

UNIVERSIDAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA UTEC

Carrera de Ingeniería Mecánica



**ESTUDIO PRELIMINAR DEL DISEÑO Y ANÁLISIS DE UN SCAFFOLD PARA
UN TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO UTILIZADO EN UN BIORREACTOR
DE MADURACIÓN DE MÚLTIPLES ESTÍMULOS FÍSICOS**

**PRELIMINARY STUDY OF THE DESIGN AND ANALYSIS OF A SCAFFOLD
FOR A SKELETAL MUSCLE TISSUE USED IN A MATURATION
BIORREACTOR OF MULTIPLE PHYSICAL STIMULES**

Trabajo de Investigación para optar por el Grado de Bachiller en Ingeniería Mecánica

Bruno Carlos Oyague Santolalla

Código 201510100

Asesor

Samuel Charca Mamani

Lima – Perú

Junio 2020

El trabajo de investigación

**ESTUDIO PRELIMINAR DEL DISEÑO Y ANÁLISIS DE UN SCAFFOLD PARA
UN TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO UTILIZADO EN UN BIORREACTOR
DE MADURACIÓN DE MÚLTIPLES ESTÍMULOS FÍSICOS**

Ha sido aprobado

[Nombres y apellidos del Presidente de Jurado]

[Nombres y apellidos del Asesor de la tesis]

[Nombres y apellidos del Tercer jurado]

Dedicatoria:

A mi familia por estar siempre a mi lado apoyándome.

A Fabiana que me daba fuerzas cuando ya no podía más.

A los profesores Omar y Ximena por siempre confiar en mí
cuando nadie más lo hacía.

A los profesores que me dieron la espalda porque me enseñaron
a seguir luchando.

Agradecimientos:

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	iv
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Ingeniería de Tejidos.....	1
1.1.1 Biología celular	3
1.1.1.1 Tipos de células madre.....	3
1.1.1.2 Matriz extracelular.....	4
1.1.1.3 Señalización y diferenciación celular	5
1.1.2 Biorreactores	5
1.1.2.1 Biorreactor de cultivo celular.....	6
1.1.2.2 Biorreactor de maduración.....	8
1.2 Anatomía y fisiología del tejido	10
1.2.1 Microestructura protéica	10
1.2.2 Microcirculación.....	13
1.3 Biomateriales	13
1.3.1 Propiedades mecánicas	14
1.3.2 Materiales compuestos.....	15
1.3.3 Biocompatibilidad.....	16
1.3.4 Biodegradación.....	16
1.4 Estímulos físicos.....	17
1.4.1 Estímulos mecánicos.....	18
1.4.1.1 Compresión	18
1.4.1.2 Tensión.....	21
1.4.1.3 Perfusión	23
1.4.2 Estímulos eléctricos	24
1.5 Simulación tisular	26
1.5.1 Elementos finitos	26
1.5.2 Mecánica sólida	27
1.5.3 Mecánica de fluidos	28
1.5.4 Campo eléctrico.....	29
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Procedimiento general de fabricación tisular.	2
Figura 1.2 Proceso de biodegradación de un biomaterial.	6
Figura 1.3 Efectos directos e indirectos de la estimulación mecánica en las células.	9
Figura 1.4 Descripción teórica de los efectos de la estimulación eléctrica en las células.	9
Figura 1.5 Organización jerárquica del músculo esquelético.	11
Figura 1.6 Teoría del filamento deslizante: un sarcómero en posiciones relajadas (arriba) y contraídas (abajo).	12
Figura 1.7 Un esquema de la anatomía de los vasos sanguíneos en un músculo.	13
Figura 1.8 Curva de esfuerzo-deformación de varios tejidos conectores.	15
Figura 1.9 Proceso de biodegradación de un biomaterial.	17
Figura 1.10 (a)Generador de estímulos de un biorreactor simulador de rodilla. (b) Representación de una rodilla real.	19
Figura 1.11 Resultado histológico de los resultados de la experimentación.	20
Figura 1.12 Resultados de la tinción del tejido diseñado de dos donantes diferentes.	21
Figura 1.13 Fotografías del anillo de biomaterial utilizado, ácido poliláctico.	22
Figura 1.14 Vista transversal y frontal de biomaterial utilizado y micrografías de este.	23
Figura 1.15 Micrografías del biomaterial luego de diferentes estímulos.	24
Figura 1.16 Representación esquemática de los mecanismos de señalización por campo eléctrico.	25
Figura 1.17 Efectos de la estimulación eléctrica sobre la diferenciación de células madre de tejido óseo.	26
Figura 1.18 Perfil transversal de velocidades en un fluido.	29

RESUMEN

Esta investigación puede contribuir a la solución de problemas como la falta de donante de órganos, la poca compatibilidad en el sistema inmune en los trasplantes de miembros, falta de órganos vivos para experimentar fármacos y el elevado riesgo que corren los pacientes en tan difíciles operaciones. La presente investigación se trata del planeamiento del diseño de un scaffold para un tejido musculo esquelético utilizado en un biorreactor que aplica más de un estímulo físico simultáneamente como: tensión, carga eléctrica y perfusión¹. Para empezar, se investigará sobre la teoría de ingeniería de tejidos para entender de una forma macro el problema al cual se está dirigiendo. Luego se procederá con el área de anatomía y fisiología del tejido a analizar. El siguiente paso será aprender sobre los posibles biomateriales a utilizar en la investigación y los estímulos a los cuales se someterá dicho material. Por último, se tendrá una sección sobre cómo todo esto será simulado mediante una serie de programas computacionales. Al ser un estudio complejo, el alcance del proyecto es la estimulación física por lo que no evalúa las estimulaciones químicas, bioquímicas y biológicas por lo que escapa del enfoque de la tesis. Al trabajar en esto se podrá realizar un avance en la disposición de estudios computacionales sobre scaffolds en la rama de la ingeniería de tejidos. Scaffolds para biorreactores como este se han discutido en la literatura, pero todavía no se ha empezado a desarrollar porque es un campo nuevo en la investigación.

Palabras clave: scaffold, ingeniería de tejidos, estímulos, diseño, simulación

¹ La perfusión o perfusión tisular es el paso de un fluido, a través del sistema circulatorio, a un órgano o un tejido [56].

INTRODUCCIÓN

El déficit de órganos aptos para el trasplante es un problema de ámbito mundial. En el 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) investigó cuántas operaciones se realizaban alrededor del mundo, encontrando que solo se puede realizar un trasplante de intestino delgado en menos del 15% de países, sin poder ser desarrollado en ningún país de África ni en el sudeste asiático. La situación es delicada incluso en el caso del trasplante de otros órganos como los pulmones o el páncreas, que, a pesar de ser más accesibles, solo se pueden realizar en menos del 50% [1].

Estos obstáculos no son solo de ámbito social, también son de ámbito técnico—ingenieril, biológico y médico— por lo que constituyen una oportunidad de mejora. La ingeniería de tejidos, disciplina que se ocupa de la creación de tejidos², tiene como desafío principal solucionar esta problemática, abordando el déficit de órganos para el uso humano o de investigación.

Esta disciplina combina los principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos [2]. De esta manera se concentra en brindar herramientas de ámbito ingenieril (tanto de maquinaria como de metodología), con requerimientos específicos de la biología—celular y tisular³— para incrementar la calidad de vida de las personas al crear tejidos biológicos *in vitro*⁴.

Actualmente, se han realizado estudios en los que se han podido reconstruir gran parte de órganos de animales [3,4], en su mayoría ratas. Estos han sido miembros no complejos, como orejas, músculos y huesos. La tecnología no está del todo avanzada, por lo que todavía

² En biología, los tejidos son aquellos materiales biológicos naturales constituidos por un conjunto complejo y organizado de células.

³ Se utiliza al hablar de tejidos de un individuo.

⁴ Se refiere a realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo, generalmente en un laboratorio [57].

no se pueden desarrollar órganos enteros para sustituir los de los pacientes enfermos. Los retos con los que se han topado los investigadores de esta especialidad son la carencia, tanto de instrumentos como de materiales, para continuar con una experimentación más compleja.

Una de las ramas tecnológicas en las que se debe trabajar es el desarrollo de biorreactores. Estos son cámaras con un ambiente controlado (tanto en temperatura, humedad y pH) en los que se lleva a cabo una serie de procesos físicos, químicos y biológicos en una muestra que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas. Se pueden mencionar biorreactores que han sido desarrollados anteriormente [5,6], pero estos solo ejercen uno o máximo dos estímulos físicos en el tejido, siendo estas condiciones de operación irreales a comparación de un tejido en un ser vivo.

Para que sea útil el desarrollar este biorreactor con más de dos estímulos se necesita de un scaffold⁵ capaz de soportar la variedad de cargas distintas utilizadas. Sin embargo, todavía no se ha desarrollado un scaffold hecho de un biomaterial⁶ que cumpla con estas características. Es por esto que la presente tesis busca la evaluación de diversos criterios para lograr el concepto de diseño de un scaffold con ciertas propiedades, tanto mecánicas, eléctricas como de biocompatibilidad, que permitan utilizarlo como estructura de un tejido en un biorreactor de múltiples estímulos. Esta propuesta se analizará mediante el uso de simulación computacional por el método de elementos finitos para validar sus características.

El scaffold será para un tejido músculo esquelético, debido a que este ya ha sido estudiado anteriormente, pero utilizando un estímulo como máximo, por lo que se dispone de información relacionada al tema. De igual manera, este tejido precisa de múltiples estímulos para su correcto funcionamiento, por lo que es de interés para la presente tesis.

⁵ Es un gel soluble que contiene las células madre y varios biomateriales que actúa como un andamio para mantener la estructura del tejido u órgano en su lugar.

⁶ Un biomaterial hace referencia a material ya sea natural o sintético que ha sido diseñada para interactuar con sistemas biológicos con un propósito médico [58].

Alcance

La presente investigación contempla el estudio de las necesidades primordiales que tiene un tejido músculo esquelético humano en condiciones de funcionamiento real, para seleccionar formas y materiales que permitan obtener el concepto de diseño de un scaffold para su uso en un tejido a analizar en un biorreactor. El concepto fue corroborado utilizando el software “COMSOL multiphysics”, en donde se simuló estímulos de tensión, voltaje eléctrico y perfusión para validar sus propiedades. Estas cargas se aplicaron de manera simultánea, correlacionándolas entre ellas para verificar que el diseño cumpla con las características requeridas.

Es importante precisar que la presente investigación no pretende brindar un nuevo diseño de biomaterial. Por otro lado, los estímulos biológicos, químicos y bioquímicos también se encontrarán fuera del alcance de esta tesis. Por último, tampoco se verán temas relacionados a la fabricación del scaffold propuesto ni el costo del mismo.

Antecedentes

De la revisión de literatura, se han encontrado diversas investigaciones en relación a la ciencia de crear nuevos scaffolds. Un componente importante para este, es el material del que está fabricado. Para facilitar el estudio de los tipos de biomateriales existentes, Anthony Atala en el libro “Principles of Regenerative Medicine”, realizó una categorización y listado. Estos se separan en biomateriales sintéticos, naturales y bioartificiales. El libro no solo hace mención de los mismos, si no también comenta las propiedades para las aplicaciones diversas.

A partir de esta recopilación de estudios se ha podido leer sobre diferentes investigaciones particulares de diversas aplicaciones y procedimientos de diseño para la

creación de scaffolds. Los diferentes materiales utilizados son metales, cerámicos, polímeros, tejidos descelularizados⁷, polisacáridos⁸ y proteínas.

Dentro de estos estudios, un ejemplo de los que más resaltaron fue “Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers”. Se analizó el uso de fibras de hidroxiapatita (aportando la resistencia a la tensión) para mejorar las propiedades mecánicas del scaffold de ácido polilactico (aportando la porosidad y absorbabilidad). Se llegó a la conclusión que la relación entre el porcentaje en peso de las fibras es directamente proporcional al módulo de elasticidad del compuesto por lo que su uso sería beneficioso para ciertas aplicaciones mencionadas [7]. Por otro lado, en la investigación “Designed biomaterials to mimic the mechanical properties of muscles”, se estudió sobre el uso de un biomaterial compuesto para imitar las propiedades mecánicas de un músculo. Se utilizó la proteína G (aportando las propiedades moleculares) y resilina proteica (aportando las propiedades macro mecánicas) para obtener un comportamiento parecido al caucho, mostrando una alta resistencia a la fatiga, comparables a las propiedades elásticas pasivas de los músculos analizados en el estudio. Los resultados demostraron que las propiedades mecánicas de estos biomateriales se pueden ajustar al cambiar la composición de las proteínas, brindando la oportunidad de desarrollar biomateriales cada vez más realistas para su aplicación en diferentes tipos de músculos. [8]

Por otro lado, actualmente existen investigaciones en donde se han desarrollado biorreactores para la maduración de un tejido embebido en un biomaterial, pero todos estos trabajan con uno o dos estímulos físicos a la vez, como máximo—los cuales pueden ser tensión, compresión, torsión, corriente eléctrica y perfusión [9]–[11].

