



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA

SIMULACIÓN DE INTERACCIÓN FLUIDO-ESTRUCTURA Y MECANOREGULACIÓN EN ING. DE TEJIDOS ÓSEOS

Tesis presentada a la Facultad de Ingeniería Mecánica para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Mecánica

Presenta:

Omar Marín Espinosa

Asesor y Coasesora de tesis:

M.C. Miguel Villagómez Galindo

Dra. Georgina Carbajal de la Torre

Morelia, Mich., Junio del 2012



A la memoria del Sr. Antonio Marín Hernández.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es dedicado y agradecido a las siguientes instituciones, familiares y amigos que colaboraron para que pudiera ser realizada esta tesis:

- Al CONACYT mi más grande agradecimiento por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

- A la Facultad de Ingeniería Mecánica y a los profesores que imparten en la institución mi más grande agradecimiento, por enseñarme a ver lo maravilloso que es nuestra ciencia.

- A mi asesor y coasesora mi más grande agradecimiento, por su guía, ayuda y colaboración importante en la elaboración del presente trabajo.

- A mi familia mi más grande agradecimiento por apoyarme todos estos años.

- A mis amigos de generación mi más grande agradecimiento por su ayuda y amistad todo este tiempo.

ABSTRACT

Bone diseases are among the most important causes of mortality, eg. cancerous bone resection leaving gaps to be filled by tissue grafts or implants. To solve this problem, it seemed to tissue engineering. In this thesis, simulations for the formation of bone in a perfusion bioreactor were performed, taking into account the mechanoregulation model of Hanna Isaksson, to elucidate the parameters for future construction of a bioreactor with application to bone formation. The results indicate that for values of fluid velocity from 1 mm/s to 15 mm/s, the maximum pressure is from 0.2669 Pa, value too below the 0.15 MPa for bone tissue formation on the surface of bone regeneration, proposed by Claes and Heigelela, and thus could be formed bone. We obtained a model that allows to get the distribution of deviatoric deformation on scaffolds, and the type of neotissue formed. With this technique, we obtain an algorithm which can help to design the scaffolding structure according to the desired tissue type.

Keywords: Bioreactor, Tissue Engineering, Fluid-structure Interaction, Mechanoregulation, Scaffolds.

RESUMEN

Las enfermedades óseas son una de las causas más relevantes de mortalidad, por ejemplo la resección de hueso canceroso deja vacíos que deben ser llenados por injertos de tejido o implantes. Para la solución de este problema, se ha considerado a la Ingeniería de Tejidos. En el presente trabajo, se simuló la formación de hueso en un bioreactor de perfusión, tomando en cuenta el modelo de mecanoregulación de Hanna Isaksson, para poder dilucidar los parámetros para la construcción futura de un bioreactor con aplicación a la formación de hueso. Los resultados indican que para valores de velocidad de fluido de 1 mm/s a 15 mm/s, la presión máxima es de 0.2669 Pa, muy por debajo al valor 0.15 MPa para la formación de tejido óseo en la superficie de regeneración ósea, propuesto por Claes y Heigelela, y por tanto se formaría hueso. Se obtuvo un modelo que permite obtener la distribución de la deformación deviatorica en los andamios y el tipo de tejido neoformado. Obteniéndose con esta nueva técnica, un algoritmo, que puede ayudar a diseñar la estructura de los andamios acorde al tipo de tejido deseado.

Palabras claves: Bioreactor, Ingeniería de Tejidos, Interacción fluido-estructura, Mecanoregulación, Andamios.

