluido llenado por las células después de la última inyección, teniendo en cuenta que estas no toque la superficie del andamio. b) Dispersión de las células durante las oscilaciones del fluido. c) Gráfica de las magnitudes de las condiciones tanto para la inyección como para los ciclos que se repiten durante 2 horas de experimentación. El máximo flujo es igual a $1 \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-2}$, donde la velocidad normal de $u_n=1\text{mm/s}$.
 Nota: Las esferas que representan a las células en los esquemas, así como el volumen de fluido representado no están a escala.

6.2.3 Condiciones de la interacción célula-andamio

Las células suspendidas y en movimiento cuando impactan con paredes diferentes a las del andamio (caras de condiciones de perfusión, cámara o tubos del bioreactor) rebotan según un coeficiente de restitución igual a 1 aplicado en las direcciones normal y tangencial. Se comprueba la no existencia de adhesión en estas paredes durante la simulación. La interacción de las células con la superficie del andamio (biomaterial) es un fenómeno muy complejo, pero para este primer estudio se ha simplificado en términos de adhesión (cuando las células impactan el andamio) o no adhesión; de manera que se espera obtener un máximo valor del sembrado de células, para este tipo de arquitecturas. También como las interacciones entre las células y los biomateriales no es un fenómeno de carácter agresivo, durante el tiempo analizado no existirá ningún otro fenómeno capaz de cambiar las propiedades del biomaterial, como podrían ser erosión, corrosión, etc.

La adhesión de las células fue controlada mediante la formulación Wall Film (WF)[157], [164] implementada en FLUENT 12.1 (Ansys). La teoría de WF es una formulación diseñada para la simulación de la creación finas capas de combustibles en los motores de combustión interna, a partir de las gotas que impactan con las paredes internas del motor. La combustión es un fenómeno donde intervienen altas temperaturas T_w [temperatura de ebullición, T_b] y donde la energía de impacto (E) suele ser alta (Fig. 6.4a). La adaptación de esta teoría a los fenómenos biológicos en cuestión es simple, debido a que las magnitudes tanto de temperaturas como de energías de impactos son muy bajas y al evaluar los posibles resultados a obtener figura 6.4, obtenemos que siempre las células que impacten con las paredes del andamio quedaran adheridas. Además esta condición *stick*, asume que las células mantienen su forma esférica en la superficie donde se pegan, este comportamiento corresponde al comportamiento observado para condrocitos después del sembrado [145], siendo además este el tipo de células que se van a simular en este estudio. Las otras variantes (*spread*, *rebound*, *splash*) (Fig. 6.4b) pueden ser objeto de estudio para trabajos futuros donde se desee discernir entre diferentes comportamientos de las células en las paredes después de adheridas e incluso puede estudiarse la variante de separación de las células de la superficie.

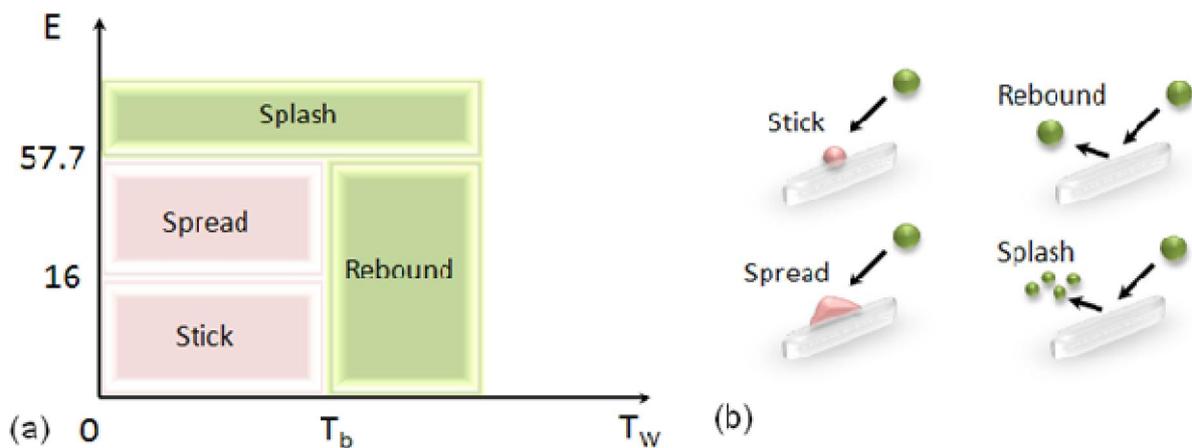


Fig 6.4. a) Posibles comportamientos de adhesión que están asociados a la condición de Wall Film Fluent (Ansys) manual [157]. b) Esquemas de los varios regímenes que pueden ser identificados (modificado desde Stanton et al [164]).

6.3. Resultados

El movimiento del fluido arrastra a las células hasta el interior del andamio. La oscilación del fluido hace que las células suspendidas cambien de dirección, pero no todo en una línea paralela al flujo del fluido, esto debido a la acción de la fuerza de suspensión. Los puntos analizados para las diferentes oscilaciones se mantienen en régimen laminar en las cercanías de los andamios con números de Reynolds Re máximos de ($Re_{Tipo I} = 0.54$; $Re_{Tipo G} = 0.52$). Los perfiles de velocidades son transitorios y no homogéneos, por lo tanto la energía que tiene en movimiento a las células cambia constantemente. En las figuras 6.5 y 6.6 se pueden observar las distribuciones de células en los modelos de sembrado generados. Se muestran las células que están suspendidas (marrón) y adheridas (verde), para 15 min y 1 hora de perfusión de fluido. Se puede observar en las imágenes que para 15 min de oscilaciones aún existe una gran cantidad de células cercanas al andamio, por lo que aún en este tiempo la probabilidad de que las células continúen impactando y adhiriéndose en los andamios es elevada. Sin embargo si analizamos pasada una hora de oscilación encontramos que existen relativamente pocas células alrededor de los andamios y que la frecuencia de las oscilaciones puede que no garanticen que todas las células estén atravesando la arquitectura del andamio. Ahora bien, aunque la influencia del tiempo en el comportamiento de las células suspendidas en el fluido fue muy similar visualmente (figuras 6.5 y 6.6), ya se puede observar como para el andamio con gradiente de tamaños de poros (Tipo G) se obtuvo una distribución de células que corresponde con la distribución de los poros y con los análisis realizados en el capítulo 5. Se muestra en la figura 6.6 como hay mucho menos cantidad de células en el exterior del andamio y como esto puede ser una combinación del anillo del bioreactor y de los pequeños tamaños de poros disminuyendo el transporte de células en la zona exterior del andamio Tipo G. La distribución de las células (verde) es mostrada mediante los puntos que representan las posiciones de los centros de las partículas esféricas, debido al alto coste computacional que significa la visualización de estos 5 millones de esferas.

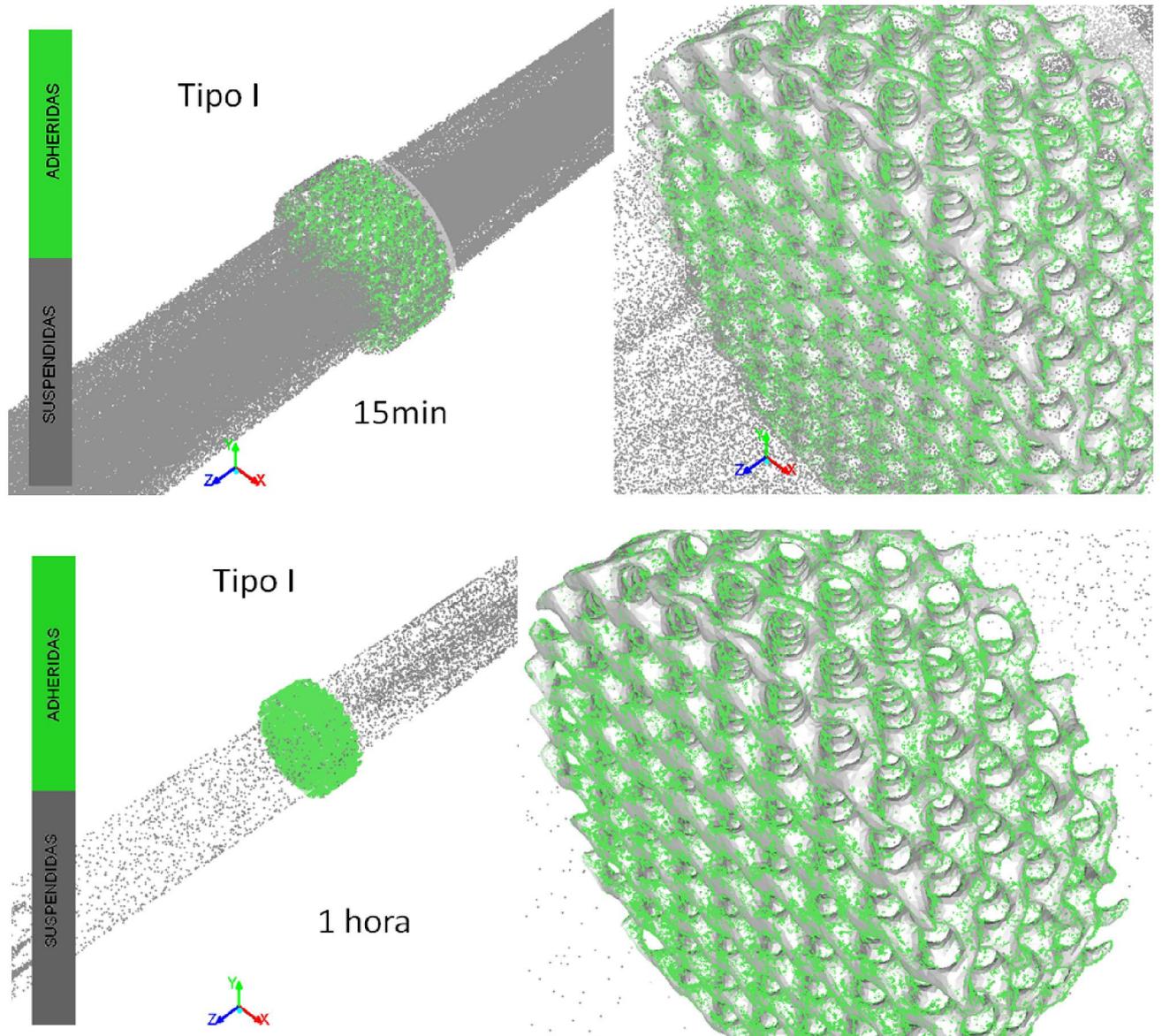


Fig 6.5. Distribuciones de las partículas en el medio de cultivo en dos diferentes tiempos de las oscilaciones 15min y 1 hora para el andamio tipo I. Se muestran las células que se van adheriendo al andamio y las que continúan suspendidas. Nota: Imágenes tomadas a partir de la interfase gráfica del modelo (puntos centrales de las esferas de $10\mu\text{m}$)

Solamente graficando las posiciones de las células que están adheridas se pueda observar desde una vista superior la evolución de la distribución de las posiciones de las células en el tiempo (Fig.6.7). Los tiempos seleccionados para visualizar el desarrollo del sembrado fueron 4.8 min, 15min, 30min, 2 h. Se muestra el efecto de la morfología del andamio en la distribución de las células. Desde el mismo inicio, aparece una distribución de células uniforme en el andamio Tipo I y que continúa aumentando su densidad en el tiempo pero manteniendo la uniformidad.