⁷ Es la estructura de un tejido aislado de las células que lo habitan, dejando un andamio del tejido original, que puede ser utilizado en órganos artificiales y regeneración tisular.

⁸ Los polisacáridos son biomoléculas que cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales.

Sin embargo, de los estudios realizados sobre este tema, no se ha podido encontrar uno en el que se analice un scaffold cuya estructura sea apta para soportar los distintos estímulos deseados. Es por esto que la presente investigación busca diseñar un scaffold que pueda ser utilizado para un tejido en un biorreactor de múltiples estímulos.

Justificación y motivación

Una persona con un órgano dañado requerirá un trasplante. Esto puede ser debido a que el paciente no se cuidó lo suficiente o por algún accidente en el que este se lastimó. Estas operaciones son necesarias, pero no son realizadas cotidianamente debido a que las opciones de trasplante son realmente escasas.

El problema radica en que cada vez más personas requieren órganos y la cantidad de donantes no aumenta en la misma medida. Como se puede observar en la **Figura i**, en los últimos 30 años la brecha en los trasplantes de órganos en Estados Unidos ha continuado incrementándose debido a la poca cantidad oferta de órganos hábiles para el trasplante y al tener una población cada vez más grande, los pacientes en lista de espera continúan creciendo proporcionalmente.

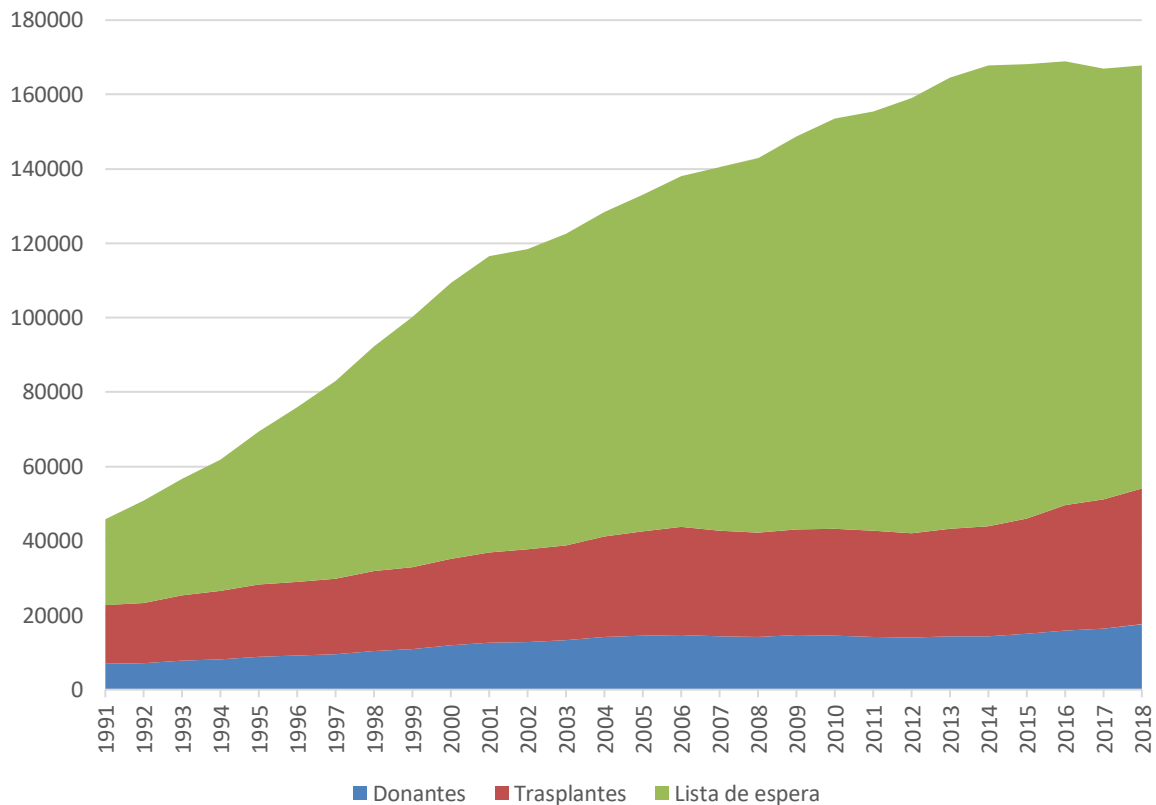


Figura i Estadística de Donación y Trasplante de Órganos en estados unidos
 Fuente: Organ Procurement and Transplantation Network. Annual Report [12].

Es posible ver que incluso en países de primer mundo como es el caso de Estados Unidos, las cifras de trasplantes son muy bajas. En este país existe una lista para ver qué paciente se le debe entregar un órgano primero. Para el caso del hígado, existe un algoritmo llamado *Model for End Stage Liver Disease* (MELD) [13], el cual determina cuán alta es la probabilidad de la muerte del convaleciente. A las personas con una expectativa de muerte más cercana se les atenderá primero.

En el caso del Perú, siendo un país con más de 30 millones de habitantes, solo 43 personas han aceptado donar órganos—es decir, menos del 0.0001% [14]. Es claro que este es un problema que requiere una solución urgente, ya que hay miles de vidas de personas que se encuentran en riesgo.

Por otro lado, así como no hay una gran cantidad de donante de órganos, la mayoría de veces los pacientes no son compatibles con estos nuevos órganos. Según la Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN), solo 3 de cada 1000 personas mueren de una forma en la que pueden dar sus órganos [15]. Esto se da debido a factores como:

- Sistema inmune incompatible: Este te protege de sustancias peligrosas para tu cuerpo como gérmenes, veneno y células cancerígenas. El nuevo órgano es un agente extraño para tu organismo, por lo que se deben tomar pastillas supresoras del sistema inmune para el trasplante.
- Tipo de sangre incompatible: El paciente debe tener un tipo de sangre compatible con el donante. Esta compatibilidad es la misma cuando una persona dona sangre regularmente.
- Características del fenotipo⁹: Ambas personas en el trasplante deben tener tamaño, raza, estilo de vida, porcentaje de grasa corporal y edad parecida para que se pueda llevar a cabo.

Luego de ver los problemas que trae el trasplante de órganos, la ingeniería de tejidos se ve como una posibilidad atractiva. Esta rama de la ciencia busca fabricar tejidos biológicos para su uso tanto en la rehabilitación de alguna parte del cuerpo, como en el trasplante de órganos enteros de pacientes.

Actualmente se está experimentando con el uso de estímulos para mejorar el desarrollo del tejido fabricado in vitro. La gran mayoría de investigaciones que han estudiado esto han utilizado una poca cantidad de estímulos a diferencia de las condiciones a las que se encuentran los órganos en el cuerpo humano. Los estímulos utilizados son soportados gracias al scaffold utilizado como soporte del tejido. Es por esto que esta tesis pretende diseñar un scaffold capaz de resistir más estímulos distintos, para que la experimentación sea cada vez más parecida al ambiente en el cual se hallan los órganos.

⁹ Se puede definir como la expresión del genotipo (contenido genético o genoma de un individuo) en un determinado ambiente, incluye tanto rasgos físicos como conductuales [59].

Objetivo general

Plantear una metodología para el diseño un scaffold de un tejido músculo esquelético el cual será usado en un biorreactor de múltiples estímulos.

Objetivos específicos

- Analizar los parámetros de estimulación y requerimientos de un scaffold para la aplicación propuesta.
- Estudiar sobre la selección de un biomaterial para el scaffold.
- Investigar los elementos principales para realizar una simulación de tejidos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Para poder comprender el contenido del proceso metodológico de la investigación, el presente capítulo se enfocará en tres grandes ramas de información: Introducción a la ingeniería de tejidos, uso de los estímulos físicos en distintos tejidos y consideraciones de simulación tisular. Cabe recalcar que la información brindada será analizada y utilizada para su desarrollo posterior.

Se empezará describiendo la ingeniería de tejidos, debido a que es importante conocer de forma precisa el procedimiento de fabricación tisular para comprender el por qué se debe ejercer un estímulo en el biomaterial. En segundo lugar, se caracterizarán los estímulos físicos, principalmente mecánicos y eléctricos, presentando investigaciones previas de cómo se han experimentado la tensión, compresión, flujo eléctrico, etc. Por último, se describirá la simulación tisular, en la que se mostrarán técnicas para el modelamiento del biomaterial y su aplicación en la presente investigación.

1.1 Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos es la rama que combina la ingeniería con ciencias de la vida y consiste en producir tejidos biológicos in vitro. Al igual que cualquier otra tecnología, se requieren ciertos pasos para obtener el producto final y este, a su vez, dependerá directamente de parámetros de diseño a lo largo del camino. En las siguientes subsecciones se explicará el procedimiento a seguir para la fabricación tisular de una forma más detallada, evitando profundizar en partes que sean de menor importancia o que escapen del enfoque del proyecto; como, por ejemplo, la manipulación genética, aplicación de sensores biológicos, vascularización e implementación del tejido al paciente. En la **Figura 1.1** se presenta el proceso general de fabricación tisular, cuyos pasos serán descritos de manera detallada en las siguientes sub secciones.

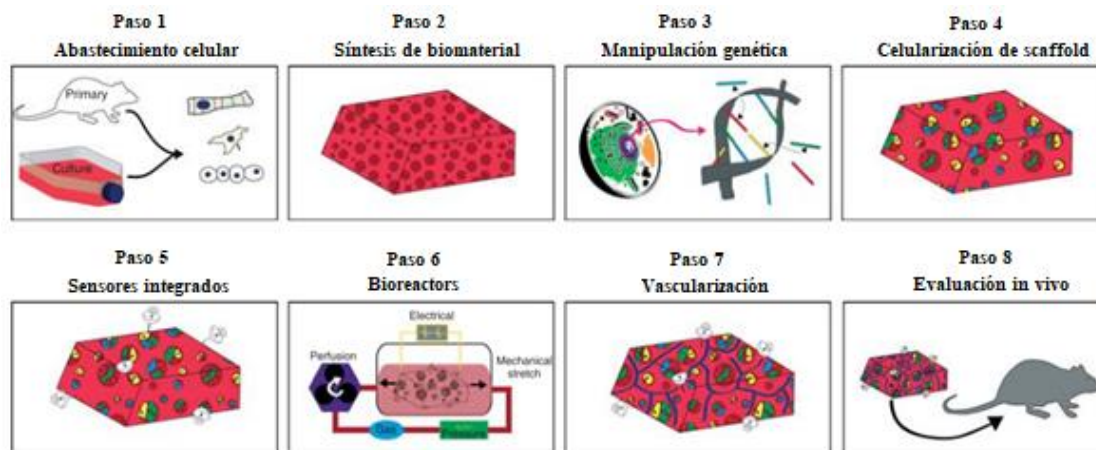


Figura 1.1 Procedimiento general de fabricación tisular.

Fuente: Birla, R. Introduction to Tissue Engineering: Applications and Challenges [16].

Como se puede observar en la **Figura 1.1**, para obtener un tejido de soporte o de sustitución, el primer paso es extraer células del paciente para poder hacerlas proliferar. Posteriormente, se producirá un biomaterial cuya función será la de sostener a las células en el momento de la aplicación de estímulos, como una matriz extracelular¹⁰ o scaffold. El tercer paso es la manipulación genética del material extraído del paciente, particularmente en casos en los que se desee curar alguna enfermedad hereditaria o un atributo no deseado que se encuentre en los genes de los tejidos a fabricar. Luego, se proceden a introducir estas células en el biomaterial y se le aplican sensores biológicos. Estos últimos serán indicadores de cómo está reaccionando el tejido celular a lo largo de la experimentación.