ÍNDICE

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	iii
ABSTRACT	iv
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	9
NOMENCLATURA	10
ABREVIATURAS	11
GLOSARIO	12
Capítulo 1 Introducción	14
1.1. Justificación	15
1.2. Hipótesis	17
1.3. Objetivos y aportaciones esperadas	17
1.3.1. Objetivo general	17
1.3.2. Objetivos específicos	17
1.3.3. Aportaciones esperadas	17
1.4. Metodología	18
1.5. Trabajos relacionados con la presente tesis.	19
Capítulo 2 Antecedentes	20
2.1. Introducción	20
2.2. Antecedentes	21
2.3. Células madre	22
2.4. Factores de crecimiento	25
Capítulo 3 Simulación de flujo en un bioreactor para Ingeniería de Tejidos.	27
3.1. Introducción	27
3.2. Diseño fisiológico para bioreactores de perfusión.	28
3.3. Bioreactor de perfusión diseñado por Michael J. y colaboradores.	29
3.4. Metodología	30
3.5. Definición de la geometría	31
3.5.1. Definición de los modelos a analizar en base a sus parámetros geométricos.	32
3.5.2. Análisis de sensibilidad de la malla del bioreactor de perfusión.	33
3.6. Resultados	35
Capítulo 4 Modelado de andamios para Ingeniería de Tejidos.	38

4.1. Introducción	38
4.1.1. Andamio para el tejido óseo	39
4.1.2. Consideraciones del andamio para el tejido óseo	40
4.2. Diseño de andamios	40
4.3. Superficies nodales periódicas en el diseño de andamios	41
4.4. Modelado de andamios mediante superficies	42
<i>Capítulo 5 Interacción fluido-estructura en andamios para ingeniería de tejidos.</i>	47
5.1. Introducción	47
5.2. Metodología	48
5.3. Resultados	50
<i>Capítulo 6 Mecanoregulación en andamios para Ingeniería de Tejidos.</i>	53
6.1. Introducción	53
6.2. Mecanobiología	56
6.3. Modelos mecanobiológicos	56
6.4. Metodología	60
6.5. Resultados	61
<i>Capítulo 7 Conclusiones y recomendaciones</i>	64
7.1. Conclusiones	64
7.2. Recomendaciones y/o trabajos futuros	65
<i>Referencias</i>	66

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Trasplantes en EU y Cánada [2].</i>	16
<i>Figura 2. Proceso general en Ingeniería de Tejidos [13].</i>	20
<i>Figura 3. Diferentes fuentes de células madre [14].</i>	22
<i>Figura 4. Células Mesenquimales [12].</i>	24
<i>Figura 5. Flujo dinámico en el bioreactor de perfusión: (A) Sistema del bioreactor, (B) Sección del andamio y (C) Perfiles de flujo programados en una bomba de jeringa [43].</i>	30
<i>Figura 6. Arquitectura del bioreactor de perfusión considerando un área.</i>	31
<i>Figura 7. Arquitectura del bioreactor de perfusión considerando 3 cilindros y 2 conos.</i>	32
<i>Figura 8. Análisis de sensibilidad.</i>	33
<i>Figura 9. Mallado volumétrico para el bioreactor.</i>	34
<i>Figura 10. Condiciones de frontera en el bioreactor.</i>	34
<i>Figura 11. Perfil de velocidad en el bioreactor de perfusión.</i>	35
<i>Figura 12. Distribución del esfuerzo cortante en la geometría 1 para diversos valores de velocidad de entrada.</i>	37
<i>Figura 13. Velocidad de entrada respecto al esfuerzo cortante.</i>	37
<i>Figura 14. Representación de las superficies: A) Prisma, B) Diamante y C) Giroide [64].</i>	44
<i>Figura 15. Giroide con porosidad de 99% creado con el software 3DSurf.</i>	44
<i>Figura 16. Giroide 1 creado con el software 3DSurf.</i>	45
<i>Figura 17. Giroide analizado por Olivares [71], creado con el software 3DSurf.</i>	46
<i>Figura 18. Mallado tetraédrico del giroide 99.</i>	46
<i>Figura 19. Mallado volumétrico para la interacción fluido-estructura.</i>	49
<i>Figura 20. Condiciones de frontera: A) Empotramiento del giroide, B) entrada de fluido, C) salida del fluido, D) Paredes sin deslizamiento de fluido.</i>	50
<i>Figura 21. Análisis de interacción fluido-estructura.</i>	51
<i>Figura 22. Presión ejercida por el fluido.</i>	52
<i>Figura 23. Diferenciación de las células madre dependiendo de la magnitud de la velocidad del fluido y la deformación cortante octaédrica. [85].</i>	58
<i>Figura 24. Rango de valores propuestos por Hanna Isaksson para la deformación deviatorica[87].</i>	59
<i>Figura 25. Detalle de la malla volumétrica</i>	60
<i>Figura 26. Condiciones de frontera.</i>	61
<i>Figura 27. Mapa de colores de los estímulos de perfusión (0.1mm/s) en superficies de áreas: a) Gyroid_70, b) Hexag_70L, c) Hexag_70T, d) Gyroid_RG, e) Gyroid_LG. (Andy L. Olivares[20]).</i>	61
<i>Figura 28. Mapa de colores y distribución de tejidos para un giroide con 99% de porosidad y deformación 0.5%</i>	62