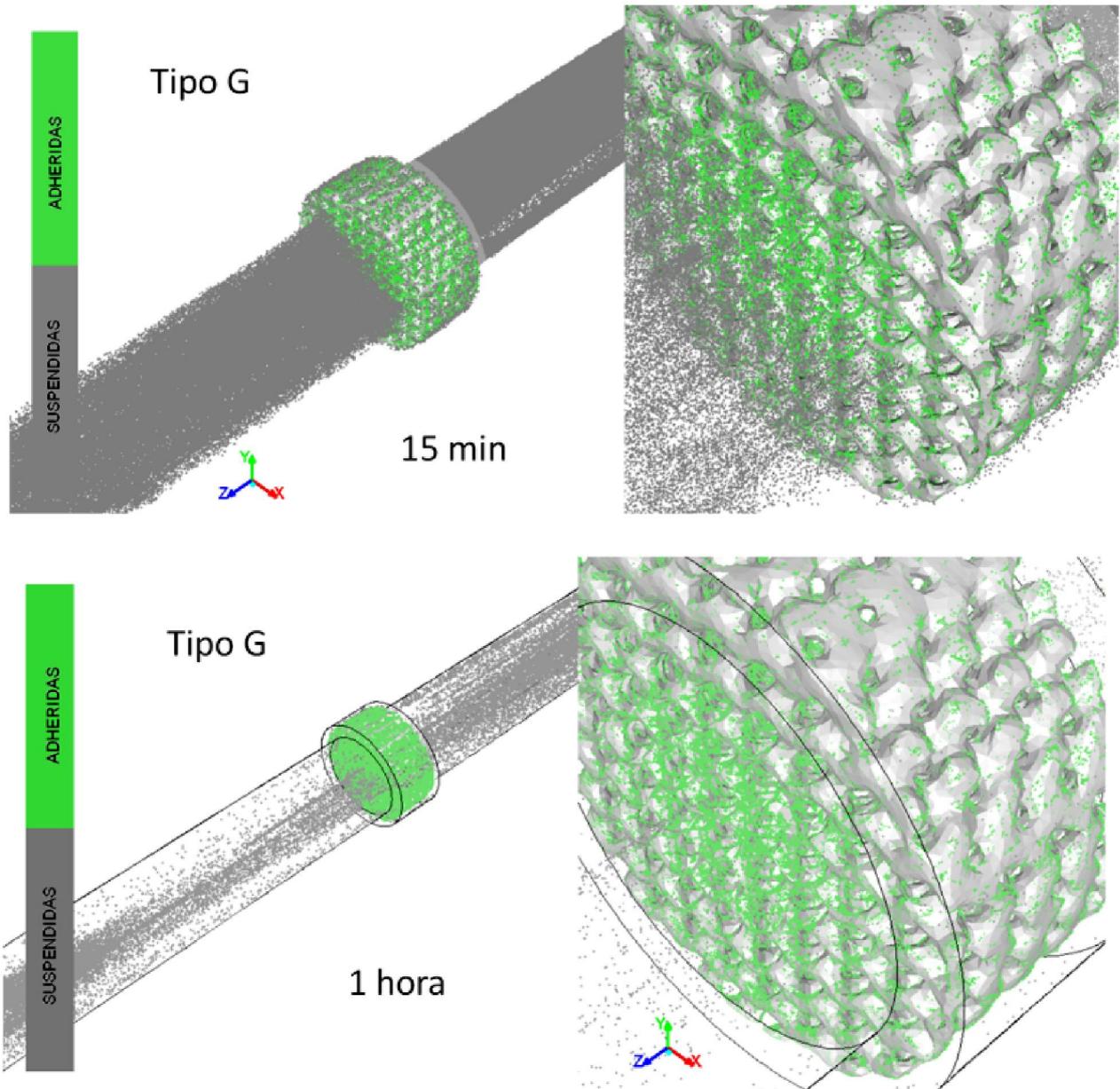


Fig 6.6. Distribuciones de las partículas en el medio de cultivo en dos diferentes tiempos de las oscilaciones 15min y 1 hora para el andamio tipo G. Se muestran las células que se van adhiriendo al andamio y las que continúan suspendidas. Nota: Imágenes tomadas a partir de la interfase gráfica del modelo (puntos centrales de las esferas de $10\mu\text{m}$)

También en la figura 6.7 se puede dar seguimiento al número de células que se han ido depositando y se muestra como inicialmente las deposiciones son significativamente mayores en el primer cuarto de hora (1.5-2 millones de células) comparado con lo que ocurre en el resto del tiempo simulado (≈ 0.5 millón), esto de manera general para los dos andamios.

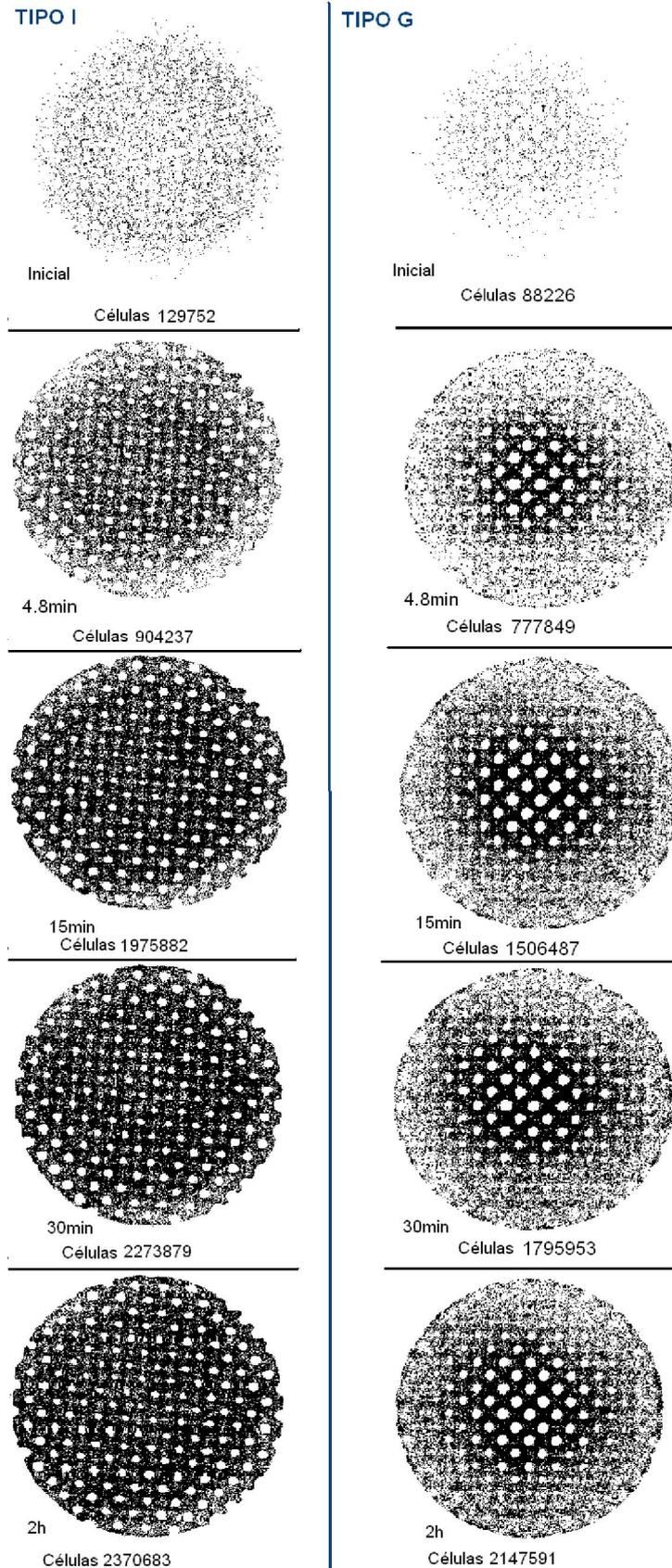


Fig 6.7. Vista superior de la posición de todas las células adheridas en el andamio Tipo I y para el andamio Tipo G. El número de células adheridas en mostrado para algunos tiempos específicamente.

La variación de eficiencia del sembrado de células durante las 2h de experimentos que han sido simuladas es mostrada en figura 6.8. Durante este tiempo la eficiencia máxima alcanzada para el andamio Tipo I es de 47.54%, mientras que para el andamio Tipo G, la eficiencia es igual a 43.15%. Los valores de las eficiencias calculadas en el modelo están en correspondencia con el rango obtenido experimentalmente en el capítulo 5, entre 40 y 60%, pero teniendo en cuenta de que experimentalmente se analizó un tiempo mayor de 16h. Según la grafica que describe el comportamiento de la eficiencia del sembrado en el modelo, para los primeros 30min (12 ciclos), el sembrado experimentó un crecimiento considerable, hasta que alcanza un determinado equilibrio. Este equilibrio no significa que no se adhieren más células, sino que no es un número significativo en comparación con el número inicial (ver figura. 6.7). En un análisis detallado del modelo en los primeros 15 minutos se puede observar que existe cierto grado de repetitividad en el comportamiento del número de células que se adhieren en cada paso de las oscilaciones (figura 6.9). Este comportamiento si lo observamos por ciclos se muestra como va disminuyendo la cantidad de células que se van depositando en el tiempo.

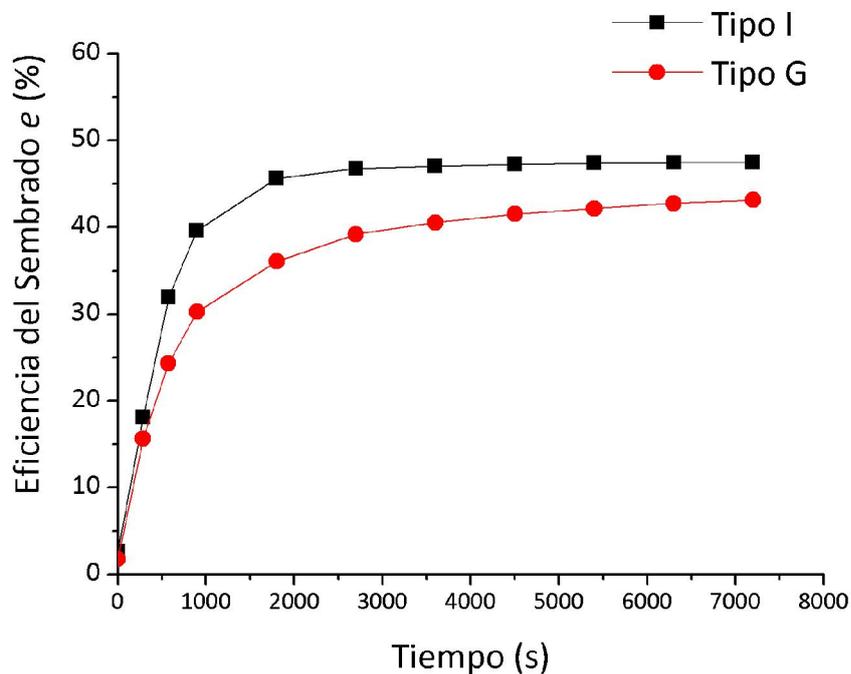


Fig 6.8 Eficiencia del sembrado celular bajo perfusión para 2h

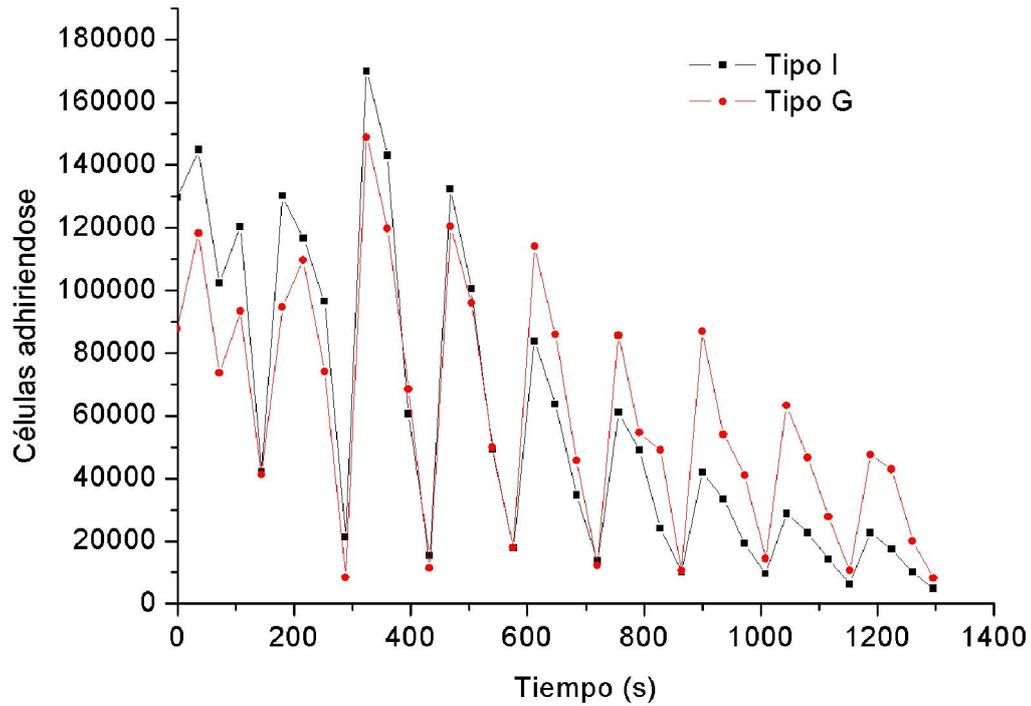


Fig 6.9. Número de células adheriéndose en cada paso de tiempo para ambos andamios. Gráfico para la zona inicial de las oscilaciones correspondiente a 9 ciclos.