El sexto paso se divide en dos: Primero, incubar las células en un biorreactor de cultivo celular para hacer que se reproduzcan y tengan suficiente tamaño y segundo, llevar el tejido ya formado a un biorreactor de maduración. El séptimo paso es el de la vascularización del tejido ya maduro; es decir, la formación caminos vasculares a lo largo del tejido para la irrigación de nutrientes. Por último, el tejido vascularizado es implementado al paciente para total recuperación.

¹⁰ La matriz extracelular es el conjunto de biomateriales que forman parte de un tejido en el que están "inmersas" las células. Sirve de soporte, estructura y red de señalización entre células.

Cabe recalcar que la presente investigación no abordará la mayor parte de los temas, pero es de vital importancia conocerlos para entender el propósito de la misma.

1.1.1 Biología celular

Las células con las cuales se empieza el método de la ingeniería de tejido son de suma importancia debido a que son nuestros bloques de construcción para el tejido. Aunque en esta investigación no se va a profundizar en este tema, es necesario saber que es importante para poder entender cómo se comportará el tejido una vez que esté maduro. Durante la fabricación tisular se utilizarán células madre en su mayoría, por su capacidad reproductiva, su función no especializada y su capacidad de desarrollarse en una célula de un tejido específico [16].

1.1.1.1 Tipos de células madre

Cuando un óvulo es fecundado y está pasando por el proceso de volverse un embrión, la pequeña cantidad de células que este posee no están especializadas; esto quiere decir que todavía no tienen una función específica. Esta amalgama celular poco a poco va a ir diferenciándose para formar músculos, huesos y hasta órganos. El proceso de las células de empezar a tener una ocupación determinada es progresivo y depende de la expresión de genes que lleva a cabo cada célula madre [17].

Como este cambio es gradual, se van a encontrar distintos tipos de células madre dependiendo de su potencial de diferenciación. Primero se tienen a las pluripotentes, que se pueden convertir en cualquier tipo de célula, ya que son de embriones humanos. Luego se tienen las multipotentes, estas se pueden diferenciar en varios tipos de células de una determinada categoría; por ejemplo, las células madre hematopoyéticas, que se pueden diferenciar en cualquier tipo de células de sangre. Después, se tienen las unipotentes que se pueden reproducir de una manera más rápida que las células normales, pero se vuelven solo un tipo de células. Por último, se tienen las células especializadas que son las que forman la mayor parte del tejido.

Como se puede inferir, las células más llamativas para trabajar en la ingeniería de tejidos son las pluripotentes, las cuales solo se encuentran en fetos humanos, por lo que es casi imposible de obtener para un paciente adulto [18], [19]. Es por esto que actualmente se está trabajando para desarrollar distintas técnicas para volver una célula madre cualquiera a su estado inicial de no diferenciada. A este método se le conoce como pluripotencial inducido y se lleva a cabo al expresar cuatro factores de transcripción¹¹ que se encuentran en el genoma humano [20]. Más adelante se explicará porqué este tipo de células embrionarias son clave para la presente investigación.

1.1.1.2 Matriz extracelular

La matriz extracelular es el biomaterial de soporte celular que permite que estas puedan recibir cargas mecánicas sin llegar a dañarse. Está formada por múltiples tipos de proteínas—ya sean naturales o sintéticas—que interactúan con las células a su alrededor, aportando sustento nutricional. Esta interacción moldea el comportamiento tanto de las células como de la matriz, volviéndolas dinámicas a lo largo del tiempo, dependiendo de los estímulos físicos, químicos y biológicos que pueden hacerse presente en el ambiente [21].

Esta matriz no se encuentra estrictamente para resistir fuerzas o para brindar nutrientes, si no también puede cumplir la función de ser un espacio de interacción con las células para transmitir información, como ocurre en las células del sistema nervioso [22]. Es por esto que es indispensable que el biomaterial a utilizar pueda estar sometido a la mayor parte de estímulos que se encuentran en condiciones normales de operación (dentro del ser humano).

¹¹ Un factor de transcripción es una proteína que controla qué segmentos del gen humano serán utilizados para empezar la cadena de mensajería intercelular. Promueven ciertas partes del genoma dependiendo de las necesidades de la célula.

1.1.1.3 Señalización y diferenciación celular

El proceso de señalización ocurre con interacciones de célula-célula, célula-matriz extracelular o célula-medio ambiente. Estas diferentes interacciones—tanto en magnitud, origen, duración, etc.—generan que distintos genes se transcriban y se produzcan proteínas, dependiendo del entorno en el cual se encuentra la célula o tejido a analizar. Por ejemplo, los receptores en la superficie de nuestra piel desencadenan una cascada de eventos de señalización al recibir un estímulo del medio ambiente. Estos receptores pueden censar un calor extremo y enviar una señal para retirar la mano y enviar proteínas para reparar la zona afectada. De esta manera la señalización celular es sustancial al momento de analizar tejidos biológicos [23].

Las células pluripotentes se convertirán en un tipo de célula madre, para producir células específicas a cada órgano de nuestro cuerpo dependiendo de los estímulos físicos, químicos y biológicos, tanto del interior de nuestro cuerpo como del entorno que nos encontramos; a este proceso se le conoce como diferenciación celular. Entonces a partir de una célula, se podrán generar distintos tipos de tejidos con características únicas al variar el proceso de excitación al cual se le somete. Estos estímulos se podrán utilizar más adelante no solo para diferenciar, sino también para madurar el tejido.

Es por esta razón que el biomaterial compuesto—trabajado como matriz extracelular o scaffold— debe ser capaz de funcionar como una vía de señalización, tanto mecánica como eléctrica. Este deberá poder resistir las cargas que no pueden ser toleradas por las células como es la tensión y fuerza cortante ejercida por un flujo contiguo.

1.1.2 Biorreactores

Como se ha mencionado anteriormente, para poder fabricar un tejido es necesario el poder simular *in vitro*, las condiciones a las que se encuentra *in vivo*¹² en los seres humanos. Se deben simular tanto el ambiente de nacimiento de las células—para las células

¹² Se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo.

embrionarias sería el útero de una mujer—, como en el que se vive luego de su crecimiento o mundo real. Ambas situaciones se generan a partir de una máquina llamada biorreactor. Para el primer entorno se utiliza un biorreactor de cultivo celular y para el segundo un biorreactor de maduración.

Luego de las secciones anteriores se puede llegar a entender biológicamente el porqué es importante tener un procedimiento de estimulación a la muestra a trabajar. Pero para dar otro ejemplo, se puede analizar el problema por el que pasan los astronautas al regresar al planeta. Como estos no han recibido el estímulo constante al cual estamos sometidos, el cual es la gravedad, los músculos y huesos se les atrofian. Esto ocurre debido a que, al no estar en constante compresión y tensión, estos se debilitan porque pierden masa. Una vez ellos regresan y realizan terapia vuelven a la normalidad; esto nos puede hacer ver la dependencia natural de los tejidos a los estímulos.

1.1.2.1 Biorreactor de cultivo celular

Este tipo de biorreactor consta de varias etapas para lograr obtener el tejido como producto, las mismas que se observan en la **Figura 1.2**. Se hará un resumen de cada parte del procedimiento, ya que es extenso y no es el foco de la investigación.

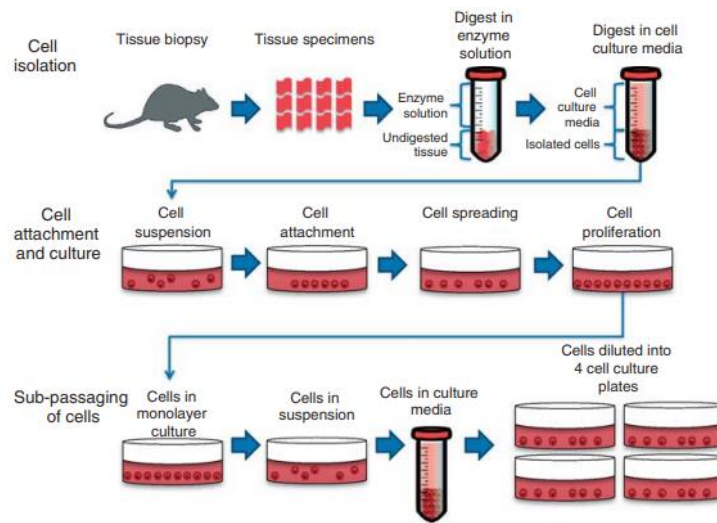


Figura 1.2 Proceso de biodegradación de un biomaterial.

Fuente: Birla, R. Introduction to Tissue Engineering: Applications and Challenges [16].

Se empieza realizando una biopsia(*biopsy*) del espécimen a analizar (ya sea un humano o no) para obtener una pequeña porción de su tejido. Como esta parte contiene diferentes células de tejido venoso y nervioso, matriz extracelular y hasta grasas, se le aplican unas enzimas¹³(*enzymes*) para que digieran toda la parte que se desea desechar [16].

Luego, se le introduce en un medio de cultivo(*culture media*), el cual es un líquido o gel diseñado para soportar el crecimiento de microorganismos, células o pequeñas plantas [24]. Este fluido es de los componentes más importantes, ya que contiene todos los nutrientes, vitaminas, proteínas y hasta hormonas para que el cultivo pueda crecer con normalidad. Una analogía que se puede utilizar es la de comparar el medio de cultivo con el líquido amniótico—el cual se encuentra dentro de la placenta de una madre gestante—por sus constituyentes que fomentan el desarrollo tisular. Así como el feto también tiene desechos biológicos, las células deberán ser cambiadas de fluido cada cierto tiempo, para colocar un medio nuevo y sin toxinas.

Una vez se encuentren en el medio de cultivo, estas deben ser adheridas a una superficie (en el caso de un tejido en 2D) o una matriz (en el caso de un tejido 3D), para reducir el porcentaje de mortalidad, las mismas que deben estar compuestas por biomateriales en su totalidad. Después que estas estén debidamente distribuidas, se procederá a añadir factores de crecimiento para aumentar la densidad celular en el cultivo. Así mismo, se realizará un filtrado periódico en el cultivo para evitar que haya partículas o microorganismos que alteren la eficiencia del proceso.

Al ser este un proceso que tiene un índice de falla elevado, dentro de los últimos años se han desarrollado biorreactores que se encargan de cambiar el medio de cultivo y controlar factores ambientales como la temperatura, pH y humedad del área. Todo esto se realiza en múltiples frascos de cultivo a la vez, ya que, al tener una tasa de mortalidad alta, serán pocas las pruebas que resultarán en una formación de tejido exitoso.

¹³ Las enzimas son moléculas orgánicas que aceleran la velocidad de las reacciones químicas.

1.1.2.2 Biorreactor de maduración

En el caso de los biorreactores de maduración, también se espera que estos mantengan los factores ambientales como en la sección anterior, solo que se adicionarán los estímulos para la diferenciación y el desarrollo del tejido. Los posibles estímulos a aplicar son de carácter físico, eléctrico, de flujo, biológico y químico; los últimos tres no se tomarán en cuenta porque escapan del alcance de la presente investigación. En la primera categoría se encuentran la compresión, tensión—tanto en un eje como en dos—y torsión.

Como se puede ver en la **Figura 1.3**, los efectos directos e indirectos de la aplicación de los estímulos físicos son extensos. Se puede observar que esta excitación primero recorre un camino más macro al ser transmitidos a través de la matriz extracelular, activadores de la célula y el citoesqueleto. Esto resulta en señalización interna de la célula con ciertos métodos como son la utilización de péptidos, canales de iones, permeabilidad de la membrana o hasta receptores, los cuales se traducen en expresión de un determinado gen. Esta expresión es lo que finalmente nos permite ver cambio de composición y comportamiento en el tejido a analizar [25]. Se debe aclarar que este camino es similar para el caso de los estímulos eléctricos, como se puede observar en la **Figura 1.4**.