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Trabajos relacionados con simulación en bioreactores o andamios para Ingeniería de Tejidos.</i>	19
<i>Tabla 2. Factores de crecimiento usados en Ingeniería de Tejidos [14].</i>	26
<i>Tabla 3. Geometría considerando sus parámetros.</i>	32
<i>Tabla 4. Datos para el análisis de sensibilidad.</i>	33
<i>Tabla 5. Velocidad y esfuerzo cortante máximos en el bioreactor de perfusión.</i>	36
<i>Tabla 6. Resultados de la simulación de interacción fluido-estructura</i>	52

NOMENCLATURA

F	Fuerza total
f	Fuerza de reacción
dv	Factor de malla de los elementos de escala para el marco espacial
dV	Factor de malla de los elementos de escala para el marco del material
η	Viscosidad dinámica para el fluido
p	Presión
I	Matriz identidad
u	Campo de velocidad
n	Normal al exterior del límite
S	Tipo de tejido
γ	Deformación octaédrica
v	Velocidad del fluido
y_0	Deformación deviatorica
ε	Deformación principal en las direcciones 1(x), 2(y) y 3(z)

ABREVIATURAS

FDA	Food and Drug Administration
ALE	Lagrange-Euler
ES	Células embrionarias
ESCs	Células madre embrionarias
HSCs	Células madre Hematopoyéticas
MSCs	Células mesenquimales
ADN	Acido desoxirribonucleico
CAD	Diseño asistido por computadora
PLA	Acido polilactico
FSI	Interacción fluido-estructura

GLOSARIO

Andamio	Es una estructura hecha de un biomaterial, que permite dar soporte y sustituir la matriz extra celular de órganos o tejidos.
Angiogénesis	Desarrollo del sistema vascular.
Biocompatibilidad	Capacidad de un material para llevar a cabo sus prestaciones con una respuesta apropiada del huésped en una situación específica.
Biomaterial	Material del que se pretende que actúe interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o substituir algún tejido, órgano o función del organismo.
Células Madre	Son células que tienen la capacidad bajo determinados eventos de diferenciarse o transformarse en diversos tipos de células funcionales que requieren los tejidos.
Células Hematopoyéticas	Son células de formación o producción de sangre, especialmente de sus elementos celulares.
Células Mesenquimales	Son células de formación especializadas en originar determinados tipos celulares.
Cigoto	Célula resultante de la conjugación de dos gametos; óvulo fecundado.
Enfermedad congénita	Es aquella que se manifiesta desde el nacimiento, ya sea producida por un trastorno durante el desarrollo embrionario, durante el parto, o como consecuencia de un defecto hereditario.
Factores de Crecimiento	Son proteínas o polipéptidos con profunda influencia en la proliferación y crecimiento celular.
Interacción fluido Estructura	Es un método que relaciona la deformación del andamio respecto al fluido y viceversa.
Mecano Regulación	Es un método basado en diferentes tipos de estímulos para las células en fractura ósea.
Método ALE	Es un acoplamiento arbitrario langragiano-euleriano para resolver la interacción fluido-estructura por elemento finito.

Morfogénesis	Evolución o desarrollo de la forma y estudio de las leyes que lo rigen.
Órgano	Parte del cuerpo dotada de una o varias funciones.
Osteogénesis	Generación o desarrollo del tejido o sistema óseo.
Osteoporosis	Formación de espacios anormales en el hueso o rarefacción del mismo sin descalcificación, por la ampliación de sus conductos.
Tejido	Agrupación de células, fibras y productos celulares varios que forman un conjunto estructural.