Siguiendo el comportamiento mostrado por las simulaciones, se busca un modelo matemático capaz de describir el proceso específico que se observa para cada andamio, de manera tal que pueda ser controlado en un ensayo experimental. Para lograrlo se analiza la concentración de células en el fluido, la cual es inicialmente controlada (C_0) y la cantidad de células que se adhieren al final de la experimentación (C_a). La concentración de células en el fluido C , disminuye siguiendo un comportamiento exponencial para ambas estructuras (figura 6.10). Las curvas muestran un ajuste de $R^2=0.996$ para el andamio Tipo I y un $R^2=0.985$ para el andamio Tipo G, confirmando la tendencia exponencial. En la figura 6.6, se toma como referencia que para 2h se obtendrá el valor mínimo de células suspendidas en el medio. Este valor se fija en cero para obtener la dependencia gráfica del proceso de sembrado, es por esta razón que en la ecuación propuesta para optimizar el sembrado (ec.6.9), la máxima concentración es igual a $C(0)=C_0-C_a$.

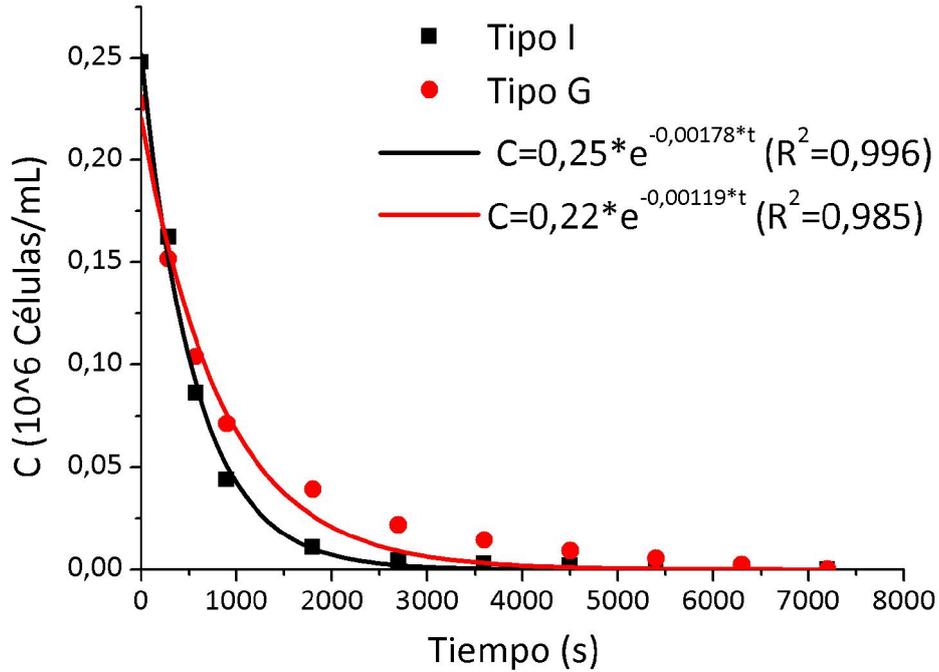


Fig 6.10 Concentración de células en el medio de cultivo. Tendencia exponencial ajuste y valores para cada uno de los andamios estudiados.

$$C_{Tipo I}(t) = 0.25e^{-0.00178t} \quad (6.10)$$

$$C_{Tipo G}(t) = 0.22e^{-0.00119t} \quad (6.11)$$

$$C(t) = (C_0 - C_a)e^{\kappa t} \quad (6.12)$$

En la Ec 6.12 que es una generalización de las Ecs 6.10 y 6.11, κ es un valor constante que dependerá del tipo de estructura, de material y de las condiciones. Mediante esta ecuación determinada numéricamente a través del modelo y con la realización de una experimentación donde se determine C_0 y C_a , es posible determinar el tiempo óptimo para obtener un máximo de número de células adheridas.

$$(\%) = \frac{A_{BlackPixel}}{A_{ring}} * 100 \quad (6.13)$$

$$(\%) = \frac{Na * V_{célula}}{A_{ring} * l_{andamio} * (1 - \phi)} * 100 \quad (6.14)$$

Para comparar los resultados de los modelos con los resultados experimentales (figura. 6.11), se han tomado los resultados de las distribuciones al final de los sembrados. En los experimentos las imágenes de confocal fueron tratadas y los píxeles negros representarán bidimensionalmente la densidad de células, estos valores fueron analizados en correlación con el radio de las muestras subdivididas en anillos concéntricos de $100\mu\text{m}$ de espesor (Ec. 6.13). Estos valores fueron comparados con la densidad de células equivalente en los modelos propuestos, pero a diferencia del experimental es necesario normalizarlo en relación al volumen que representan los anillos de $100\mu\text{m}$ (Ec. 6.14), debido al control tridimensional de las posiciones de las células.

Las densidades de células son mostradas en las figuras 6.12 y 6.13, en relación al radio de los andamios. La uniformidad es evidente en el andamio Tipo I (figura 6.12), aunque los valores de densidades presentan valores totalmente iguales. No obstante se puede dar como válido este resultado teniendo en cuenta que se ha intentado en el modelo simular el máximo valor de deposición de las células. Para el andamio Tipo G, la distribuciones son similares con mayores valores de densidad en el centro del andamio y menores en la periferia, pero en aproximadamente 2mm de la periferia los valores experimentales son mostrados por encima de los del modelo.

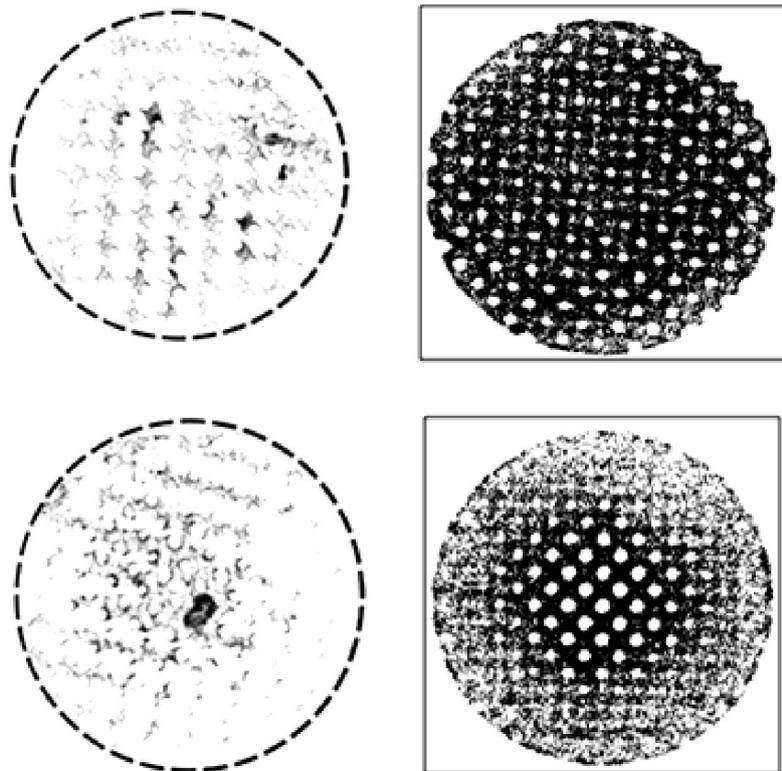


Fig 6.11 Distribuciones de células comparadas entre los experimentos (izquierda) y los modelos de partículas (derecha). Se muestra el andamio Tipo I en las imágenes superiores y el andamio Tipo G en las inferiores.

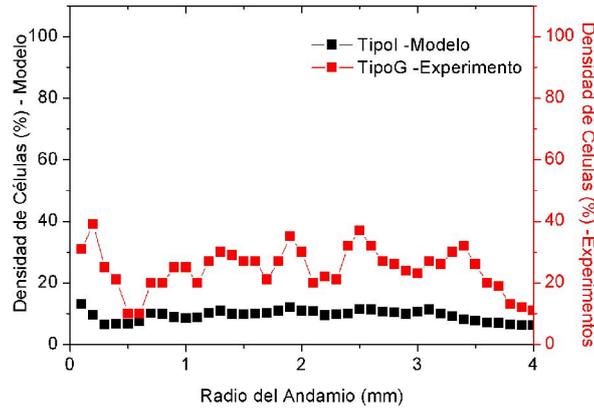


Fig 6.12. Distribución de las células en 2 h (Simulación) comparada con la distribución de las células (Experimental) después de 16h (Tipo I)

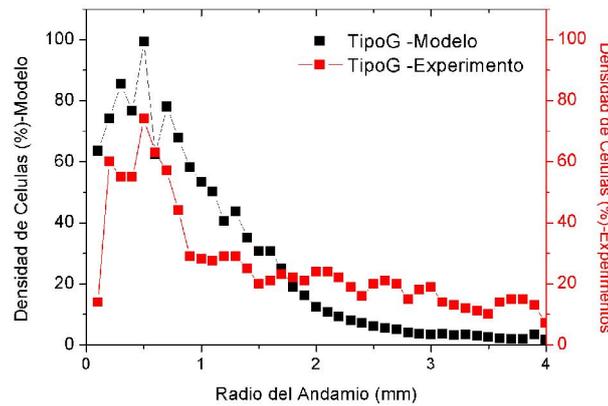


Fig 6.13. Distribución de las células en 2 h (Simulación) comparada con la distribución de las células (Experimental) después de 16h (Tipo G)

La penetración que están teniendo las células en los andamios pueden también ser graficadas, según las coordenadas z de las posiciones adheridas (figura 6.14). Las diferencias más significativas están relacionadas con el transporte de las células como se muestra en las figuras 6.14 a y b existe una distribución más uniforme en el interior de los poros para el andamio Tipo I que para el Tipo G. Es evidente que el flujo de fluido arrastra a las células por el centro del andamio Tipo G y realiza una mayor distribución en el andamio de poros uniformes. El efecto de las oscilaciones para ambas estructuras muestra mayores concentraciones de células en las entradas de los andamios (figura 6.14c).

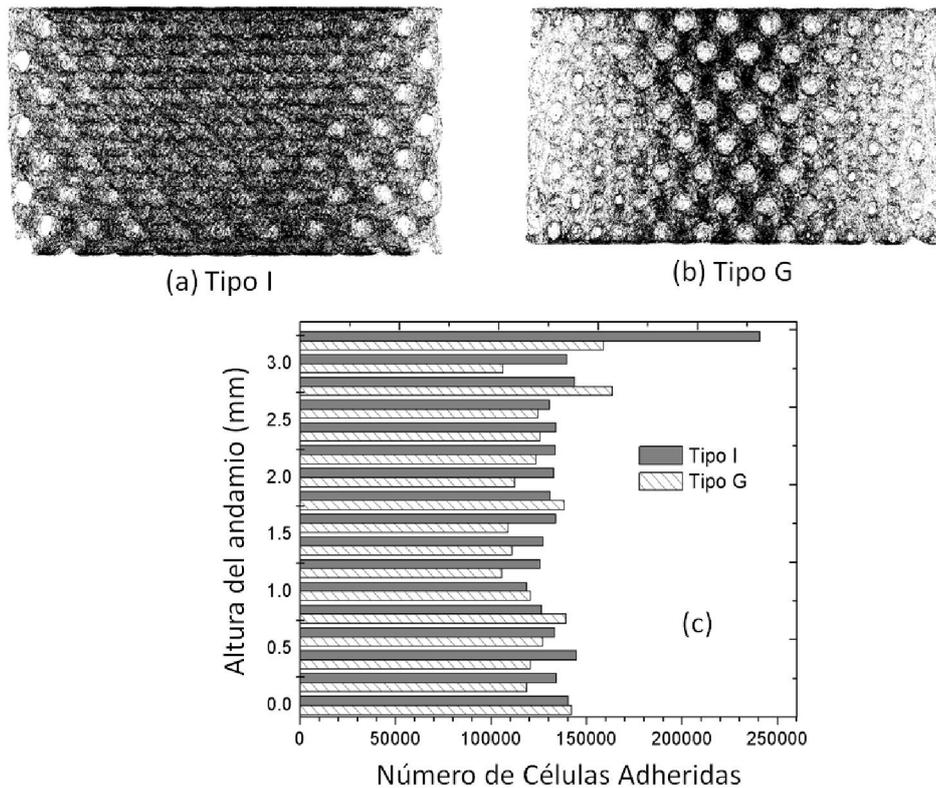


Fig 6.14. Distribución de las células en la altura de los andamios (a) Tipo I y b) Tipo G. c) gráfica que muestra la cantidad de células que se encuentran en subdivisiones de 200µm en la altura del andamio.