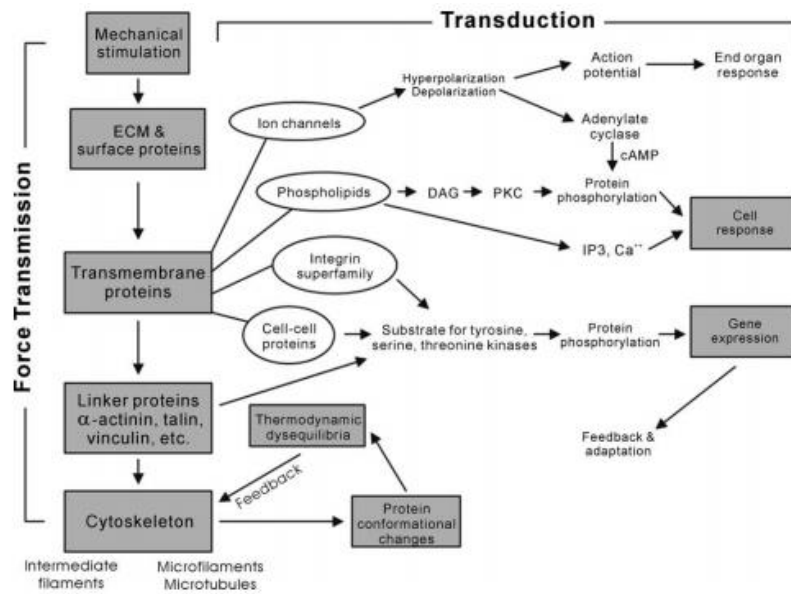


Figura 1.3 Efectos directos e indirectos de la estimulación mecánica en las células.

Fuente: GyuHuyn, J; Gi-Hoon, Y & GeunHyung, K. Tissue engineering bioreactor systems for applying physical and electrical stimulations to cells [25].

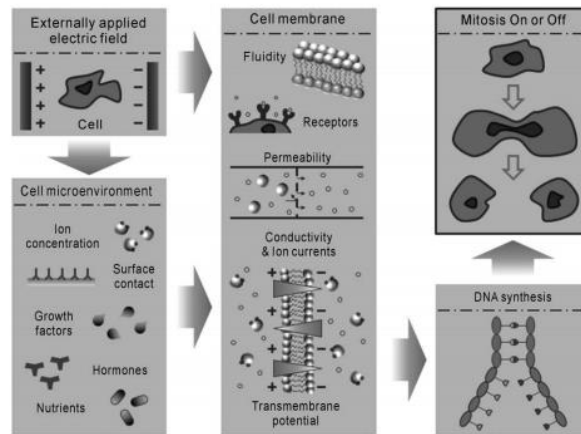


Figura 1.4 Descripción teórica de los efectos de la estimulación eléctrica en las células.

Fuente: GyuHuyn, J; Gi-Hoon, Y & GeunHyung, K. Tissue engineering bioreactor systems for applying physical and electrical stimulations to cells [25].

Otro aspecto importante a considerar en los biorreactores es el proceso de estimulación. El primer parámetro es la magnitud del estímulo a utilizar. Si el tejido se encuentra en una etapa inicial, se deben aplicar excitaciones leves para ir comprobando que este vaya a resistir. Luego, progresivamente se deberá incrementar la fuerza para que este llegue a madurar y

soportar la carga a la que va a ser utilizado. Esto debe ser realizado sin llegar a dañar el tejido ni fatigarlo por excesiva carga.

El segundo parámetro es el tiempo de estimulación al cual es sometido el elemento. Se debe programar un protocolo de excitación con similitud a la del paciente para que este se vaya acostumbrando a sus condiciones in vivo. El último parámetro es el del tiempo de recuperación, el cual representa el tiempo en el que el tejido debe descansar para que se recupere y así vaya fortificándose [16].

1.2 Anatomía y fisiología del tejido

Para poder simular correctamente el biomaterial a diseñar con los estímulos del músculo en el cuerpo humano a condiciones normales, se debe poder comprender tanto su micro anatomía como su fisiología. La primera de estas hace referencia a la forma de las micro estructuras internas del tejido. En el segundo caso, es entender la función de cada componente.

1.2.1 Microestructura protéica

Más del 40% del peso de nuestro cuerpo es de tejido muscular. Dentro de este grupo existen diversos tipos de músculos dependiendo de su estructura y funcionalidad. Estos se clasifican en tres principales categorías:

- **Músculo cardiaco:** Se puede encontrar solamente en tejido del corazón. Se considera un músculo involuntario por su actividad automática de palpar [26].
- **Músculo blando:** Forma parte de la mayoría de órganos internos como los bronquios, estómago, esófago, arterias, etc. [26].
- **Músculo esquelético:** Es el tejido muscular más extenso y el que nos permite movernos y mantener una postura [26].

Estos tres tipos de músculos tienen una composición muy similar entre ellos, como se puede observar en la **Figura 1.5**. Luego del primer acercamiento al interior del cuerpo humano, se encuentra el músculo en sí con algunos componentes como vasos sanguíneos, tendones, etc. El segundo punto a mirar es una fibra muscular, en donde hacen un tercer acercamiento a una miofibrilla. En esta posición se observa un sarcómero que es la microestructura de interés.

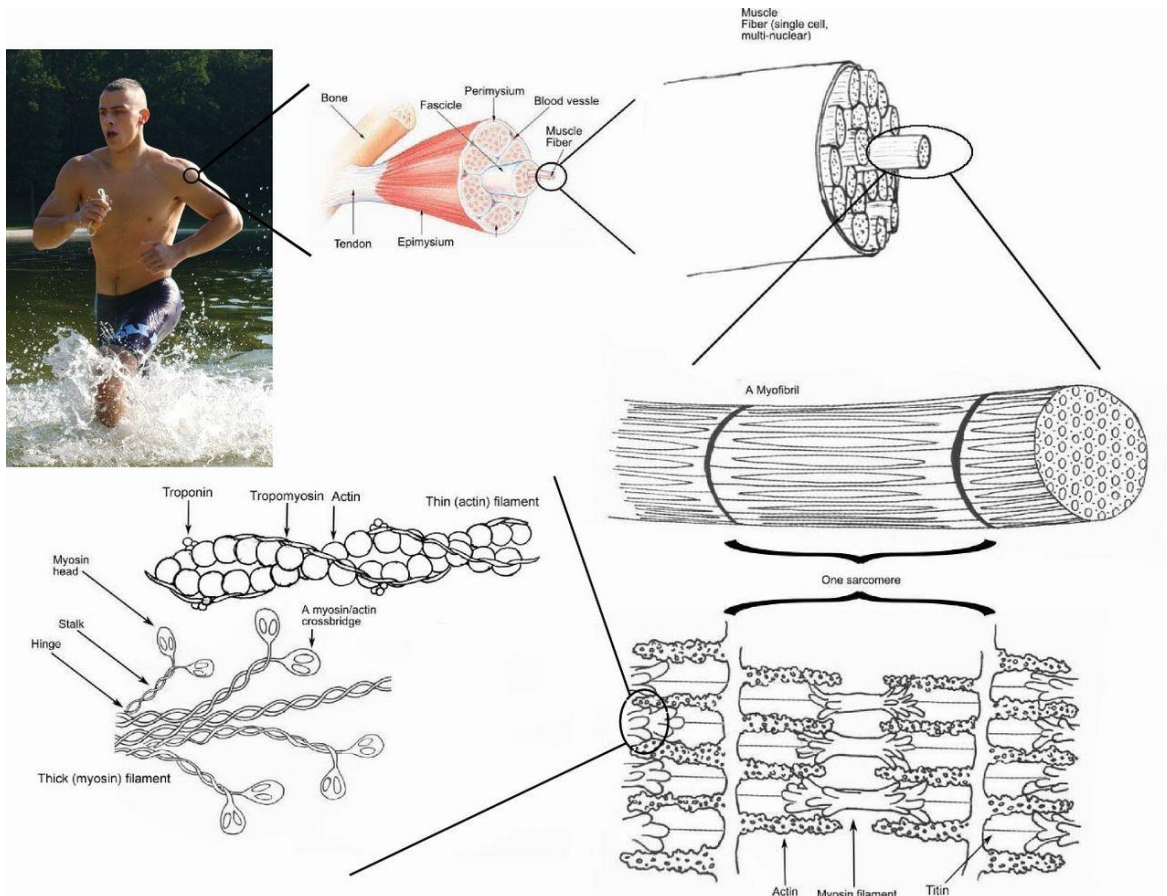


Figura 1.5 Organización jerárquica del músculo esquelético.
Fuente: Raul654. Wikipedia Commons [27].

Luego de contextualizar la posición de un sarcómero desde un músculo esquelético, este se puede estudiar de una mejor manera. El biomaterial a desarrollar se parecerá tanto estructuralmente como funcionalmente a esta porción del tejido.

Según la teoría del filamento deslizante, la configuración proteica del sarcómero es la observada en la **Figura 1.6**. Estos se encuentran posicionados uno tras de otro como se pudo observar en la **Figura 1.5**, lo que los limita es el disco Z (el cual sirve como un anclaje de la titina y actina). Entre ambos discos está la banda I y la zona H; cuando ocurre la contracción muscular, la primera de estas se desplaza hacia el interior y la segunda se encoge [28].

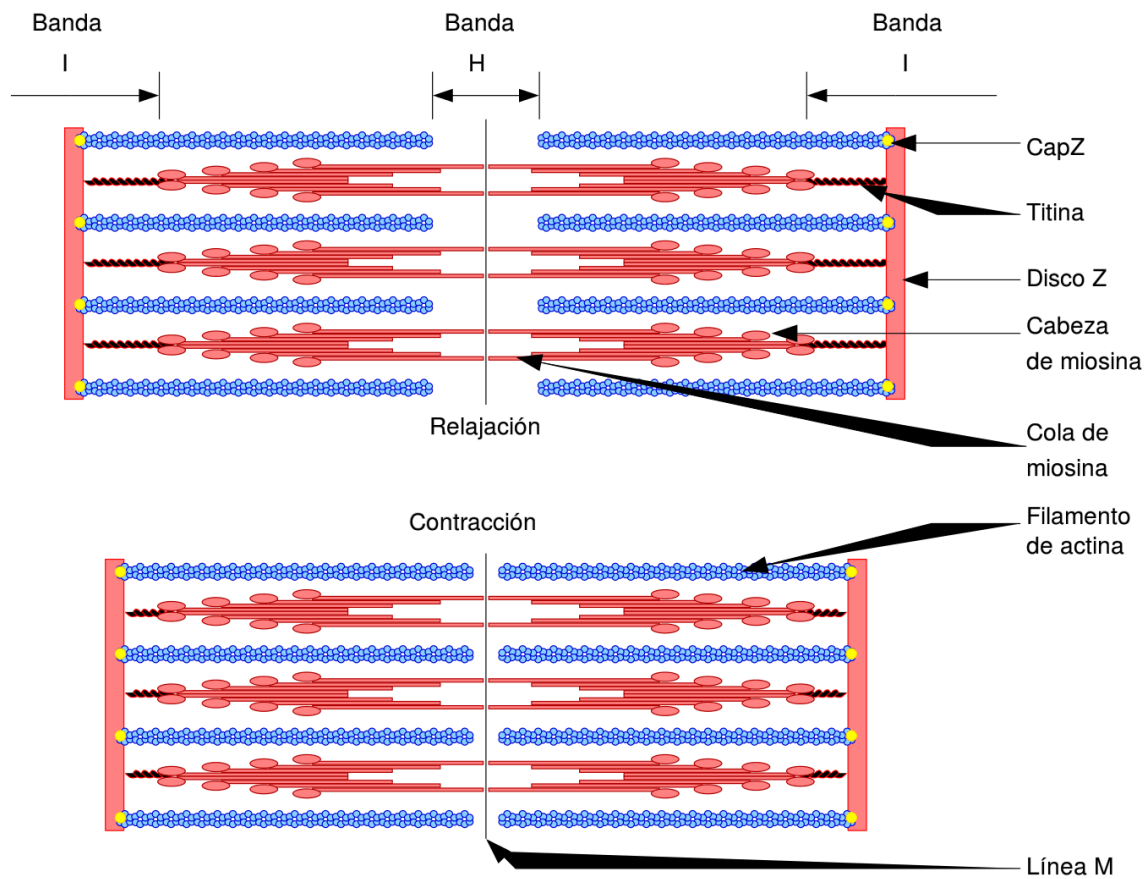


Figura 1.6 Teoría del filamento deslizante: un sarcómero en posiciones relajadas (arriba) y contraídas (abajo). Fuente: Richfield, D. WikiJournal of Medicine [29].