Capítulo 1 Introducción

En la presente tesis se abordarán conceptos relacionados con la Ingeniería de Tejidos, rama de la ingeniería relativamente nueva, digamos de más o menos tres décadas, y que en términos generales utiliza los principios de la ingeniería para producir órganos o tejidos para sustitución de aquellos que se encuentran dañados, presentando una buena alternativa para el reemplazo de tejidos y órganos. Es de sumo interés estudiar lo relacionado con la osteogénesis, es decir la formación de huesos y la diferenciación de células precursoras de tejido óseo, dichas células se cree son sensibles al medio mecánico local, por lo tanto sus características y efectos específicos no están bien entendidas.

Para poder explicar la diferenciación de tejidos de las células precursoras durante la osteogénesis se han propuesto diversos algoritmos de mecanoregulación, cuyo estudio es motivo de esta tesis. Sin embargo, la corroboración de este algoritmo ha mostrado ser difícil, particularmente porque los resultados experimentales bajo condiciones mecánicas controladas son raramente disponibles [1].

El presente trabajo está estructurado en siete capítulos, los cuales se describen a continuación:

En el **capítulo 1**, se presenta la introducción al tema de tesis, así como su justificación, la descripción de la hipótesis, los objetivos, las aportaciones y los trabajos encontrados en el estado del arte relacionados con el presente trabajo.

El **capítulo 2**, proporciona los antecedentes para poder entender los términos y conceptos fundamentales para el buen desarrollo de la tesis.

En el **capítulo 3**, se presenta la simulación de flujo en un bioreactor hipotético de perfusión con aplicación en la Ingeniería de Tejidos.

Los principios para el modelado de andamios para ingeniería de tejidos se presentan en el **capítulo 4**.

El **capítulo 5**, muestra los efectos que tiene el flujo sobre la estructura del andamio y sus efectos en las células a cultivar para formar hueso, todo ello en base a la interacción del fluido sobre la estructura del andamio.

Los algoritmos de mecanoregulación, así como su concepto se estudian en el **capítulo 6**. En este capítulo también se desarrolla una metodología para simular la formación de diferentes tejidos en los andamios, de acuerdo a la deformación inducida en estos.

Para finalizar, en el **capítulo 7**, se presentan las conclusiones y las recomendaciones derivadas de esta tesis.

1.1. Justificación

Las lesiones, enfermedades y malformaciones congénitas han sido siempre parte de la experiencia humana.

Los trasplantes de órganos se incrementan a finales de 1980 en los Estados Unidos y Canadá. En la Figura 1, se muestran los acontecimientos de trasplante, por este motivo surge el interés de un nuevo desarrollo médico basado en equivalentes biológicos para reemplazar o reparar tejidos y órganos dañados [2].

En 1983, la FDA (Food and Drug Administration) aprueba el uso de la ciclosporina, un fármaco inmunosupresor que se utiliza para reducir el rechazo de órganos. Es posible trasplantar aproximadamente 25 diferentes órganos y tejidos, incluyendo hueso, cartílago, córnea, corazón, corazón-pulmón, riñón, hígado, pulmón y páncreas. Sin embargo debido a la oferta, técnicas y factores económicos, ha surgido el interés en universidades, industrias y clínicas, el desarrollo de nuevas terapias médicas basadas en equivalentes biológicos para reemplazar o reparar daños en los tejidos y órganos [2].