6.4. Discusión

Este estudio está motivado por la necesidad de optimizar el sembrado celular en andamios 3D. Se conoce que son muchos los factores que están vinculados con este fenómeno y que su complejidad ha conllevado a que no se conozcan antecedentes de modelos que se hayan desarrollado específicamente para simular el sembrado celular. La mayoría de los modelos numéricos de mecanobiología aplicada a la ingeniería de tejidos asumen una distribución aleatoria y por lo tanto se está condicionando el inicializado de otros fenómenos. Debido a que el sembrado celular es un proceso crítico en el control del cultivo in vitro en este estudio se ha desarrollado una nueva metodología que puede ser de gran utilidad para la predicción del sembrado celular.

La física del estudio está basada en vincular el desplazamientos de las células bajo perfusión con el movimiento de partículas que son arrastradas por un fluido y simuladas a través de una formulación Lagrangiana. Existen antecedentes de intentar estudiar experimentalmente la velocidad de las células mediante PIV (Particle Imaging Velocimetry) encontrando relación entre los desplazamientos de las partículas y las posiciones de las células todo esto en 2D (cámara micro fluidica)[165]. Para la deposición de las células se aplicó una formulación denominada Wall Film, la cual es mayoritariamente utilizada en

ingeniería mecánica para la descripción de la deposición de combustible en la cámara de motores de combustión [164], [166], [167]. Únicamente el rango donde la partícula que impacta se adhiere es simulado, pero la formulación presenta otras variantes que puede expandir este modelo de sembrado celular donde se incluyan diferentes energías superficiales o topografías que podrían ser relacionadas con el tipo de biomaterial utilizado y con la posibilidad de extensión de las células en las superficies (ver figura 6.4).

Según los modelos desarrollados los valores de eficiencia del sembrado bajo perfusión para ambos andamios Tipo I y Tipo G en 2h están dentro de los valores reportados en la literatura [50], [74], [168], para ensayos de perfusión, pero específicamente coinciden con los valores encontrados para los experimentos [156], aunque el tiempo analizado para estos últimos fue de 16h. Este resultado es debido a que el modelo maximiza la cantidad de células que pueden estar adhiriendo, ya que todas las células que impactan se adhieren y se presume que en la realidad no es así el comportamiento.

Se puede observar que el equilibrio de células adheridas que se alcanza a los 30 min. Este comportamiento corrobora la hipótesis de que es posible la optimización del fenómeno de sembrado celular mediante un modelo numérico. Las diferencias de las morfologías de los andamios llevan a diferentes valores de la eficiencia, indicándonos que el número de células que está impactando es diferente para las diferentes morfologías, esto puede ser observado con mayor énfasis si utilizáramos morfologías totalmente diferentes o irregulares. La optimización por lo tanto queda sujeta a la morfología del biomaterial poroso y por lo tanto no es posible generalizar los comportamientos en el tiempo.

No obstante y como se muestra en el estudio es posible hallar una relación exponencial (Ec. 6.12) que describe la cantidad de células que van quedando suspendidas y mediante la cual se podría seleccionar un tiempo de experimentación óptimo y una concentración inicial óptima en correspondencia con lo que se desee finalmente. Esto teniendo en cuenta como se ha planteado anteriormente obtener mediante el modelo el factor κ relacionado con la estructura en cuestión.

Aunque el desarrollo de esta metodología está pendiente de validar, verificar y parametrizar, se han realizado comparaciones con los ensayos experimentales que se exponen en el capítulo 5. Los resultados para ambos andamios corroboraron que la distribución de las células en el interior de los diseños de andamios corresponde con las imágenes que se tomaron después de la experimentación. Estos resultados dan pie a pensar que la metodología es correcta, pero es necesario más estudios que permitan eliminar las limitaciones relacionadas sobre todo con las condiciones de adhesión de las células, donde se incluyan más factores biológicos y químicos. Asumir una adhesión completa podría entenderse como válido en estas condiciones debido a que los máximos estímulos mecánicos estudiados en el capítulo 5 mostraron valores por debajo de los valores reportados para que se despeguen las células de la pared del andamio.

El comportamiento exponencial reportado en este estudio para las células que se van quedando suspendidas en el medio, también ha sido reportado anteriormente por otros autores, pero estos han usado

otros sistemas de sembrado celular (filtración [153]; spinner flask [145]). Además ellos han graficado directamente sus resultados experimentales y no intentan proponer un modelo más universal.

Una mayor cantidad de células son sembradas en los poros que tienen mayor tamaño e intuitivamente esto puede ser contradictorio si se analiza desde el punto de vista de que en menores tamaños de poros existe una mayor área superficial para que ocurra la adhesión. El modelo por lo tanto señala que es el transporte de las células la base fundamental que guía la distribución del sembrado y en este caso como los mayores flujos se encuentran en los poros centrales del andamio Tipo G, es por donde viajan mayor cantidad de células. Ahora bien, los beneficios que puede producir este incremento de la concentración inicial de las células pueden estar limitados finalmente con el área superficial disponible en el andamio, aunque mediante el modelo también se observan clúster de células, lo cual podría ser una de las razones por las cuales la cantidad de células adheridas se reduce en el tiempo. Otro punto es que en la imagen de confocal para el andamio Tipo G se muestra una elevada cantidad de células que podrían ser en parte el resultado de una proliferación, aún así las correlaciones continuarían siendo válidas.

Las células distribuidas en el volumen interior del andamio es pequeño comparado con el volumen del fluido donde están suspendidas las células, lo cual puede provocar que para algunas células se les dificulte llegar con el periodo de oscilación aplicado hasta las inmediaciones del andamio. El proceso de oscilación efectivamente mejora la perfusión en andamios 3D. Este modelo multifases puede convertirse en una herramienta simple y capaz de estudiar el fenómeno bajo condiciones de perfusión siempre teniendo en cuenta que es necesario conocer la morfología del material y el diseño de la cámara del bioreactor. La tendencia futura es incluir un modelo de separación que permita diferenciar entre los tipos de biomateriales a partir de su afinidad a la adhesión y extensión de las células, esto puede ser implementado mediante los valores de tensiones cortantes.

6.5 Conclusión

Una nueva metodología basada en el movimiento de partículas en un medio fluido es propuesta para la simulación del sembrado celular bajo perfusión directa. Las distribuciones de las células fueron muy similares a la obtenida en los experimentos. La eficiencia del sembrado mostró valores similares a los obtenidos experimentalmente en un tiempo menor. La necesidad de la optimización del sembrado celular nos lleva a que este proceso es controlable mediante tendencias exponenciales, debido a que alcanza un cierto valor de equilibrio en el tiempo.

Capítulo 7: Conclusiones y perspectivas futuras

7.1 Resumen de los principales resultados

En esta tesis doctoral se han llevado a cabo varios estudios enfocados en el área de la ingeniería de tejidos. Todos los trabajos se encargan de predecir los fenómenos que tienen lugar en condiciones experimentales. La idea principal ha sido dirigida al control de la estructura de los andamios, pero intentando en todo momento vincular las condiciones in vitro, los resultados experimentales y el posible comportamiento de diferentes tipos de células.

El primer estudio desarrollado en el **capítulo 3**, fue basado en la necesidad de seleccionar un bioreactor para desarrollar un cartílago articular de un diámetro siete veces superior a lo que hasta el momento se han usado experimentalmente. Numéricamente se determinó que un escalado de un bioreactor que había aportado excelentes resultados para la generación de cartílago [50] no garantiza la uniformidad de la distribución de fluido sobre el andamio. La variante seleccionada consiste en aplicar múltiples entradas de flujos que garantice una mejor distribución de las velocidades de entradas en el andamio.

El estudio muestra la importancia del diseño de la cámara del bioreactor sobre todo si se desea obtener tejidos funcionales y con dimensiones y formas acorde al defecto a sustituir clínicamente. Las simulaciones numéricas han permitido la reducción de los costes de la aplicación de los protocolos experimentales. Se demostró que el bioreactor seleccionado fue efectivo para la construcción del cartílago articular, el cual presenta además propiedades mecánicas interesantes y manejabilidad para su aplicación clínica.

Como un complemento importante en este capítulo se desarrollo una formulación simple que permite la simulación de un material poroso (andamio) dentro de un modelo CFD. Se idealizó el poroso como si este fuera un fluido muy viscoso, simulando así la resistencia al paso del fluido. Esta formulación es posible de ser aplicada a diferentes aplicaciones dentro de la ingeniería, geología, bioingeniería; pero es muy importante tener en cuenta de manera estricta los volúmenes a simular. Además, aunque la zona del andamio se comportó como si estuviéramos en presencia de una fase saturada la fase sólida y la fluida, hay que señalar que no se trata de una formulación poro-elástico y por lo tanto el comportamiento y el tratamiento no debe ser el mismo.

Debido a que mediante el estudio anterior la estructura del andamio fue homogenizada, se decidió estudiar la escala de los poros de los andamios. Por eso en el **capítulo 4** es estudiada la influencia de las morfologías de los andamios, así como las variaciones de las condiciones de cultivo en resistencia mecánica, estímulos relacionados con la diferenciación o la distribución de fluido para el sembrado

celular. Se demostró la importancia que tiene el control de las estructuras durante el cultivo, además se incluyen los estudios fluidos como un paso importante a tener en cuenta para la caracterización de los andamios.

Las estructuras hexagonales presentaron mayor rigidez que los diseños giroide. Las distribuciones de los estímulos tanto desde la fase sólida como fluida son mas homogéneamente distribuidos en las estructuras tipo hexagonal. La orientación de las estructuras hexagonal es un factor a tener muy en cuenta a la hora de ser estudiadas o implantadas debido a que presentan comportamientos muy diferentes entre ambas posiciones. Las estructuras giroide a demás de brindar la posibilidad de obtener una estructura totalmente homogénea, se muestra como la posibilidad de obtener gradientes graduales de tamaños de poros. En general la accesibilidad del fluido fue mejor en las estructuras giroide, siendo esto vinculado a una uniforme distribución de células en la fase de sembrado y con la llegada de nutrientes y oxígeno a todas las partes del interior del andamio.

En este capítulo se estudia además la posibilidad que puede brindar las diferentes estructuras en la diferenciación de diferentes tejidos, mediante la aplicación un modelo de mecano-regulación. Se encontró que las variaciones de un fenotipo a otro son más sensibles a las variaciones de velocidad del fluido. También se muestra como las estructuras bajo las condiciones aplicadas presentan mayor posibilidad de diferenciarse en tejido óseo y solo en casos aislados superar el 60% de obtención de cartílago. Se plantea la posibilidad de obtener mapas que permitan para cada estructura determinar las condiciones óptimas para la diferenciación de un linaje osteogénico o condrogénico. Estructuras con gradientes de poros son estudiadas para los diseños giroides mostrando la posibilidad de obtener zonas de variación gradual de estímulos y de posibles tejidos. Esto plantea la importancia que puede significar este tipo de diseños para sustituir defectos como los osteocondrales.

Debido a que la estructura giroide permite la posibilidad de las variaciones graduales similares a las naturales y como mostró mejor accesibilidad del fluido, fueron escogidas para el **capítulo 5** dos tipos de estructuras para realizar estudios de la fase de sembrado celular. Basados en tres cuestiones fundamentales: control de estímulos, estructuras y condiciones experimentales. Con estas premisas fue diseñado un sistema modelo que podría ser el primer paso para vincular los resultados de estímulos mecánicos y la distribución de sembrado en andamios 3D bajo condiciones de perfusión.

En este estudio se desarrollan los modelos de los andamios completos a partir de las imágenes de microCT y se incluyen algunos detalles de la cámara del bioreactor en los modelos de CFD. Se muestra como para mayor tamaños de poros y donde se alcanzan los mayores valores de estímulos mecánicos, la concentración de las células después de sembrado es mayor. En el andamio con una distribución homogénea de poros se mostró una distribución también uniforme de las células.

Se concluye que el transporte de las células que ha sido descrito a través de los perfiles de la máxima velocidad de fluido es el factor que guía la distribución de las células después del sembrado. Se muestra la relación existente entre tensión cortante de fluido, velocidad media del fluido y la densidad de células.

Aunque el fenómeno que sucede no es descrito en este estudio, se muestra un método simple que puede ayudar a determinar según la estructura real del andamio cual es la relación que existe entre los estímulos específicos y la densidad de las células.

El **capítulo 6** tiene su base en los resultados obtenidos en el capítulo 5; debido a la relación existente entre los máximos valores de estímulos, las estructuras y la distribución de las células se decidió desarrollar una nueva metodología que permita simular el proceso de sembrado celular. Los resultados mostraron que la metodología es verificable mediante los resultados experimentales obtenidos anteriormente. La discretización de las células como partículas esféricas permite el control de las posiciones de las células que se han adherido al andamio. Esto puede convertirse en un punto de partida para los modelos de mecano-biología.