Dentro de estas secciones, los componentes más importantes son los filamentos de actina, los filamentos de titina y las miosinas. La tarea de la primera de estas proteínas es la de ser un soporte mecánico de las células y una vía de señalización celular rápida. La segunda funciona de resorte molecular para cuando el músculo está relajándose. Por último, la miosina

es la proteína que contrae al tejido al momento de utilizarlo; es por esto que es la más grande e importante [26].

1.2.2 Microcirculación

Una gran sección del tejido que será de importancia en la presente investigación es el sistema circulatorio. Este es un tema relativamente extenso que no será cubierto por completo; sin embargo, el componente que sí cobra relevancia para el presente estudio son los vasos capilares de la estructura interna de los músculos. Estos son los vasos sanguíneos más pequeños del cuerpo, por lo que son los únicos capaces de estar a través de las fibras musculares, como se puede observar en la **Figura 1.7**. Al realizar esto, transportan el flujo sanguíneo a todas las células que lo requieran. Los capilares son vitales para el funcionamiento muscular, ya que se encargan del intercambio de nutrientes, desechos y hasta hormonas [30].

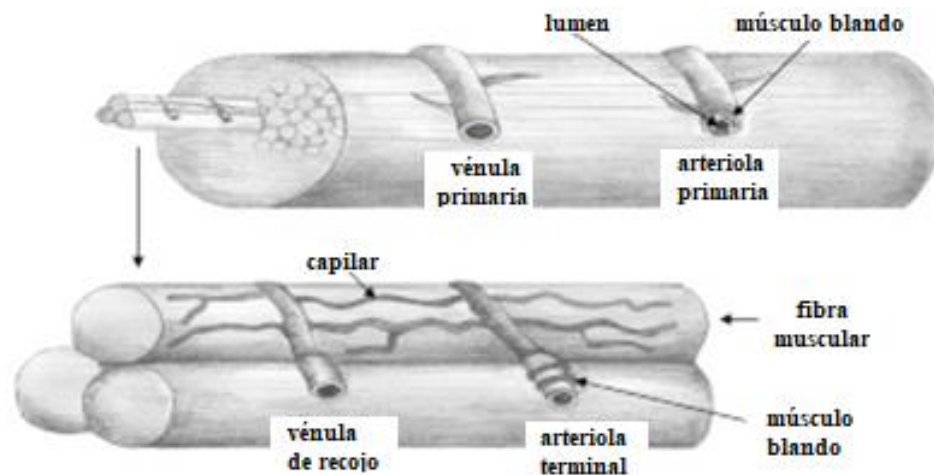


Figura 1.7 Un esquema de la anatomía de los vasos sanguíneos en un músculo.
Fuente: Barrett, E & Rattigan, S. Diabetes [30].

1.3 Biomateriales

Según Ravi Birla, “*un biomaterial es cualquier sustancia que simula una matriz extracelular interactuando funcionalmente con células aisladas para apoyar la fabricación*

y maduración del tejido artificial 3D”. En el caso de la ingeniería de tejidos, el biomaterial funcionará para ayudar a las células a resistir las cargas, para ser una ruta de señalización celular y para brindar nutrientes embebidos en este componente. Otro aspecto a considerar cuando se analiza el biomaterial es su degradación en el tiempo, su biocompatibilidad¹⁴ y la porosidad para fomentar su adhesión celular.

1.3.1 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas que presenta el biomaterial serán vitales para la selección del biomaterial a utilizar. Esto es debido a que diferentes tejidos soportarán una cantidad de cargas dependiendo del órgano a reproducir. Por ejemplo, para la maduración de un tejido óseo se requerirá de una fuerza de compresión mayor a la que se utilizaría para tejidos blandos como el hígado o riñón. En el caso de los tejidos musculares, se buscará tanto fuerza de tensión como de compresión por su característica contráctil. Algunos valores para diferentes tejidos se pueden observar en la **Figura 1.8**.

¹⁴ La biocompatibilidad es la capacidad de un material para actuar con una respuesta adecuada del medio biológico en el cual son utilizados (un ser humano u otro ser vivo).

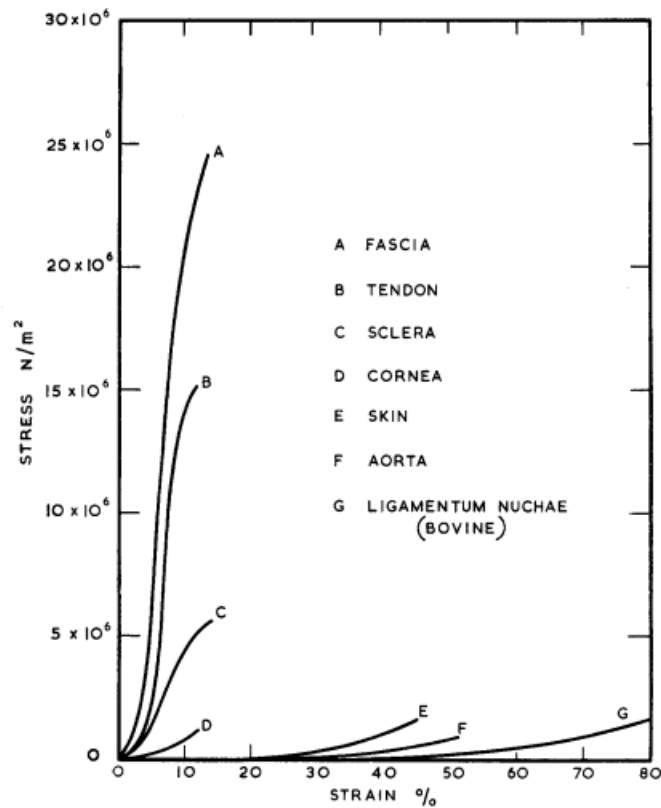


Figura 1.8 Curva de esfuerzo-deformación de varios tejidos conectores.
Fuente: Soden, P & Kershaw, I. Tensile testing of connective tissues [31].

Por otra parte, cabe recalcar que estas características son significativas porque no solo van a resistir cargas, sino que también serán estímulos que enviarán señales mediante las interacciones célula-matriz extracelular. Estos vínculos harán que el tejido se exprese y que madure.

1.3.2 Materiales compuestos

Los biomateriales a utilizar tienen que comportarse de igual manera que los tejidos biológicos. Es por esto que cada vez se están utilizando más materiales compuestos. Con estos se puede extraer características—desde valores del módulo de Young hasta de biocompatibilidad—deseadas de cada componente y al variar su concentración variará la magnitud de esta propiedad.

Hay ocasiones en las que el material que se está utilizando no llega a tener las cualidades necesarias. Por ejemplo, en una investigación realizada por Kasuga, en Japón, se estudió el uso del ácido poliláctico para hacer una matriz extracelular encontrada en un tejido óseo. Se utilizó este material por su degradación en el tiempo y su biocompatibilidad; pero su módulo de elasticidad (2-7 GPa) era muy bajo con respecto al del hueso real (3-30 GPa). Es por esto que le adicionaron hidroxiapatita¹⁵ para formar un compuesto con las características que requerían [7].

1.3.3 Biocompatibilidad

El cuerpo humano es capaz de detectar, mediante el sistema inmunológico, si es que existe algún intruso en el organismo. Es por esto que cuando se selecciona una herramienta para una aplicación médica se busca que este no sea visto como una amenaza para el cuerpo. La capacidad de un material para llevar esto a cabo es su biocompatibilidad. Esta característica es de vital importancia tanto cuando se está utilizando un implante interno (prótesis, dispositivos de suministro de drogas o marcapasos) o como cuando se está trabajando directamente con tejidos (ingeniería de tejidos, cirugía o estudios clínicos).

1.3.4 Biodegradación

La última característica que se busca en un biomaterial es su degradación a lo largo del tiempo sea por causas físicas, químicas o biológicas, en las cuales se pueden encontrar métodos como hidrólisis, calor, enzimas, fatiga, oxidación, fricción, etc. Esta propiedad es importante debido a que el biomaterial a utilizar es solo un soporte del cultivo celular a desarrollar; es por esto que se debe retirar una vez el tejido haya crecido y madurado. Se busca que sea de esta manera, ya que en así también funcionan ciertas proteínas en nuestro cuerpo y se desea que este material sea lo más parecido al funcionamiento humano posible.

¹⁵ La hidroxiapatita es un mineral biológico que representa un depósito del 99 % del calcio corporal y constituye alrededor del 60-70 % del peso seco del tejido óseo [60].

Los criterios a evaluar para el diseño de degradación del biomaterial son: La tasa a la cual se desea que el componente se desintegre, el daño que podría ocasionar el método en las células y el daño que podrían ocasionar productos de la reacción química—si hubiese— a las células. Con estos criterios de operación se debe crear o fabricar un biomaterial para el resultado deseado. Se puede observar el proceso de degradación en la **Figura 1.9**.

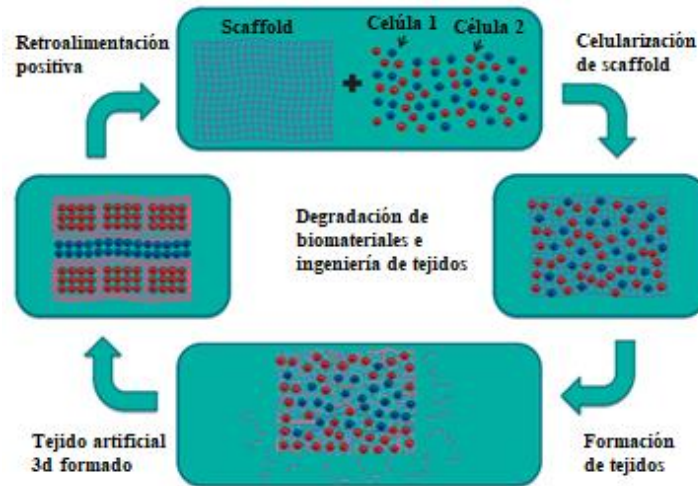


Figura 1.9 Proceso de biodegradación de un biomaterial.

Fuente: Birla, R. Introduction to Tissue Engineering: Applications and Challenges [16].

1.4 Estímulos físicos

Como se ha venido observando a lo largo de la investigación, los estímulos a utilizar son de suma importancia. Es por esto que en esta sección se verá más a fondo el cómo afecta el protocolo de estimulación a los tejidos. Se analizarán distintos casos de estudio en los que se verán la aplicación de los estímulos mecánicos y eléctricos, así como los resultados obtenidos por estos. Esto se hará para poder comprender la respuesta gracias a los impulsos accionados en el tejido. No está de más recordar que estudiar los parámetros bioquímicos y biológicos es fundamental, pero salen del enfoque del estudio.

Dentro del estudio de los estímulos físicos se verá que existen dos categorías: Los estímulos mecánicos y los eléctricos.

1.4.1 Estímulos mecánicos

Los estímulos mecánicos van a estar englobados en tres categorías: Compresión, tensión y perfusión. La mayoría de aplicaciones con estos tejidos se encuentran en huesos y articulaciones, ya que, estos no cuentan con vías sanguíneas, por lo que son más fáciles de fabricar.

1.4.1.1 Compresión

Existen diferentes formas en las que la compresión se puede aplicar en un tejido. En el caso de la masa ósea, esta está siendo comprimida por la carga del cuerpo y su interacción con el ambiente. Otra forma de compresión se encuentra en el caso de las articulaciones. El cartílago se comprime cuando este se frota con el hueso, por lo que se genera una fuerza cortante en la superficie. Por último, se puede observar una forma de compresión cuando un órgano es impactado por un golpe externo.

En una investigación en Australia, realizada por Shahin, se fabricó una especie de biorreactor que simula el accionar de la articulación de la rodilla, como se puede observar en la **Figura 1.10**. Comparando el grupo experimental con el grupo control, los resultados indicaron el crecimiento del tejido en función al peso, pero una disminución en número de células. Esto nos indica que el tejido se volvió más denso. También se puede indicar que se tornó más resistente porque se produjo un aumento sustancial de la cantidad de colágeno tipo 2 (el cual forma parte del 90% del cartílago articular). Por otro lado, hubo un incremento de glicosaminoglicano, el cual es un carbohidrato utilizado por nuestro cuerpo para absorber impacto y lubricar áreas de contacto. Por último, indican que no hubo correlación significativa entre la cantidad de células utilizadas en el cultivo y el porcentaje de proliferación [32].