Se desarrolló a través de la nueva metodología la evolución del proceso de sembrado celular, donde la tendencia de la concentración de las células suspendidas en el fluido es exponencial y es relacionada además del tiempo y con un factor que puede estar representando la distribución de los poros en los andamios. Se ratifica el transporte de las partículas como un factor clave en el sembrado celular y se muestra como la oscilación es un proceso necesario para la penetración de las células en el interior del andamio. La relación existente entre la columna de fluido y las oscilaciones tienen una elevada influencia en la cantidad de células que llegan a la superficie del andamio.

7.2 Limitaciones de los estudios

En esta tesis todos los estudios son basados en métodos numéricos y son muchos los aspectos que son necesarios asumir para la simplificación y para un mejor entendimiento de los fenómenos. No obstante a medida que van evolucionando los estudios que se han presentado en esta tesis se ha ido intentando suprimir algunas de estas limitaciones.

Inicialmente en el capítulo 3 se asume una morfología de andamio con propiedades homogéneas mediante la introducción de la viscosidad aparente. Al no tener en cuenta la morfología del andamio la distribución de las magnitudes de fluido en el interior del andamio no se pueden vincular con su efecto en el cultivo del cartílago articular. También las condiciones son aplicadas para velocidades de flujos máximos estables en el tiempo.

En el capítulo 4, estudiar la morfología del andamio es el objetivo principal del capítulo y por tanto una de las limitaciones es solventada. No obstante durante el estudio se presentan otras restricciones, como por ejemplo que las estructuras son ideales a partir de los diseños CAD, conociendo que la fabricación es un factor importante, esta idealización es una limitación. Los elementos representativos de volumen son seleccionados para cada diseño, pero se asume que la entrada del fluido en el andamio completo es uniforme, aunque ya se había demostrado en el capítulo anterior de que el diseño del bioreactor es un factor clave.

En este estudio también es otra limitación el hecho de asumir que las células que van a diferenciarse están cubriendo la superficie total del andamio, pues los porcentajes de células MSC diferenciándose en un tejido representa únicamente la distribución de un valor ideal máximo y no lo que podría suceder en un estudio in vitro. Al igual que para el estudio del capítulo 3 no se tienen en cuenta la actividad biológica en el tiempo o condiciones químicas que pueden influir en los comportamientos.

El capítulo 5 es enfocado únicamente al sembrado celular en este estudio se presentan resultados experimentales que permiten verificar el sistema propuesto. Se utilizan morfologías de andamios reales, reconstruidos desde las imágenes de micro-CT y los modelos de CFD tienen en cuenta la influencia del diseño de los bioreactores; eliminando así algunas de las limitaciones del capítulo anterior. Pero se mantiene la no aplicación del tiempo de actividad biológica o química, reacciones con el biomaterial es decir solo se tiene en cuenta la morfología de los poros.

Para el capítulo 6 se realiza una discretización de las células y se incluye el factor tiempo en el proceso de sembrado celular imitando lo realizado en los experimentos del capítulo 5. A pesar de haber eliminado muchas de las limitaciones de los capítulos anteriores como fueron: se tiene en cuenta el diseño de bioreactor, diseño de los poros de los andamios reales, dimensiones y volumen del fluido real, número de células, las propiedades de cada una de ellas y propiedades del andamio, se han hecho nuevas suposiciones. La más importante es que todas las células que impactan con el andamio se adhieren, esto no ocurre así, pero es útil de todas formas conocer el máximo valor que puede ser adherido. Las células y la superficie del andamio no interactúan por lo que se asume que no existen acciones ni biológicas ni químicas. Numéricamente el cálculo de los resultados presentados en este capítulo 6 llevó bastante tiempo (≈ 20 días cada modelo) en un servidor (2 Procesadores Intel (R) Xeon(R) 3GHz; Memorias RAM (64GB) Disco 275GB) paralelizado en 8 núcleos. El problema del tiempo de cálculo al demostrarse su paralelización es corregible con la adición de más núcleos de cálculos y puede ser resuelto en un futuro inmediato. Además la visualización del total de 5 millones de partículas con la forma esférica, no fue posible en un servidor con una tarjeta gráfica de 512MB de memoria.

7.3 Contribuciones

En la tesis se subraya la importancia de los diseños de los bioreactores en ingeniería de tejidos. En dependencia de estos sistemas se muestra la posibilidad de numéricamente hacer una selección de las mejores condiciones para la creación de por ejemplo un cartílago articular capaz de recubrir completamente una rodilla (Capítulo3). Este es un punto que tiene primicia en el ámbito científico y donde el trabajo presentado en esta tesis ha contribuido a ayudar a seleccionar la cámara de bioreactor adecuada. Se establece camino que simplifica estos estudios y se presenta una formulación que puede ser utilizada para la simulación de la resistencia de un material poroso al paso del fluido, lo cual puede tener otros campos de aplicación en la geología, ingenierías o en ciencias de materiales.

En el capítulo 4 se aportan todos los datos referentes a las estructuras hexagonales y giroides, destacando por ejemplo como la distribución de los estímulos desde el sólido será más homogénea para las estructuras más rígidas (hexagonal) y como la accesibilidad del fluido es mejor para la menos rígida pero de poros más tortuosos (giroide), importante esto último para el sembrado celular. Un método bastante completo es propuesto basado en teorías numéricas, que nos permiten incluso determinar previamente cual estructura puede ser más apropiada para diferenciación ósea, cartílago o fibroso; y además seleccionar cuales serán las condiciones apropiadas para cada una de las arquitecturas.

En el capítulo 5, se propone un sistema que destaca la relación existente entre la morfología del andamio, los estímulos máximos del fluido de perfusión y la distribución final de las células después del sembrado de células por perfusión. El sistema permite de una manera sencilla conocer cuál es la posible distribución de las células conociendo la distribución de los estímulos numéricamente. A raíz de estos resultados se desarrollo una nueva metodología (capítulo 6) que permite el control y variación de las concentraciones de células, propiedades como diámetros de las células y sus propiedades, propiedades de los biomateriales y condiciones dinámicas, controlando además la deposición de las células que impactan con el andamio. No existen antecedentes de la aplicación o de desarrollo de este tipo de modelos en el sembrado celular para ingeniería de tejidos. La importancia de tener una herramienta como esta es que su desarrollo permitirá ahorrar experimentos para optimizar la cantidad de células, de tiempo y los parámetros de fluido dinámica que se aplican en experimentación in vitro. También este modelo permitirá inicializar desde las posiciones de las células adheridas, los diversos movimientos y cambios que realizarán las células y para los cuales ya se conocen diferentes modelos de mecano-regulación.

7.4 Perspectivas Futuras

La eficiencia de los andamios sólo puede determinarse después de que experimentos in vitro largos y costosos puedan realizarse. En esta tesis se plantean métodos que basados en los diseños estructurales permiten entender algunos fenómenos, permitiendo de modo computacional acercarnos a las condiciones óptimas para asegurar la supervivencia de las células y para la creación final del tejido. Debido a las limitaciones que se han ido encontrando se propone como trabajo futuro continuar vinculando todos los resultados numéricos con las validaciones o verificaciones experimentales. De esta manera incluir reacciones o comportamientos de las células para diferentes materiales, pero no solamente teniendo en cuenta los estímulos mecánicos, sino también tener en cuenta la fuerza de adhesión de las células, la rugosidad del material, las concentraciones de oxígeno y el valor de pH del medio.

Para la metodología de sembrado que en la tesis se propone, realizar análisis en otras configuraciones de andamios, así como parametrizar el modelo en correspondencia con ensayos experimentales teniendo en cuenta la posibilidad de separación de las células de la superficie o de la no adhesión después de un solo impacto. Estudiar en dicha parametrización si los cambios de magnitud del flujo, concentración de

células, tamaño de las células son factores claves experimentales y numéricamente. Partiendo de los resultados de las posiciones de las células iniciar los métodos de mecano-regulación que son conocidos para determinar la posible creación de tejido a partir de esta distribución.

Referencias

- [1] J. A. Planell et al. *Bone tissue repair*. Woodhead publishing in Materials, 2009.
- [2] R. Langer et al. "Tissue engineering: biomedical applications.," *Tissue engineering*, vol. 1, no. 2, pp. 151-61, Jan. 1995.
- [3] IDIOMORF, http://www.idiomorf.nl/tekening_afbreekbaar_hars_menselijklichaam.html.
- [4] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897-909, Oct. 2009.
- [5] S. J. Hollister, "Scaffold engineering: a bridge to where?," *Biofabrication*, vol. 1, no. 1, p. 012001, Mar. 2009.
- [6] D. W. Hutmacher et al. "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *Tissue Engineering*, no. June, pp. 245-260, 2007.
- [7] C. Liu et al. "Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 85, no. 7, pp. 1051-1064, 2007.
- [8] V. Guarino et al., "Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 29, no. 27, pp. 3662-70, Sep. 2008.
- [9] Ignacio Proubasta, *Lecciones Básicas en Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 2007th ed. Publicaciones Permanyer, 2007, pp. 3-25.
- [10] BONE "<http://www.purposegames.com/game/85f9590d44>."
- [11] J. Wolff, "The Law of Bone Remodeling," *Berlin Heidelberg New York: Springer, 1986 (translation of the German 1892 edition)*.
- [12] J. E. A. Bertram and S. M. Swartz, "The 'Law of bone transformation': A case of crying Wolff?," *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, vol. 22(3), pp. 245-273, 1991.
- [13] S. C. Cowin et al. "An evolutionary Wolff's law for trabecular architecture.," *J. Biomechanical Engineering*, vol. 114, pp. 129-36, 1992.
- [14] G. S. Beaupré et al. "An approach for time-dependent bone modeling and remodeling--theoretical development.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 8, no. 5, pp. 651-61, Sep. 1990.
- [15] L. Ferretti and R. Durante, "CALIDAD ÓSEA: PROPIEDADES MATERIALES Y ARQUITECTÓNICAS DE LOS HUESOS," *Clinical Therapeutics*, vol. 2, no. 1, pp. 22-25, 2006.

- [16] E. H. Burger and J. Klein-Nulen, "Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro.," *Advances in dental research*, vol. 13, pp. 93-8, Jun. 1999.
- [17] L. E. Claes and C. a Heigele, "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing.," *Journal of biomechanics*, vol. 32, no. 3, pp. 255-66, Mar. 1999.
- [18] H. Weinans and P. J. Prendergast, "Tissue adaptation as a dynamical process far from equilibrium.," *Bone*, vol. 19, no. 2, pp. 143-9, Aug. 1996.
- [19] J. Klein-Nulend et al., "Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro," *Faseb Journal*, vol. 9, pp. 441-445, 1995.
- [20] A. P. Newman, "The American Journal of Sports Medicine Articular Cartilage Repair," *Sports Medicine*, 1998.
- [21] F. H. Martini, *Fundamentals of Anatomy & Physiology*, Fourth. 1998, pp. 173-194.
- [22] W. J. Hench LL, "Introduction to Bioceramics," in *World Scientific: Singapore*, 1993.
- [23] J. R. Parsons, *Handbook of Biomaterials Properties.*, 1998th ed. New York: , 1998, pp. pp. 40–46.
- [24] S. L. Woo et al., *Handbook of Biomaterials Properties*, 1998th ed. New York: Chapman & Hall, :, 1998, pp. pp. 59–65.
- [25] A. I. Caplan and S. P. Bruder, "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century.," *Trends in molecular medicine*, vol. 7, no. 6, pp. 259-64, Jun. 2001.
- [26] S. C. Cowin and S. B. Doty, *Tissue Mechanics*. Springer, 2007.
- [27] S. Yang et al. "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors.," *Tissue engineering*, vol. 7, no. 6, pp. 679-89, Dec. 2001.
- [28] M. Navarro et al. "Surface characterization and cell response of a PLA/CaP glass biodegradable composite material.," *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 85, no. 2, pp. 477-86, May 2008.
- [29] M. Navarro et al., "New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration.," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4233-41, Aug. 2004.
- [30] P. J. Prendergast, *Topics in Bio-Mechanical Engineering*. 2004, pp. 94-146.
- [31] J. J. Klawitter and S. F. Hulbert, "Application of porous ceramics for the attachment of load-bearing internal orthopedic applications.," *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, vol. 2, p. 161.
- [32] K. Whang et al., "Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture.," *Tissue engineering*, vol. 5, no. 1, pp. 35-51, Feb. 1999.

- [33] D. W. Hutmacher et al. "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *Tissue Engineering*, no. June, pp. 245-260, 2007.
- [34] F. P. W. Melchels et al. "Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 27, pp. 6909-16, Sep. 2010.
- [35] M. Charles-Harris et al. "Mechanical and structural characterisation of completely degradable polylactic acid/calcium phosphate glass scaffolds.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 30, pp. 4429-38, Oct. 2007.
- [36] C. Sandino et al. "A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering.," *Journal of biomechanics*, vol. 41, no. 5, pp. 1005-14, Jan. 2008.
- [37] M. Cioffi et al. "Modeling Evaluation of the Fluid-Dynamic Microenvironment in Tissue-Engineered Constructs: A Micro-CT Based Model," *Biotechnology*, 2005.
- [38] D. Lacroix et al. "Micro-finite element models of bone tissue-engineering scaffolds.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 30, pp. 5326-34, Oct. 2006.
- [39] J.-L. Milan et al. "Simulation of bone tissue formation within a porous scaffold under dynamic compression.," *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, vol. 9, no. 5, pp. 583-96, Oct. 2010.
- [40] J.-L. Milan et al. "Computational modelling of the mechanical environment of osteogenesis within a polylactic acid-calcium phosphate glass scaffold.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4219-26, Sep. 2009.
- [41] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529-43, Dec. 2000.
- [42] R. Gabbrielli et al. "Development of Modelling Methods for Materials to be Used as Bone Substitutes," *Key Engineering Materials*, vol. 361-363, pp. 903-906, 2008.
- [43] O. C. Zienkiewicz, "El método de los elementos finitos. Las bases," 5th ed., M. C. R. E. O. Ibañez, Ed. 2004.
- [44] A. L. Olivares et al. "Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 6142-9, Oct. 2009.
- [45] U. Meyer et al. "Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering.," *The British journal of oral & maxillofacial surgery*, vol. 44, no. 2, pp. 134-40, Apr. 2006.

- [46] T. Adachi et al. "Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 21, pp. 3964-72, Jul. 2006.
- [47] S. J. Hollister, "Porous scaffold design for tissue engineering.," *Nature materials*, vol. 4, no. 7, pp. 518-24, Jul. 2005.
- [48] S. J. Hollister et al. "Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints.," *Biomaterials*, vol. 23, no. 20, pp. 4095-103, Oct. 2002.
- [49] S. Hollister and C. Lin, "Computational design of tissue engineering scaffolds," *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, vol. 196, no. 31-32, pp. 2991-2998, Jun. 2007.
- [50] D. Wendt et al. "Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions.," *Biorheology*, vol. 43, no. 3-4, pp. 481-8, Jan. 2006.
- [51] D. Wendt et al. "Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 84, no. 2, pp. 205-14, Oct. 2003.
- [52] R. Santoro et al., "Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 34, pp. 8946-52, Dec. 2010.
- [53] D. W. Huttmacher and H. Singh, "Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture," *Trends in biotechnology*, no. February, 2008.
- [54] F. Boschetti et al. "Prediction of the micro-fluid dynamic environment imposed to three-dimensional engineered cell systems in bioreactors.," *Journal of biomechanics*, vol. 39, no. 3, pp. 418-25, Jan. 2006.
- [55] P. J. Prendergast et al. "Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces," *Journal of biomechanics*, vol. 30, no. 6, pp. 539-548, 1997.
- [56] R. Huiskes et al. "A biomechanical regulatory model for periprosthetic fibrous-tissue differentiation.," *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 8, no. 12, pp. 785-8, Dec. 1997.
- [57] D. Lacroix et al. "Biomechanical model to simulate tissue differentiation and bone regeneration: application to fracture healing.," *Medical & biological engineering & computing*, vol. 40, no. 1, pp. 14-21, Jan. 2002.
- [58] D. J. Kelly and P. J. Prendergast, "Mechano-regulation of stem cell differentiation and tissue regeneration in osteochondral defects.," *Journal of biomechanics*, vol. 38, no. 7, pp. 1413-22, Jul. 2005.

- [59] L. Geris et al. "Application of mechanoregulatory models to simulate peri-implant tissue formation in an in vivo bone chamber.," *Journal of biomechanics*, vol. 41, no. 1, pp. 145-54, Jan. 2008.
- [60] L. Geris et al. "Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model.," *Journal of theoretical biology*, vol. 251, no. 1, pp. 137-58, Mar. 2008.
- [61] H. Isaksson et al., "Bone regeneration during distraction osteogenesis: mechano-regulation by shear strain and fluid velocity.," *Journal of biomechanics*, vol. 40, no. 9, pp. 2002-11, Jan. 2007.
- [62] D. J. Kelly and P. J. Prendergast, "Prediction of the optimal mechanical properties for a scaffold used in osteochondral defect repair.," *Tissue engineering*, vol. 12, no. 9, pp. 2509-19, Sep. 2006.
- [63] D. Lacroix and P. J. Prendergast, "A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading.," *Journal of biomechanics*, vol. 35, no. 9, pp. 1163-71, Sep. 2002.
- [64] J.-L. Milan, et al. "Simulation of bone tissue formation within a porous scaffold under dynamic compression.," *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, vol. 9, no. 5, pp. 583-96, Oct. 2010.
- [65] C. Sandino and D. Lacroix, "A dynamical study of the mechanical stimuli and tissue differentiation within a CaP scaffold based on micro-CT finite element models.," *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, Sep. 2010.
- [66] M. a Pérez and P. J. Prendergast, "Random-walk models of cell dispersal included in mechanobiological simulations of tissue differentiation.," *Journal of biomechanics*, vol. 40, no. 10, pp. 2244-53, Jan. 2007.
- [67] P. J. Prendergast et al. "Computational Models of Tissue Differentiation," *Differentiation*, pp. 353-372, 2010.
- [68] D. P. Byrne et al. "Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: application of mechanobiological models in tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 36, pp. 5544-54, Dec. 2007.
- [69] C. Sandino et al. "Simulation of angiogenesis and cell differentiation in a CaP scaffold subjected to compressive strains using a lattice modeling approach.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 8, pp. 2446-52, Mar. 2010.
- [70] S. Checa and P. J. Prendergast, "Effect of cell seeding and mechanical loading on vascularization and tissue formation inside a scaffold: a mechano-biological model using a lattice approach to simulate cell activity.," *Journal of biomechanics*, vol. 43, no. 5, pp. 961-8, Mar. 2010.

- [71] S. Checa and P. J. Prendergast, "A mechanobiological model for tissue differentiation that includes angiogenesis: a lattice-based modeling approach.," *Annals of biomedical engineering*, vol. 37, no. 1, pp. 129-45, Jan. 2009.
- [72] J. A. Sanz-Herrera, J. M. García-Aznar, and M. Doblaré, "On scaffold designing for bone regeneration: A computational multiscale approach.," *Acta biomaterialia*, vol. 5, no. 1, pp. 219-29, Jan. 2009.
- [73] A. C. Shieh and K. a Athanasiou, "Principles of Cell Mechanics for Cartilage Tissue Engineering," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 31, no. 1, pp. 1-11, Jan. 2003.
- [74] D. Wendt et al. "Potential and Bottlenecks of Bioreactors in 3D Cell Culture and Tissue Manufacturing," *Advanced Materials*, vol. 21, no. 32-33, pp. 3352-3367, Sep. 2009.
- [75] A. J. El Haj and S. H. Cartmell, "Bioreactors for bone tissue engineering," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 1-10, Jan. 2010.
- [76] I. Martin, "The role of bioreactors in tissue engineering," *Trends in Biotechnology*, vol. 22, no. 2, pp. 80-86, Feb. 2004.
- [77] S. Cartmell et al. "Quantitative microcomputed tomography analysis of mineralization within three-dimensional scaffolds in vitro.," *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 69, no. 1, pp. 97-104, Apr. 2004.
- [78] A-M. Freyria et al., "Optimization of dynamic culture conditions: effects on biosynthetic activities of chondrocytes grown in collagen sponges.," *Tissue engineering*, vol. 11, no. 5-6, pp. 674-84, 2005.
- [79] F. Zhao and T. Ma, "Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 91, no. 4, pp. 482-93, Aug. 2005.
- [80] J. F. Alvarez-Barreto and V. I. Sikavitsas, "Improved mesenchymal stem cell seeding on RGD-modified poly(L-lactic acid) scaffolds using flow perfusion.," May-2007.
- [81] W. L. Grayson et al., "Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone.," *Tissue engineering. Part A*, vol. 14, no. 11, pp. 1809-20, Nov. 2008.
- [82] N. E. Timmins et al. "Three-dimensional cell culture and tissue engineering in a T-CUP (tissue culture under perfusion).," *Tissue engineering*, vol. 13, no. 8, pp. 2021-8, Aug. 2007.
- [83] S. Nehrer et al. "Treatment of full-thickness chondral defects with hyalograft C in the knee: a prospective clinical case series with 2 to 7 years' follow-up.," *The American journal of sports medicine*, vol. 37 Suppl 1, p. 81S-87S, Nov. 2009.

- [84] E. Kon et al. "Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years.," *The American journal of sports medicine*, vol. 37, no. 1, pp. 33-41, Jan. 2009.
- [85] M. Brittberg, "Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up.," *Injury*, vol. 39 Suppl 1, pp. S40-9, Apr. 2008.
- [86] J. S. Temenoff and a G. Mikos, "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 5, pp. 431-40, Mar. 2000.
- [87] E. Milella et al., "Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzylic esters as tissue engineering scaffolds.," *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1053-63, Feb. 2002.
- [88] M. Charles-Harris et al. "A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study.," *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 19, no. 4, pp. 1503-13, Apr. 2008.
- [89] R. Pörtner et al. "Bioreactor design for tissue engineering.," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 100, no. 3, pp. 235-45, Sep. 2005.
- [90] L. E. Freed et al. "Tissue engineering of cartilage in space.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 25, pp. 13885-90, Dec. 1997.
- [91] C. E. Holy et al. "Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period.," *Journal of biomedical materials research*, vol. 51, no. 3, pp. 376-82, Sep. 2000.
- [92] M. a Koch et al. "Perfusion cell seeding on large porous PLA/calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters.," *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 95, no. 4, pp. 1011-8, Dec. 2010.
- [93] E. G. Lima et al., "Functional tissue engineering of chondral and osteochondral constructs.," *Biorheology*, vol. 41, no. 3-4, pp. 577-90, Jan. 2004.
- [94] M. T. Raimondi et al., "Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment.," *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, vol. 1, no. 1, pp. 69-82, Jun. 2002.
- [95] K. a Williams et al. "Computational fluid dynamics modeling of steady-state momentum and mass transport in a bioreactor for cartilage tissue engineering.," *Biotechnology progress*, vol. 18, no. 5, pp. 951-63, 2002.

- [96] E. Kon et al. "Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years.," *The American journal of sports medicine*, vol. 37, no. 1, pp. 33-41, Jan. 2009.
- [97] O. Démariseau et al., "Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 310, no. 2, pp. 580-588, Oct. 2003.
- [98] R. Fassnacht, D. and Pörtner, "Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed bed reactors," *J. Biotechnol.*, vol. 72, pp. 169-184., 1999.
- [99] K. Bilodeau and D. Mantovani, "Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review.," *Tissue engineering*, vol. 12, no. 8, pp. 2367-83, Aug. 2006.
- [100] S. H. Cartmell et al. "Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro.," *Tissue engineering*, vol. 9, no. 6, pp. 1197-203, Dec. 2003.
- [101] C. M. Cheah et al. "Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 1: Investigation and Classification," *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 21, no. 4, pp. 291-301, Feb. 2003.
- [102] D. W. Hutmacher et al. "Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems.," *Trends in biotechnology*, vol. 22, no. 7, pp. 354-62, Jul. 2004.
- [103] J. A. Sanz-Herrera et al. "Scaffold microarchitecture determines internal bone directional growth structure: A numerical study.," *Journal of biomechanics*, vol. 43, no. 13, pp. 2480-6, Sep. 2010.
- [104] B. Duan and M. Wang, "Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor.," *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, vol. 7 Suppl 5, pp. S615-29, Oct. 2010.
- [105] M. Cioffi et al. "Computational evaluation of oxygen and shear stress distributions in 3D perfusion culture systems: macro-scale and micro-structured models.," *Journal of biomechanics*, vol. 41, no. 14, pp. 2918-25, Oct. 2008.
- [106] S. H. Cartmell et al. "Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro.," *Tissue engineering*, vol. 9, no. 6, pp. 1197-203, Dec. 2003.
- [107] H. Isaksson et al. "Comparison of biophysical stimuli for mechano-regulation of tissue differentiation during fracture healing," *Journal of Biomechanics*, vol. 39, pp. 1507-1516, 2006.
- [108] Kathleen M. Reich and John A. Fragos, "Effect of flow on prostaglandin E2 and inositol triphosphate levels in osteoblasts," *Cell Physiology*, vol. 30, pp. 428-32, 1991.