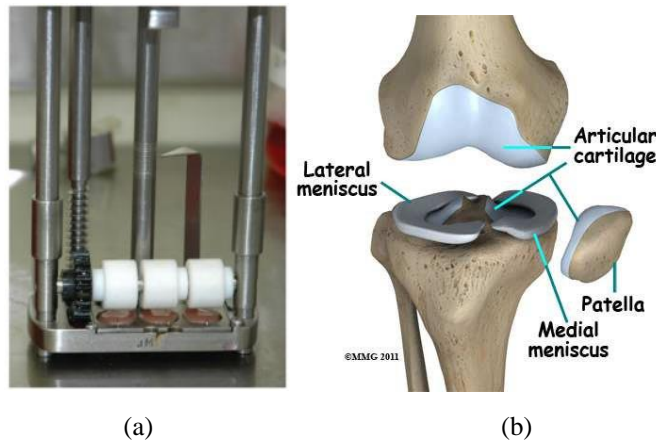


Figura 1.10 (a)Generador de estímulos de un biorreactor simulador de rodilla. (b) Representación de una rodilla real.

Fuente: Shahin, K & Doran, P. Tissue Engineering of Cartilage Using a Mechanobioreactor Exerting Simultaneous Mechanical Shear and Compression to Simulate the Rolling Action of Articular Joints [32].

Los resultados histológicos¹⁶ de esta investigación se pueden observar en la **Figura 1.11**. En la columna de la izquierda se encuentran las muestras del tejido control y en la derecha el tejido al que se le aplicó el estímulo. En las primeras cuatro figuras se ha realizado un examen para identificar rastros del biomaterial utilizado al momento de hacer el cultivo celular. Como se puede ver, en la muestra control sigue habiendo bastante presencia de este (color rosa); mientras que, al aplicarle la compresión con los rodillos, este fue desintegrándose para poder formar tejido. En las cuatro figuras siguientes se observa la presencia del colágeno tipo 1 y tipo 2 (color marrón). Es clara la diferencia entre ambas muestras y se aprecia el incremento significativo de estas proteínas.

¹⁶ La histología es la disciplina de la biología que estudia la composición, la estructura y las características de los tejidos orgánicos de los seres vivos [61].

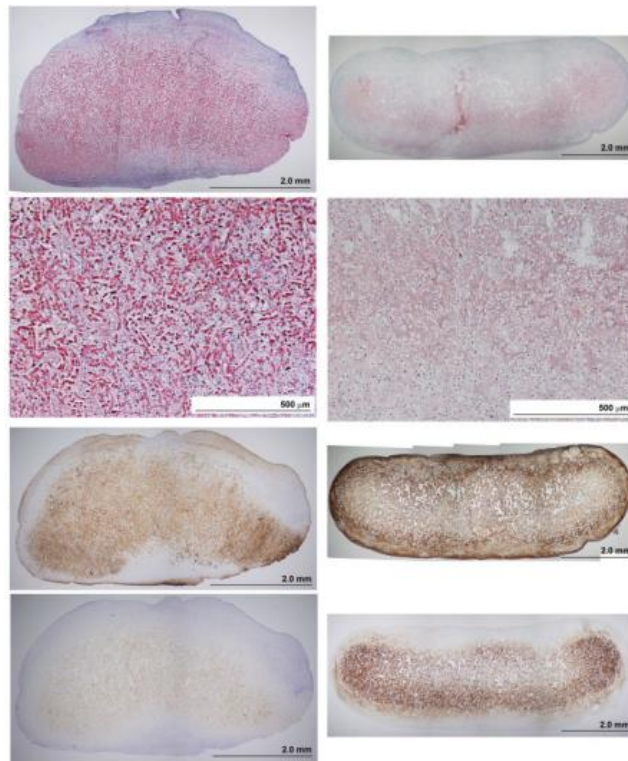


Figura 1.11 Resultado histológico de los resultados de la experimentación.

Fuente: Tissue Engineering of Cartilage Using a Mechanobioreactor Exerting Simultaneous Mechanical Shear and Compression to Simulate the Rolling Action of Articular Joints. Shahin, K & Doran, P. [32]

En otro estudio obtuvieron resultados parecidos a los de la investigación anterior. En este caso solo se utilizó un dispositivo que ejercía compresión por un pistón. Ellos hicieron más énfasis en que los tejidos madurarían más si se realizaba la prueba por un periodo largo de experimentación. También destacaron que sus resultados variaban considerablemente por el estado de las células que se extrajeron [33]. Esto se puede observar en la **Figura 1.12**. Ambas columnas son de pacientes diferentes; la primera fila es del principio del experimento y la segunda es luego de aplicar la compresión. Se puede ver la variación tanto entre los donantes como su progresión a lo largo del tiempo.

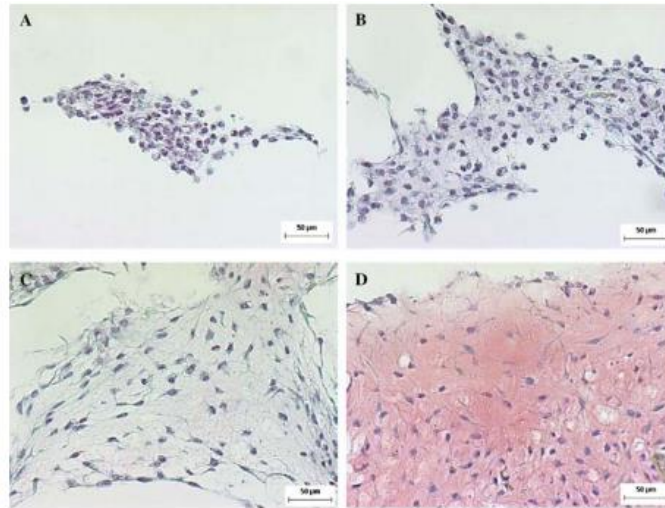


Figura 1.12 Resultados de la tinción del tejido diseñado de dos donantes diferentes.
Fuente: Démarteau, O; Wendt, D; Braccini, A; Jakob, M; Schafer, D; Heberer, M & Martin, I. Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes [33].

Se han realizado una extensa cantidad de investigaciones con diferentes variaciones, pero todas entregan resultados congruentes entre sí. En un caso se utilizaron células madre de conejos y compresión con un pistón para lograr madurarlas en un tejido óseo [11]. En otro caso se intentó hacer que el estímulo no sea cíclico para observar cómo respondería el tejido, encontrando que el tejido se empezó a comprimir y volverse una esfera, lo que empeoró sus propiedades mecánicas así como evitó el flujo de salida de los desperdicios de las células [34].

1.4.1.2 Tensión

En el caso de la tensión, existen investigaciones de la aplicación de tensión en un tejido, tanto de forma uniaxial como biaxial. Para la primera de estas podemos ver el caso de la piel en dedos, que se comprime en un solo sentido al cerrar la mano. Pero cuando se observan órganos más complejos como los pulmones o el estómago, estos se tensionan en más de una dirección cuando están siendo utilizados.

En un estudio realizado por Kreja, se analizó el efecto de la tensión en un biomaterial sembrado de células madres para su posterior uso como ligamento. Se comparó la utilización

de células madres tanto multipotente como las unipotentes y se vio que las que ya estaban diferenciadas en una clase celular maduraron considerablemente más que las que no. Del grupo que sí llegó a madurar se pudo observar un reacomodamiento de sus fibras para mejorar las propiedades mecánicas del tejido [35]. En la **Figura 1.13** se puede observar en la primera fila de imágenes el experimento realizado y en la segunda las fibras direccionadas a la izquierda y la presencia de fibroblastos¹⁷ a la derecha.

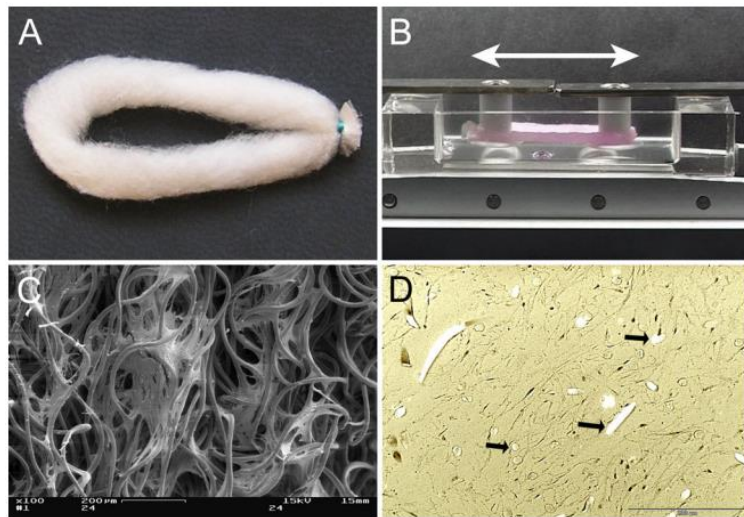


Figura 1.13 Fotografías del anillo de biomaterial utilizado, ácido poliláctico.

Fuente: Kreja, L; Liedert, A & Schelenker, H. Effects of mechanical strain on human mesenchymal stem cells and ligament fibroblasts in a textured poly(L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering [35].

En otro estudio, se aplicó la tensión uniaxial con quince pacientes distintos y con un protocolo de estimulación variando tanto la frecuencia de estímulo como la cantidad de ciclos. En este se encontró el número óptimo de ciclos para cada frecuencia establecida. Por otro lado, si se compara con la investigación realizada en Suiza, se puede observar que en ambas la variación de resultados entre donantes es considerable [36].

¹⁷ Los fibroblastos son un tipo de células del tejido conectivo que sintetizan fibras y mantiene la matriz extracelular del tejido [62].

1.4.1.3 Perfusión

La perfusión se utiliza para simular el esfuerzo cortante que se produce en la superficie de los tejidos. Existen dos formas en las que se genera este esfuerzo. La primera se puede observar mayormente en las vías sanguíneas, pero también se encuentra en lugares por donde fluye aire (como la tráquea o pulmones) o donde fluyen líquidos (el uréter¹⁸ o vejiga). La segunda se encuentra cuando dos sólidos se rozan, esto ocurre en zonas como la piel, el área interna del estómago o hasta de los intestinos.

Se ha realizado un estudio en el que se ejerce perfusión sola, compresión sola y la combinación de ambos, en un biomaterial embebido por células madre de tejido óseo [37]. En la **Figura 1.14** se puede observar el elemento a estudio en la primera fila y en la segunda, sus micrografías, luego de 4 y 24 horas respectivamente. En la izquierda se pueden ver las células al poco tiempo de adherirse al biomaterial y con una flecha las microporosidades del material; mientras que, a la derecha, se puede observar un macroporo en donde se depositará el tejido una vez que empiece a crecer.

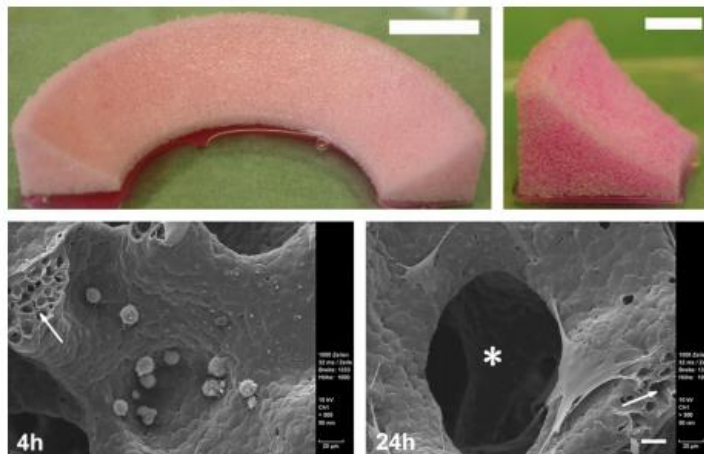


Figura 1.14 Vista transversal y frontal de biomaterial utilizado y micrografías de este.

Fuente: Liu, C; Abedian, R & Meister, R. Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds [37].

¹⁸ Son túbulos del sistema urinario humano que conectan los riñones con la vejiga.

Los resultados de la investigación indicaron que la perfusión sola resulta ser significativamente mejor que la compresión sola para la expresión de proteínas y, por ende, el incremento de sus propiedades mecánicas. Cuando se combinaron ambos estímulos, el resultado se acrecentó.