- [109] S. C. Cowin, "Mechanosensation and fluid transport in living bone.," *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, vol. 2, no. 3, pp. 256-60, Mar. 2002.
- [110] B. Porter et al. "3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor.," *Materials Research*, vol. 38, pp. 543-549, 2005.
- [111] M. E. Gomes et al. "Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor.," *Tissue engineering*, vol. 12, no. 4, pp. 801-9, Apr. 2006.
- [112] D. Li et al. "Effects of flow shear stress and mass transport on the construction of a large-scale tissue-engineered bone in a perfusion bioreactor.," *Tissue engineering. Part A*, vol. 15, no. 10, pp. 2773-83, Oct. 2009.
- [113] S. M. Peltola et al. "A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes.," *Annals of medicine*, vol. 40, no. 4, pp. 268-80, Jan. 2008.
- [114] C. M. Cheah et al. "Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 2: Parametric Library and Assembly Program," *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 21, no. 4, pp. 302-312, Feb. 2003.
- [115] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529-43, Dec. 2000.
- [116] L. Geng, et al. "Direct writing of chitosan scaffolds using a robotic system," *Rapid Prototyping Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 90-97, 2005.
- [117] F. P. W. Melchels et al. "A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 23-24, pp. 3801-9, Aug. 2009.
- [118] A. H. Schoen, "Nasa Technical Note," *NASA-TN-D-5541*, 1970.
- [119] H. A. Schwarz, "Gesammelte Mathematische Abhandlungen," *Springer-Verlag, Berlin*, 1890.
- [120] R. G. Bacabac et al., "Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers.," *Journal of biomechanics*, vol. 38, no. 1, pp. 159-67, Jan. 2005.
- [121] S. Wang and J. M. Tarbell, "Effect of fluid flow on smooth muscle cells in a 3-dimensional collagen gel model.," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 20, no. 10, pp. 2220-5, Oct. 2000.
- [122] J. A. Pedersen and M. a Swartz, "Mechanobiology in the third dimension.," *Annals of biomedical engineering*, vol. 33, no. 11, pp. 1469-90, Nov. 2005.

- [123] M. E. Hoque et al., "Fabrication using a rapid prototyping system and in vitro characterization of PEG-PCL-PLA scaffolds for tissue engineering.," *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, vol. 16, no. 12, pp. 1595-610, Jan. 2005.
- [124] S. Yang et al. "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques.," *Tissue engineering*, vol. 8, no. 1, pp. 1-11, Feb. 2002.
- [125] A. K. M. B. Khoda et al. "Engineered tissue scaffolds with variational porous architecture.," *Journal of biomechanical engineering*, vol. 133, no. 1, p. 011001, Jan. 2011.
- [126] L. Geris et al., "Numerical simulation of tissue differentiation around loaded titanium implants in a bone chamber.," *Journal of biomechanics*, vol. 37, no. 5, pp. 763-9, May 2004.
- [127] D. R. Carter et al. "Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 6, no. 5, pp. 736-48, Jan. 1988.
- [128] F. P. W. Melchels et al. "Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing.," *Acta biomaterialia*, vol. 6, no. 11, pp. 4208-17, Nov. 2010.
- [129] X. H. Zhu et al. "Study of cell seeding on porous poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) sponge and growth in a Couette-Taylor bioreactor.," *Chemical Engineering Science*, vol. 65, no. 6, pp. 2108-2117, Mar. 2010.
- [130] A. Braccini et al., "Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts.," *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 23, no. 8, pp. 1066-72, Sep. 2005.
- [131] F. P. W. Melchels, "Preparation of advanced porous structures by stereolithography for application in tissue engineering.," *Thesis*, 2010.
- [132] J. Ando and K. Yamamoto, "Vascular Mechanobiology.," *Circulation Journal*, vol. 73, no. 11, pp. 1983-1992, 2009.
- [133] P. Feugier et al. "Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress.," *Biomaterials*, vol. 26, no. 13, pp. 1457-66, May 2005.
- [134] D. K. Macario et al. "Inhibition of apoptosis prevents shear-induced detachment of endothelial cells.," *The Journal of surgical research*, vol. 147, no. 2, pp. 282-9, Jun. 2008.
- [135] D. W. B. Tonnarelli et al. "Perfusion Model System to Generate Engineered Grafts with Controlled Cellular Distributions.," in *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*.

- [136] B. C. Isenberg et al. "Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents.," *Annals of biomedical engineering*, vol. 34, no. 6, pp. 971-85, Jun. 2006.
- [137] S. D. Smith et al. "Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 13, no. 6, pp. 824-31, 1995.
- [138] J. M. Meinders and H. J. Busscher, "Adsorption and desorption of colloidal particles on glass in a parallel plate flow chamber - Influence of ionic strength and shear rate," *Polymer*, vol. 486, pp. 478-486, 1994.
- [139] C. Cozens-Roberts et al. "Receptor-mediated adhesion phenomena. Model studies with the Radical-Flow Detachment Assay.," *Biophysical journal*, vol. 58, no. 1, pp. 107-25, Jul. 1990.
- [140] C. M. Murphy et al. "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 461-6, Jan. 2010.
- [141] C. E. Wilson et al. "Evaluating 3D bone tissue engineered constructs with different seeding densities using the alamarBlue assay and the effect on in vivo bone formation.," *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 13, no. 12, pp. 1265-9, Dec. 2002.
- [142] S. S. Kim et al., "Dynamic seeding and in vitro culture of hepatocytes in a flow perfusion system.," *Tissue engineering*, vol. 6, no. 1, pp. 39-44, Feb. 2000.
- [143] S. H. Oh et al. "In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 9, pp. 1664-71, Mar. 2007.
- [144] X. H. Zhu et al. *Study of cell seeding on porous poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) sponge and growth in a Couette-Taylor bioreactor*, vol. 65, no. 6. Elsevier, 2010, pp. 2108-2117.
- [145] G. Vunjak-Novakovic et al. "Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering.," *Biotechnology progress*, vol. 14, no. 2, pp. 193-202, 1998.
- [146] E. M. Bueno et al. "Enhancing cell seeding of scaffolds in tissue engineering through manipulation of hydrodynamic parameters.," *Journal of biotechnology*, vol. 129, no. 3, pp. 516-31, May 2007.
- [147] H. J. Busscher and H. C. V. D. Mei, "Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems," *Society*, vol. 19, no. 1, pp. 127-141, 2006.
- [148] E. Rabkin and F. J. Schoen, "Cardiovascular tissue engineering.," *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, vol. 11, no. 6, pp. 305-17, 2002.

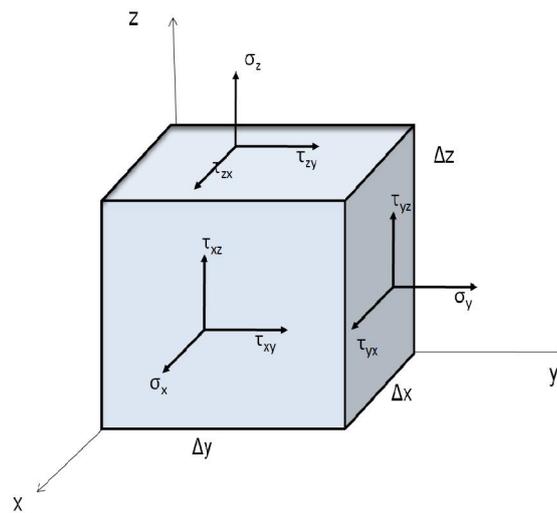
- [149] C. E. Holy et al. "Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period.," *Journal of biomedical materials research*, vol. 51, no. 3, pp. 376-82, Sep. 2000.
- [150] L. E. Freed et al. "Tissue engineering of cartilage in space.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 25, pp. 13885-90, Dec. 1997.
- [151] J. F. Álvarez-Barreto et al. "Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffolds with different architectures.," *Annals of biomedical engineering*, vol. 35, no. 3, pp. 429-42, Mar. 2007.
- [152] W. G. Liu et al., "Effects of baicalin-modified poly(D,L-lactic acid) surface on the behavior of osteoblasts.," *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 14, no. 11, pp. 961-5, Nov. 2003.
- [153] Y. Li et al. "Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices.," *Biotechnology progress*, vol. 17, no. 5, pp. 935-44, 2001.
- [154] J. van den Dolder et al. "Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh.," *Tissue engineering*, vol. 9, no. 2, pp. 315-25, Apr. 2003.
- [155] T. Kitagawa et al. "Three-Dimensional Cell Seeding and Growth in Radial-Flow Perfusion Bioreactor for In Vitro Tissue Reconstruction," *Biotechnology*, 2005.
- [156] F. P. W. Melchels et al., "The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding.," *Biomaterials*, Jan. 2011.
- [157] "Ansys fluent 12.1 Theory," no. April. 2009.
- [158] T. H. Ham et al. "Physical Properties of Red Cells ad Related to Effects in Vico. I. Increased Rigidity of Erythrocytes as Measured by Viscosity of Cells Altered by Chemical Fixation, Sickling and Hypertonicity," *Blood The Journal of Hematology*, vol. 32, no. 6, pp. 847-861, 2011.
- [159] L. D. Blecha et al. "Mechanical interaction between cells and fluid for bone tissue engineering scaffold: modulation of the interfacial shear stress.," *Journal of biomechanics*, vol. 43, no. 5, pp. 933-7, Mar. 2010.
- [160] A. M. Bilek et al. "Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 94, no. 2, pp. 770-83, Feb. 2003.
- [161] A. J. A. Morsi S. A., "An Invetigation of Particle Trajectories in Two-Phase Flow Systems.," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 55, no. 2, pp. 193-208, 1972.
- [162] G. L. Iacono et al. "Particle Deposition Onto Rough Surfaces," *Journal of Fluids Engineering*, vol. 130, no. 7, p. 074501, 2008.

- [163] G. Ahmadi, "Lift Force," *Small*, no. 1991, pp. 1-5, 1992.
- [164] D. W. Stanton and C. J. Rutland "Multi-dimensional modeling of thin liquid films and spray-wall interactions resulting from impinging sprays," *International Journal of Heat and Mass Transfer*, vol. 41, pp. 3037-3054, 1998.
- [165] S. De Boodt et al., "Bi-modular flow characterization in tissue engineering scaffolds using computational fluid dynamics and particle imaging velocimetry.," *Tissue engineering. Part C, Methods*, vol. 16, no. 6, pp. 1553-64, Dec. 2010.
- [166] D. Stanton and C. Rutland, "Modeling Fuel Film Formation and Wall Interaction in Diesel Engines," *Splash*.
- [167] P. J. O'Rourke and A. A. Amsden, "A particle Numerical model for wall film dynamic in port-injected engines," *October*, no. 836, 1996.
- [168] F. W. Janssen et al. "Online measurement of oxygen consumption by goat bone marrow stromal cells in a combined cell-seeding and proliferation perfusion bioreactor," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006.

Anexos

A: Ecuaciones descriptivas de un Sólido Linear Elástico

Para los estudios presentados en el capítulo 4 el material es asumido como isotrópico, es decir tiene las mismas propiedades en todas las direcciones.



A1. Representación de las tensiones actuando sobre un cubo elemental

Las relación entre las tensión (σ) y deformación (ϵ) en materiales lineal elásticos e isotrópicos están descritas por la Ley de Hooke ($\sigma=E\epsilon$), donde E, es el módulo elástico. Se asume que para la aplicación de esta relación las deformaciones aplicadas han de ser pequeñas para encontrarse en el rango elástico del material. En estos casos la aplicación de tensiones normales producen únicamente deformaciones normales y de igual manera al aplicar tensiones cortantes solo se producirán deformaciones de de cortantes. Si expresamos la ley de Hooke matricialmente para un sólido tridimensional se obtiene que:

$$\begin{Bmatrix} \epsilon_x \\ \epsilon_y \\ \epsilon_z \\ \gamma_{xy} \\ \gamma_{yz} \\ \gamma_{zx} \end{Bmatrix} = \frac{1}{E} \begin{bmatrix} 1 & -\mu & -\mu & 0 & 0 & 0 \\ -\mu & 1 & -\mu & 0 & 0 & 0 \\ -\mu & -\mu & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2(1+\mu) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2(1+\mu) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2(1+\mu) \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \sigma_x \\ \sigma_y \\ \sigma_z \\ \tau_{xy} \\ \tau_{yz} \\ \tau_{zx} \end{Bmatrix}$$

Donde $\gamma_{ij}=2\epsilon_{ij}$, μ es el coeficiente de Poisson y τ es la tensión cortante.

El tensor de tensiones (σ) y de deformaciones (ϵ) pueden expresarse como:

$$\boldsymbol{\sigma} = \begin{bmatrix} \sigma_x & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{yx} & \sigma_y & \tau_{yz} \\ \tau_{zx} & \tau_{zy} & \sigma_z \end{bmatrix}$$

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \begin{bmatrix} \varepsilon_x & \gamma_{xy} & \gamma_{xz} \\ \gamma_{yx} & \varepsilon_y & \gamma_{yz} \\ \gamma_{zx} & \gamma_{zy} & \varepsilon_z \end{bmatrix}$$

De igual manera son posibles de ser expresados mediante los valores de tensiones y deformaciones principales:

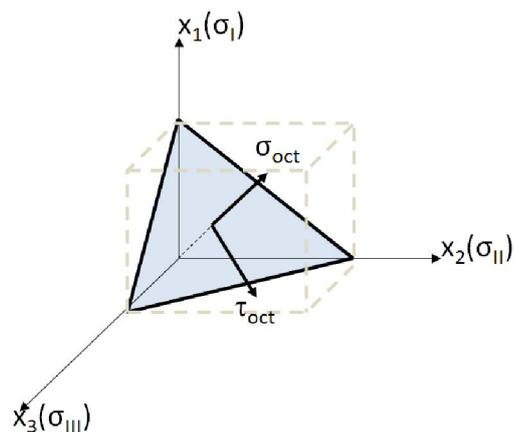
$$\boldsymbol{\sigma} = \begin{bmatrix} \sigma_I & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{II} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{III} \end{bmatrix}$$

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \begin{bmatrix} \varepsilon_I & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_{II} & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_{III} \end{bmatrix}$$

Las tensiones y deformaciones cortantes que actúan en el plano octaédrico son llamadas tensiones (τ_{oct}) o deformaciones (γ_{oct}) cortantes octaédricas:

$$\tau_{\text{oct}} = \frac{1}{3} \sqrt{(\sigma_I - \sigma_{II})^2 + (\sigma_{II} - \sigma_{III})^2 + (\sigma_{III} - \sigma_I)^2}$$

$$\gamma_{\text{oct}} = \frac{2}{3} \sqrt{(\varepsilon_I - \varepsilon_{II})^2 + (\varepsilon_{II} - \varepsilon_{III})^2 + (\varepsilon_{III} - \varepsilon_I)^2}$$



A2. Representación de las tensiones octaédricas en un plano transversal

B: Ecuaciones descriptivas de un fluido Newtoniano

Tanto en los problemas de sólidos como en los de fluido aparecen tensiones y en ambos el material está sometido a desplazamientos. La diferencia fundamental es que los fluidos no pueden soportar tensiones desviadoras cuando el fluido está en reposo, solo puede soportar presiones o tensión hidrostáticas. No obstante, para todos los estudios presentados en esta tesis el fluido fue siempre simulado en movimiento y es de interés como ocurren las tensiones desviadoras que surgen de este movimiento. En un fluido que está en movimiento es siempre necesaria la continua conservación de la masa.

La variable independiente en el caso de fluidos en movimientos es la velocidad u y las velocidades de deformación son la primera causa de las tensiones, σ_{ij} , y se definen como:

$$\dot{\epsilon}_{ij} = \frac{\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i}}{2}$$

Las velocidades de deformaciones también pueden ser expresadas en forma de vectores en 3D, lo cual es más conveniente para los análisis por elementos finitos.

$$\dot{\epsilon}^T = [\dot{\epsilon}_{11}, \dot{\epsilon}_{22}, \dot{\epsilon}_{33}, 2\dot{\epsilon}_{12}, 2\dot{\epsilon}_{23}, 2\dot{\epsilon}_{31}]$$

Las relaciones entre tensión y deformación para un fluido isotrópico lineal (newtoniano) requieren la definición de la relación entre las tensiones desviadoras τ_{ij} con las velocidades de deformación desviadoras:

$$\tau_{ij} \equiv \sigma_{ij} - \delta_{ij} \frac{\sigma_{kk}}{3} = 2\eta \left(\dot{\epsilon}_{ij} - \delta_{ij} \frac{\dot{\epsilon}_{kk}}{3} \right)$$

En la ecuación anterior la cantidad entre el paréntesis se denomina deformación desviadora de Kronecker y los índices repetidos significan suma;

$$\sigma_{ii} \equiv \sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33} \quad \text{y} \quad \dot{\epsilon}_{ii} \equiv \dot{\epsilon}_{11} + \dot{\epsilon}_{22} + \dot{\epsilon}_{33}$$

El coeficiente η se conoce como viscosidad dinámica (de cortante) o simplemente viscosidad.

Una segunda relación que es necesaria conocer es la existente entre los cambios en la tensión media y la velocidad de deformación volumétrica. Esto define la presión como:

$$p = \frac{\sigma_{ii}}{3}$$

Donde $k\eta$ es un coeficiente de viscosidad volumétrico análogo al módulo de rigidez volumétrico K , en elasticidad lineal y p_0 es la presión hidrostática inicial independiente de la velocidad de deformación. La relación constitutiva queda:

$$\sigma_{ij} = 2\eta \left(\dot{\epsilon}_{ij} - \frac{\delta_{ij} \dot{\epsilon}_{kk}}{3} \right) - \delta_{ij} p \equiv \tau_{ij} - \delta_{ij} p$$

Para la conservación de la masa.

Si ρ es la densidad del fluido entonces el equilibrio de masa ρu_i entrando y saliendo de un volumen de control infinitesimal es igual a la velocidad de cambio en la densidad.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_i} (\rho u_i) \equiv \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla^T (\rho u) = 0$$

Para la conservación de movimiento o equilibrio dinámico

El momento cinético en la dirección j , es $(\rho u_i)u_i$ saliendo y entrando en un volumen de control, tiene que estar en equilibrio con las tensiones σ_{ij} y las fuerzas de masa ρf_i

$$\frac{\partial (\rho u_j)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_i} [(\rho u_i)u_i] - \frac{\partial}{\partial x_i} (\sigma_{ij}) - \rho f_i = 0$$

C: Ecuaciones descriptivas del movimiento de partículas

En el capítulo 6 se presenta una nueva metodología para simular el sembrado celular mediante la descripción del movimiento de partículas. En este anexo se plantean las ecuaciones y consideraciones por la cual se incluyen o no algunas fuerzas en el caso del sembrado celular.

Se plantea la ecuación general del movimiento de partículas:

$$\frac{du}{dt} = F_D(u - u_p) + \frac{g_z(\rho_p - \rho)}{\rho_p} + F_z$$

En la ecuación planteada para describir las trayectorias de traslación de las partículas en el eje z mediante los fundamentos Lagrangian. Este balance de fuerzas iguala la inercia de las partículas con las fuerzas actuando en las partículas. Donde como ya se ha comentado la $F_D(u - u_p)$ es la fuerza de arrastre por unidad de masa de partículas y es la fuerza principal que guía el movimiento de las células en la metodología planteada.

El término que incluye la gravedad para nuestro caso no tiene influencia debido a que la densidad del fluido y la de las partículas son iguales y por estas razones no se incluye en el cálculo, además el volumen de partículas es muy poco representativo en relación al volumen del fluido.

El término F_z no es más que las aceleraciones adicionales (Fuerzas/masas de partículas).

A continuación se plantean las ecuaciones de todas las fuerzas que podrían intervenir el movimiento de las partículas:

1) *Masa virtual*

$$\frac{1}{2} \frac{\rho}{\rho_p} \frac{d}{dt} (u - u_p)$$

Esta fuerza puede ser importante si $\rho \gg \rho_p$ y es generalmente provocado por gradientes de presión dentro del fluido.

2) *Fuerzas en un medio en rotación* (esta puede ser interesante para bioreactores de rotación de paredes). Por ejemplo en una rotación de partículas que se produce respecto a el eje z, estas son las ecuaciones correspondientes a los ejes x e y.

$$\left(1 - \frac{\rho}{\rho_p}\right) \Omega^2 x + 2\Omega \left(u_{y,p} - \frac{\rho}{\rho_p} u_y\right)$$

$$\left(1 - \frac{\rho}{\rho_p}\right) \Omega^2 y + 2\Omega \left(u_{x,p} - \frac{\rho}{\rho_p} u_x\right)$$

3) *Fuerza Termoforético*

Partículas moviéndose en un medio gaseoso, se crea generalmente mediante gradientes de temperaturas que producen la aceleración de dichas partículas. No es el caso pues las células se mueven bajo temperatura constante de 37°C. $D_{T,p}$, coeficiente termoforético, T , temperatura

$$-D_{T,p} \frac{1}{m_p T} \frac{dT}{dx}$$

4) **Fuerza Browniana**

Es opcionalmente incluida para partículas de menos de 1µm, es modelada mediante una formulación Gaussiana y como se muestra en la ecuación también es dependiente de la temperatura. Es necesario incluir ecuaciones energéticas para que puedan tener efecto. $S_{n,ij}$, intensidad espectral, δ_{ij} , función delta de Kronecker, k_B , constante de Boltzman.

$$S_{n,ij} = S_0 \delta_{ij}$$

$$S_0 = \frac{216 \eta k_B T}{\pi^2 \rho d_p^5 \left(\frac{\rho_p}{\rho}\right)^2 C_c}$$

5) **Fuerza de Sustentación Saffman**

$$\vec{F}_L = \frac{2K_L \eta^{\frac{1}{2}} \rho d_{ij}}{\rho_p d_p (d_{lk} d_{kl})^{\frac{1}{4}}} (\vec{u} - \vec{u}_p)$$

Donde $K_L=2.594$, valor calculado por Saffman d_{ij} , tensor de deformaciones. Esta fuerza es conveniente aplicarla cuando los valores de los Re de las partículas son pequeños. Hay que tener en cuenta que el tamaño de partícula sea muy pequeño.

Finalmente las fuerzas que se tienen en cuenta para el desarrollo del capítulo 6 son la F_D y la F_L , como se plantea en el desarrollo de los métodos del capítulo.

La velocidad de las partículas en cada punto es:

$$u_p = \frac{dx}{dt}$$

De manera general las aceleraciones pueden plantearse como:

$$\frac{du_p}{dt} = \frac{1}{t_p} (u - u_p) + a$$

Donde a , es la aceleración para todas la fuerzas extras en este caso Suspensión

En la metodología aplicada se aplica una discretización trapezoidal para el cálculo de las nuevas posiciones y velocidades. Los valores de u_p^* y u^* se toman como promedios y la a es tomada como constante:

$$\frac{u_p^{n+1} - u_p^n}{\Delta t} = \frac{1}{t_p} (u^* - u_p^*) + a^n$$

$$u_p^* = \frac{1}{2} (u_p^n + u_p^{n+1})$$

$$u^* = \frac{1}{2} (u^n + u^{n+1})$$

$$u^{n+1} = u^n + \Delta t u_p^n \cdot \nabla u^n$$

$$u_p^{n+1} = \frac{u_p^n \left(1 - \frac{1}{2} \frac{\Delta t}{t_p}\right) + \frac{\Delta t}{t_p} \left(u^n + \frac{1}{2} \Delta t u_p^n \cdot \nabla u^n\right) + \Delta t a}{1 + \frac{1}{2} \frac{\Delta t}{t_p}}$$

Y la nueva localización de la partícula es calculada mediante:

$$x_p^{n+1} = x_p^n + \frac{1}{2} \Delta t (u_p^n + u_p^{n+1})$$

Todo el algoritmo aplicado fue realizado con un error numérico de 10^{-5} y un máximo refinamiento de 20.

D: Subrutina para el control de las condiciones de flujo

```

/*udf file for bc + time */
#include"udf.h"

DEFINE_PROFILE(flow_profile, t, i) /*cara 1*/

{
    face_t f;
    real ti = CURRENT_TIME;
    begin_f_loop(f,t)
    {
        if (ti<=126.75) /*tiempo de inyección a 1mm/s */
            F_PROFILE(f, t, i) = 1; /*flujo correspondiente a 1mm/s */
        else
            F_PROFILE(f, t, i) = 1*cos(0.04363*(ti-126.75)); /*ecuación de flujo */
    }
    end_f_loop(f,t)
}

DEFINE_PROFILE(pressure_profile, t, i) /*cara 2*/
{
    face_t f;
    real ti = CURRENT_TIME;

    begin_f_loop(f,t)
    {
        if (ti<=126.75)
            F_PROFILE(f, t, i) = -1;
        else
            F_PROFILE(f, t, i) = -1*cos(0.04363*(ti-126.75));
    }
    end_f_loop(f,t)
}

DEFINE_DELTAT(mydeltat,d) /*control de los pasos de tiempos*/
{
    real time_step;
    real ti=CURRENT_TIME;
    if (ti<=126.75)
        time_step=0.15; /*paso de inyección para obtener 5 millones de células*/
    else
        time_step=36; /*periodo*/
    return time_step;
}

```


Instituciones y financiaciones:



Departamento Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica
Universitat Politècnica de Catalunya



Instituto de Bioingeniería de Cataluña



European Commission (STEPS-FP6-500465)



Agencia Española de Cooperación Internacional