Esto se puede observar en la **Figura 1.15**. Las primeras dos columnas muestran micrografías del biomaterial luego de una semana y las segundas dos luego de dos semanas. También se ve cómo la muestra estimulada por perfusión con compresión(d) y por perfusión sola(b) tienen fibras más ordenadas que las de compresión(c) y sin realizar ningún estímulo(a).

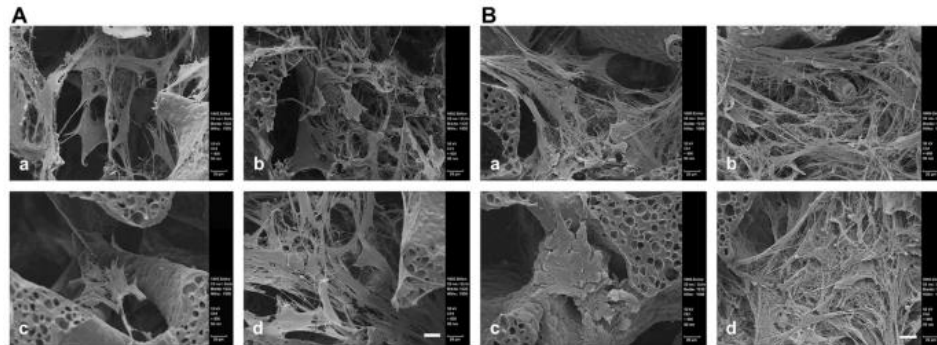


Figura 1.15 Micrografías del biomaterial luego de diferentes estímulos.

Fuente: Liu, C; Abedian, R & Meister, R. Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. [37].

1.4.2 Estímulos eléctricos

Los estímulos eléctricos que se observan de una forma macroscópica están en el sistema nervioso. Este está compuesto de señalización celular externa a una rápida velocidad para obtener las reacciones necesarias a lo largo de todo el cuerpo si es que este detecta peligro externo (una superficie caliente o puntiaguda), o interno (una sustancia tóxica ingerida).

Pero los estímulos eléctricos también se encuentran de una forma microscópica, al interior de cada célula. Como se explicó anteriormente, existen rutas de señalización intercelular que permiten la expresión o la supresión de distintos genes y estas son las que son simuladas al aplicar los estímulos al biomaterial analizado.

Las investigaciones actuales en este rubro son del tipo microscópica en su mayoría. Para poder efectuar el estímulo, actualmente se aplica un campo eléctrico de forma cíclica para poder variar concentración de iones dentro y fuera de la célula y así, su comportamiento. Dentro de la última década, se ha venido utilizando este método para poder curar fracturas de huesos en pacientes de una forma más acelerada [38], [39].

Esto se da porque al aplicar un estímulo eléctrico, se genera una fluctuación del catión del calcio [Ca^{2+}] dentro de las células, desencadenando una vía de señalización que se puede observar en la **Figura 1.16**. El estímulo inicial es percibido por distintas formas de recepción que permiten el ingreso del calcio a la célula y cuando el núcleo a su vez nota esto, envía un indicador para producir sea una proteínas o más células [40].

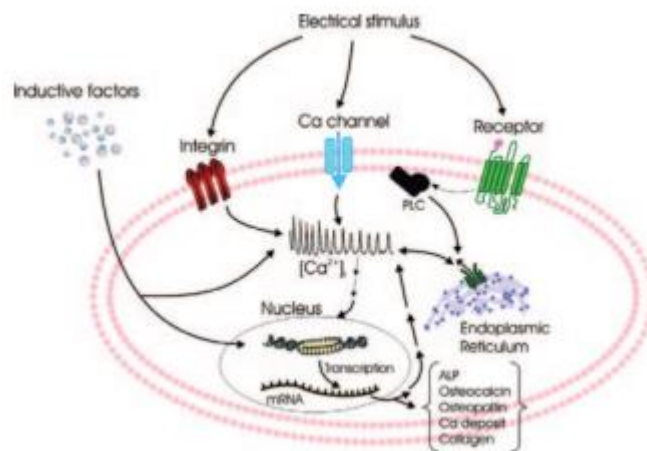


Figura 1.16 Representación esquemática de los mecanismos de señalización por campo eléctrico.
Fuente: Sun, S; Liu, Y & Lipsky, S. Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells [41].

Esto se aplicó a la ingeniería de tejidos en una investigación llamada “*Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells*”, realizada en Estados Unidos. Comparando una muestra control con una muestra a la que se le aplicó un campo eléctrico, se pudo demostrar que la expresión de tres proteínas encontradas en tejido óseo incrementó significativamente [41]. También se pudo determinar un aumento en la proliferación celular como se puede observar en la **Figura 1.17**. Al comparar la imagen de la izquierda (tejido control) con la de la derecha (tejido estimulado),

se puede ver una diferencia en concentración de zonas oscuras, que son los depósitos de calcio.

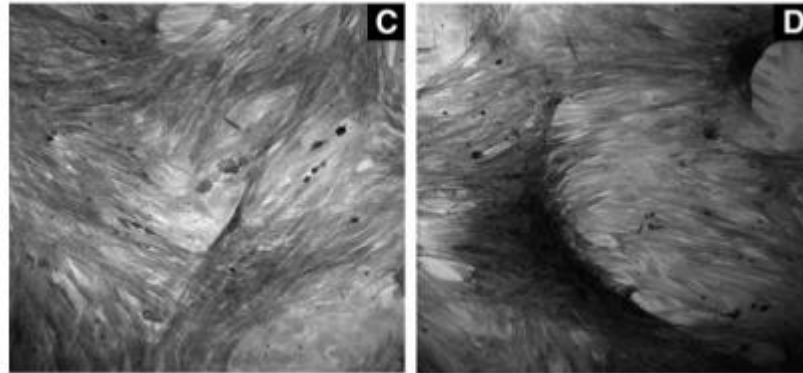


Figura 1.17 Efectos de la estimulación eléctrica sobre la diferenciación de células madre de tejido óseo.
Fuente: Sun, S; Liu, Y & Lipsky, S. Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells [41].

1.5 Simulación tisular

Para poder diseñar un biomaterial con las características que se desean, es necesario poder observar su comportamiento como respuesta al estímulo aplicado. Es por esto que se desea simular este tejido con las condiciones requeridas—tanto mecánicas como eléctricas—para poder validarlo. Este procedimiento será realizado mediante el método de elementos finitos (FEM) aplicado al análisis de mecánica sólida, de fluidos y estimulación eléctrica de tejidos.

1.5.1 Elementos finitos

El método de elementos finitos consiste en descomponer un problema complejo y extenso en una cantidad finita de elementos más simples y resolverlos por separado, para luego recopilar las soluciones que dan respuesta a la problemática inicial. Esta teoría es aplicada para poder discretizar y resolver numéricamente las ecuaciones diferenciales que rigen el comportamiento del tejido al aplicar las excitaciones utilizadas. Se procede a realizar esta metodología debido a que la geometría y propiedades del material a utilizar son de carácter continuo, por lo que se dificulta su resolución matemática.

El procedimiento para realizar este análisis comienza con el diseño de la geometría—esta es el elemento u objeto—y su discretización al dividirla en un número finito de elementos más pequeños. Luego, se debe definir el modelo físico-matemático con el que se analizará el comportamiento. En la presente investigación se utilizarán modelos para la tensión, compresión, perfusión y campo eléctrico. Es importante mencionar que, tanto la geometría como el ambiente al que se expone, poseen propiedades físicas, las cuales serán adicionadas al modelo para obtener su resultado. Por último, también se requerirán las condiciones iniciales y de frontera para poder empezar a estudiar a la geometría.

Se empezará resolviendo el modelo matemático con las condiciones iniciales, analizando los valores en la frontera. Los valores obtenidos en los nodos de la frontera se utilizarán para determinar el comportamiento del elemento del cual el nodo forma parte. Luego de solucionar el modelo para este componente, se utilizarán sus nodos que son contiguos a los elementos vecinos. De esta forma, cada pequeña parte de la geometría inicial será resuelta para cada física requerida y para cada instante de tiempo, si es que este fuese necesario.

1.5.2 Mecánica sólida

En la presente investigación solo se utilizarán cargas axiales (compresión y tensión) para estimular al biomaterial. A continuación, se explicarán los modelos físico-matemáticos que rigen el comportamiento mecánico de los sólidos a estudiar.

Para poder simular las deformaciones de los sólidos bajo las cargas aplicadas se utilizará el concepto de esfuerzo. La **Ecuación 1.1** muestra la fórmula para obtener el valor del esfuerzo $\sigma[Pa]$ mediante una carga $F[N]$ aplicada a un área de análisis $A[m^2]$. Al estar trabajando con cargas axiales, el esfuerzo resultante será de carácter normal, colocándose un signo positivo cuando se trate de una tensión y negativo para una compresión.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (1.1)$$

Otro concepto importante a utilizar es el de la deformación. Usualmente se utiliza el concepto de deformación unitaria ϵ , la cual hace referencia a la proporción entre la deformación real $\delta[m]$ con respecto al tamaño total $L[m]$ del elemento a estudiar. Esta se puede observar a continuación.

$$\epsilon = \frac{\delta}{L} \quad (1.2)$$

Como se va a trabajar en el límite elástico del material, cabe recalcar que existe una proporcionalidad entre la deformación unitaria y el esfuerzo normal de un material. Esta está dada por el módulo de elasticidad o módulo de Young $E[Pa]$.

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad (1.3)$$

Estas ecuaciones serán utilizadas más adelante cuando se observe que se requiere una deformación uniaxial para estimular el scaffold diseñado. Esto hace referencia a una tensión en una sola dirección aplicada al biomaterial.

1.5.3 Mecánica de fluidos

En el área de mecánica de fluidos, el modelo que es de interés es el del esfuerzo generado en un área contigua a un flujo de cierto fluido. Es importante mencionar que el tipo de esfuerzo no va a ser de carácter normal, si no cortante. El esfuerzo cortante $\tau[Pa]$ se presenta cuando existe un flujo que transita de forma paralela al área de estudio. Este flujo va a generar una fuerza de reacción en la superficie, la cual se traducirá en un esfuerzo cortante.

Este comportamiento se puede representar mediante la **Ecuación 1.4**, en donde $\mu[Pa \cdot s]$ es la viscosidad dinámica del fluido y $\frac{\partial u}{\partial y}[s^{-1}]$ es la variación del perfil transversal de velocidades en un punto de la superficie. Este perfil puede ser observado en la **Figura 1.18**.

$$\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y} \quad (1.4)$$

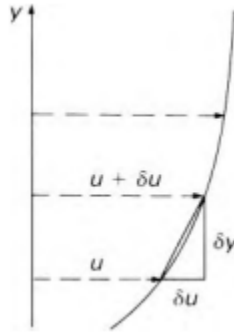


Figura 1.18 Perfil transversal de velocidades en un fluido.
Fuente: Massey, B. Mechanics of Fluids [42].

Otro concepto que describe el comportamiento de un fluido es el Número de Reynolds. Este indica la relación entre diferentes parámetros tanto la densidad $[\rho]$, viscosidad $[\mu]$ y velocidad del fluido $[v_s]$, así como la geometría $[D_H]$ por donde este circula. La **Ecuación 1.5** es la que indica el Número de Reynolds $[Re]$.

$$Re = \frac{\rho \cdot v_s \cdot D_H}{\mu} \quad (1.5)$$

Se dice que el comportamiento del fluido es laminar si es que el valor de $Re < 2100$, es transitorio si es que $2100 > Re > 2900$ y, por último, este si es $Re > 2900$ se denomina turbulento. Cabe recalcar, que para casos en los que este número es menor a 1, se le llama flujo de Stokes o flujo progresivo. Este último caso se da cuando las fuerzas inerciales del fluido son menores a las fuerzas viscosas, lo que significa que la masa es prácticamente despreciable.

1.5.4 Campo eléctrico

Los modelos matemáticos que rigen a la física detrás de la estimulación eléctrica son las ecuaciones de Maxwell. Estas son utilizadas para estudiar el comportamiento de los campos electromagnéticos. En la presente investigación se utilizará la regulación del campo eléctrico, pero este a su vez, viene ligado del campo magnético, por lo que poseen características similares.

$$\nabla \times E = -\frac{\partial B}{\partial t} \quad (1.5)$$

$$\nabla \times H = -J + \frac{\partial D}{\partial t} \quad (1.6)$$

$$\nabla \cdot D = \rho_v \quad (1.7)$$

$$\nabla \cdot B = 0 \quad (1.8)$$

En donde $E[\frac{N}{C}]$ es el campo eléctrico, $B[T]$ es el campo magnético, $D[C \cdot m^{-2}]$ es el desplazamiento eléctrico, $H[\frac{A}{m}]$ es la magnetización, $J[A \cdot m^{-2}]$ es la densidad de corriente y $\rho_v[C \cdot m^{-3}]$ es la densidad del volumen de carga.

Luego de tomar ciertas consideraciones y arreglos matemáticos se obtiene la **Ecuación 1.9**, que será la base para nuestro análisis en tejidos. En esta se ve que la gradiente del voltaje por la inversa de la densidad de carga será la corriente $i_s[A]$ que pasa por el material a analizar.

$$\nabla \cdot (-\sigma \nabla V) = i_s \quad (1.9)$$

De la **Ecuación 1.9** se puede generalizar el valor de la corriente dependiendo del tejido a analizar y tomando en consideración las fuentes del cambio de corriente. Esto se puede apreciar en la **Ecuación 1.10**, en donde $i_m[A]$ es la corriente total en la membrana celular y $C_m[F]$, $i_{Na}[A]$, $i_K[A]$ y $i_L[A]$ son la capacitancia de la membrana y corriente del sodio, potasio y de fuga respectivamente. Por último, $V_m[V]$ es el voltaje transmembrana resultante de la diferencia entre el voltaje extracelular $V_e[V]$ e intracelular $V_i[V]$. Esta ecuación se reducirá a la **Ecuación 1.11**.

$$i_m = C_m \frac{dV_m}{dt} + i_{Na} + i_K + i_L \quad (1.10)$$

$$i_m = C_m \frac{dV_m}{dt} + i_{ion} \quad (1.11)$$

$$V_m = V_i - V_e \quad (1.12)$$

Ahora, se toma en consideración que no se podrá realizar el análisis en cada célula por lo que este se dividirá en la parte intracelular como en la parte extracelular. Esta consideración junto con el remplazo de $i_s[A]$ en la **Ecuación 1.9** por βi_m , nos dará la **Ecuación 1.13** (parte extracelular) y la **Ecuación 1.14** (parte intracelular), donde β es el parámetro del tejido que representa el total de área de membrana celular por unidad de volumen.

$$\nabla \cdot (-\sigma_e \nabla V_e) = \beta i_m \quad (1.13)$$

$$\nabla \cdot (-\sigma_i \nabla V_i) = \beta i_m \quad (1.14)$$

Luego se va a reemplaza la **Ecuación 1.11** y la **Ecuación 1.12** en la **Ecuación 1.13** y se obtienen los estímulos de corriente $i_{se}[A]$ aplicados a la región extracelular para obtener la **Ecuación 1.15**. Esta rige el comportamiento eléctrico en la parte extracelular. Este procedimiento de remplazo se hace de igual manera para la corriente en la región intracelular $i_{si}[A]$ y se obtiene la **Ecuación 1.16**.

$$\nabla \cdot (-\sigma_e \nabla V_e) = \beta \left(C_m \frac{dV_i}{dt} - C_m \frac{dV_e}{dt} + i_{ion} \right) + i_{se} \quad (1.15)$$

$$\nabla \cdot (-\sigma_i \nabla V_i) = \beta \left(C_m \frac{dV_e}{dt} - C_m \frac{dV_i}{dt} + i_{ion} \right) + i_{si} \quad (1.16)$$

CONCLUSIONES

Se puede concluir que el presente trabajo de investigación posee relevancia científica en el ámbito del desarrollo de scaffolds para equipos de investigación en el campo de la ingeniería de tejidos. Esto se determinó al haber podido realizar los objetivos propuestos al inicio de la investigación. Se consiguió analizar los parámetros de estimulación, así como los requerimientos del diseño. Este fue un paso sumamente importante para el poder investigar sobre el desarrollo de los estudios computacionales, ya que no se encontraba un estudio de este tipo en la literatura. Luego, se pudo estudiar sobre los distintos tipos de diseños de scaffolds para el tejido músculo esquelético, así como aprender de biomateriales apropiados para las condiciones de la investigación.

Este estudio ha sido capaz de recopilar y analizar ciertas ramas tangentes y también de la ingeniería—biología, maquinaria, estímulos físicos y métodos de modelamiento y simulación—para poder brindar un marco conceptual en el que estos conceptos y estudios se relacionan. Esta compilación de teoría será de apoyo para poder resumir y dar un primer contacto con el área de estimulación física y simulación de tejidos biológicos a futuros científicos interesados en desarrollar esta rama de la ingeniería. Esta investigación es un pequeño paso para poder solucionar eventualmente la problemática en temas como los trasplantes de órganos y la disponibilidad de estos al probar fármacos y tratamientos médicos.

Se planea más adelante el desarrollo del diseño mismo así como de un protocolo de estimulación en el cual se utilicen la mayor cantidad de estímulos físicos posibles—como es de encontrarse en un entorno biológico real. Junto a este proceso, se presentará una serie de simulaciones para respaldar el diseño brindado; esto ayudará a ver cómo se comporta el tejido con el protocolo utilizado. Por último, se iterará en este planteamiento para poder realizar mejoras y proponer trabajos futuros en los que la presente investigación pueda utilizarse de complemento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] V. Duro-garcía *et al.*, “Worldwide distribution of solid organ transplantation and access of populatin to those practices,” pp. 71–72, 2018.
- [2] R. Langer, J. P. Vacanti, N. Series, and N. May, “Tissue Engineering,” vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 2008.
- [3] S. Levenberg *et al.*, “Engineering vascularized skeletal muscle tissue,” vol. 23, no. 7, pp. 879–884, 2005.
- [4] H. Naito *et al.*, “Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts,” vol. 12, no. 4, pp. 452–458, 2006.
- [5] G. H. Altman *et al.*, “Advanced Bioreactor with Controlled Application of Multi-Dimensional Strain For,” vol. 124, no. December 2002, 2016.
- [6] G. N. Bancroft, V. I. Sikavitsas, and A. G. Mikos, “Design of a Flow Perfusion Bioreactor System for Bone Tissue-Engineering Applications,” vol. 9, no. 3, 2003.
- [7] T. Kasuga, Y. Ota, M. Nogami, and Y. Abe, “Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 1, pp. 19–23, 2001.
- [8] S. Lv, D. M. Dudek, Y. Cao, M. M. Balamurali, J. Gosline, and H. Li, “Designed biomaterials to mimic the mechanical properties of muscles,” *Nature*, vol. 465, no. 7294, pp. 69–73, 2010.
- [9] C. Meinert, K. Schrobback, D. W. Hutmacher, and T. J. Klein, “A novel bioreactor system for biaxial mechanical loading enhances the properties of tissue-engineered human cartilage,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [10] B. Y. Z. Feng, T. Matsumoto, Y. Nomura, and T. Nakamura, “An Electro-Tensile Bioreactor for 3-D Culturing of Cardiomyocytes,” *Technol. Dev. Japan*, no. August, pp. 73–79, 2005.

- [11] N. Sawaguchi *et al.*, “Effect of cyclic three-dimensional strain on cell proliferation and collagen synthesis of fibroblast-seeded chitosan-hyaluronan hybrid polymer fiber,” *J. Orthop. Sci.*, pp. 569–577, 2010.
- [12] H. R. and S. Administration, “Organ Procurement & Transplantation Network Data,” vol. 2484, no. November 12, 2015, pp. 1–2, 2015.
- [13] K. Fernandez, “Fewer Liver Transplant Candidates Will Die on the Wait List,” California, 2015.
- [14] “IRODaT - International Registry on Organ Donation and Transplantation.” .
- [15] U. O. P. and T. N. (OPTN) and S. R. of T. R. (SRTR), “OPTN / SRTR 2017 Annual Data Report,” *Sci. Regist. Transpl. Recip.*, pp. 1–10, 2017.
- [16] R. Birla, *Introduction to Tissue Engineering: Applications and Challenges*, vol. 9781118628. 2014.
- [17] I. Polejaeva and S. Mitalipov, “Stem cell potency and the ability to contribute to chimeric organisms,” *Reprod. Adv. Publ.*, no. December, pp. 1–20, 2012.
- [18] M. Amit and J. Itskovitz-Eldor, “Sources, derivation, and culture of human embryonic stem cells,” *Semin. Reprod. Med.*, vol. 24, no. 5, pp. 298–303, 2006.
- [19] C. W. Scott, M. F. Peters, and Y. P. Dragan, “Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing,” *Toxicol. Lett.*, vol. 219, no. 1, pp. 49–58, 2013.
- [20] K. Takahashi and S. Yamanaka, “Supplemental Data Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 126, no. 1489, pp. 663–676, 2008.
- [21] K. C. Clause and T. H. Barker, “Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 830–833, 2013.
- [22] F. Zomer, T. Führmann, C. Migliaresi, D. W. Hutmacher, and P. D. Dalton, “Using extracellular matrix for regenerative medicine in the spinal cord,” *Biomaterials*, 2013.

- [23] B. Alberts *et al.*, *Essential Cell Biology*. 2013.
- [24] M. Arora, “Cell Culture Media: A Review,” *Mater. Methods*, vol. 3, pp. 1–29, 2013.
- [25] G. Jin, G. H. Yang, and G. Kim, “Tissue engineering bioreactor systems for applying physical and electrical stimulations to cells,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 103, no. 4, pp. 935–948, 2015.
- [26] K. S. Saladin, C. A. Gan, and H. N. Cushman, *Anatomy & Physiology: The unity of form and function*, 8th ed. .
- [27] Raul654, “Muscle contraction notes,” *Wikipedia*, 2005. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Muscle_contraction. [Accessed: 14-Sep-2019].
- [28] A. F. Huxley and R. Niedergerke, “Structural changes in muscle during contraction: Interference microscopy of living muscle fibres,” *Nature*, vol. 173, no. 4412, pp. 971–973, 1954.
- [29] D. Richfield, “Medical gallery of David Richfield.” WikiJournal of Medicine, 2014.
- [30] E. J. Barrett and S. Rattigan, “Muscle perfusion: Its measurement and role in metabolic regulation,” *Diabetes*, vol. 61, no. 11, pp. 2661–2668, 2012.
- [31] P. D. Soden and I. Kershaw, “Tensile testing of connective tissues,” *Med. Biol. Eng.*, vol. 12, no. 4, pp. 510–518, 1974.
- [32] K. Shahin and P. M. Doran, “Tissue Engineering of Cartilage Using a Mechanobioreactor Exerting Simultaneous Mechanical Shear and Compression to Simulate the Rolling Action of Articular Joints,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 4, pp. 1060–1073, 2012.
- [33] M. Heberer and I. Martin, “Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes,” vol. 310, pp. 580–588, 2003.
- [34] M. Shachar, N. Benishti, and S. Cohen, “Effects of Mechanical Stimulation Induced by Compression and Medium Perfusion on Cardiac Tissue Engineering,” pp. 1551–1559, 2012.

- [35] L. Kreja, A. Liedert, H. Schlenker, R. E. B. Jo, and A. Ignatius, “Effects of mechanical strain on human mesenchymal stem cells and ligament fibroblasts in a textured poly (L -lactide) scaffold for ligament tissue engineering,” pp. 2575–2582, 2012.
- [36] D. Kaspar, W. Seidl, C. Neidlinger-wilke, A. Beck, L. Claes, and A. Ignatius, “Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain,” vol. 35, pp. 873–880, 2002.
- [37] C. Liu *et al.*, “Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 4, pp. 1052–1064, 2012.
- [38] B. Ercan and T. J. Webster, “The effect of biphasic electrical stimulation on osteoblast function at anodized nanotubular titanium surfaces,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3684–3693, 2010.
- [39] M. Tsai, W. Li, R. S. Tuan, and W. H. Chang, “Modulation of Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells by Specific Pulsed Electromagnetic Field Stimulation,” no. September, pp. 1169–1174, 2009.
- [40] L. Khatib, D. E. Golan, and M. Cho, “Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts,” vol. 16, no. 7, pp. 1–16, 2004.
- [41] S. Sun, Y. Liu, S. Lipsky, and M. Cho, “Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells,” *FASEB J.*, 2007.
- [42] E. Tonti, “Mechanics of fluids,” in *Modeling and Simulation in Science, Engineering and Technology*, vol. 59, 2013, pp. 355–383.