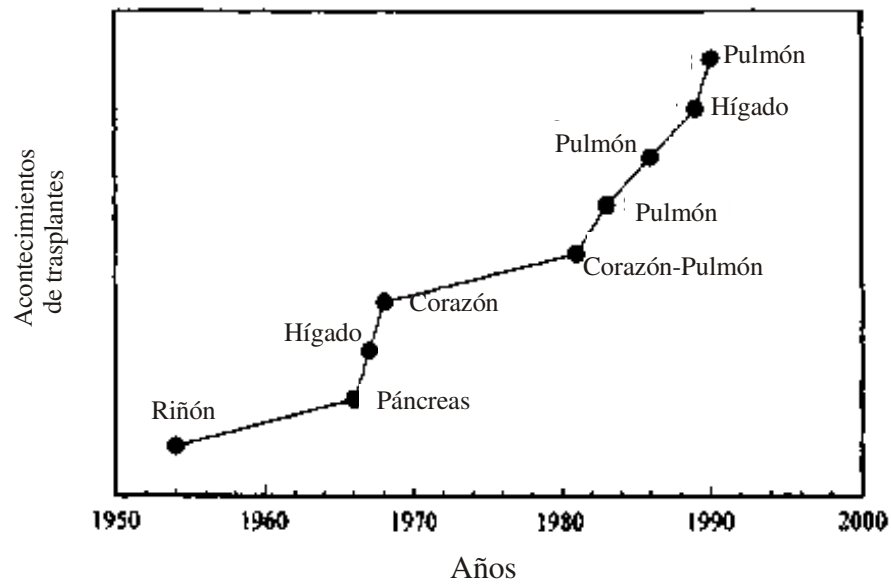


Figura 1. Trasplantes en EU y Canadá [2].

Para el 5 de Febrero de 1997 había 50,613 pacientes en los EE.UU que esperaban trasplantes de órgano. Se estima que cada 18 min un nombre es adicionado a la lista de espera de trasplante (UNOS: United Network for Organ Sharing) [2].

En la actualidad 92,587 personas están en listas de espera para trasplantes en los Estados Unidos y muchos se mueren esperando órganos disponibles.

Una posible solución al problema de la escasez de órganos es la aplicación de las técnicas que propone la Ingeniería de Tejidos. Es por ello que en el presente trabajo se pretende estudiar dichas técnicas, y sentar las bases para el modelado y diseño de bioreactores para la producción de hueso. Ha habido una multitud de proyectos de investigación llevados a cabo, cuya atención se centra en el desarrollo y comprensión de los mecanismos fundamentales de los tejidos y órganos en la Ingeniería de Tejidos. Además, hay varias compañías de biotecnología cuya actividad se centra en productos para la Ingeniería de Tejidos.

1.2. Hipótesis

La simulación de formación de hueso en un bioreactor de perfusión, tomando en cuenta el modelo de mecanoregulación de Hanna Isaksson, nos puede conducir a encontrar los parámetros de diseño de un bioreactor para obtener un tejido funcional.

1.3. Objetivos y aportaciones esperadas

1.3.1. Objetivo general

Formular modelos que consideren la interacción fluido estructura y mecanoregulación.

1.3.2. Objetivos específicos

- Analizar por elemento finito la interacción fluido-estructura del bioreactor.
- Implementar en COMSOL el modelo de Hanna Isaksson.
- Simular mediante el modelo de mecanoregulación de Hanna Isaksson la formación de hueso en el bioreactor.
- Encontrar los parámetros óptimos para el bioreactor.

1.3.3. Aportaciones esperadas

Dentro de las aportaciones que se pueden esperar del desarrollo de esta tesis están:

- El desarrollar una metodología para simular la interacción fluido-estructura en los bioreactores y andamios, ya que en la actualidad existen únicamente trabajos que tratan por separado la deformación de los andamios y el flujo de biofluidos;
- Otra aportación es la incorporación del modelo de mecanoregulación de Hanna Isaksson para simular la formación de hueso en función del diseño del bioreactor.

1.4. Metodología

Para la solución de los problemas de este trabajo se implementó un modelo para el cálculo de la interacción fluido-estructura, y un modelo para el cálculo de la mecanoregulación, para los cuales se requirió el uso del software multifísica COMSOL para realizar las simulaciones.

Materiales:

- Se requiere del software multifísica COMSOL, para realizar las simulaciones de: interacción fluido-estructura, el acoplamiento de la simulación de reacciones de difusión de nutrientes y factores de crecimiento, así como también para implementar el modelo de mecanoregulación.
- Para diseñar los componentes del bioreactor se utilizó el software de modelado multifísica COMSOL, y para diseñar los andamios del bioreactor para la diferenciación del tejido óseo se utilizó el software de modelado 3Dsurf.
- Se tomaron como propiedades del fluido las correspondientes al agua, en virtud de que las especies químicas disueltas en el medio de cultivo tienen una contribución despreciable al cambio de las propiedades físicas del agua, componente principal del medio de cultivo.

Técnicas:

- El método ALE (Lagrange-Euler) acoplamiento arbitrario langragiano-euleriano para resolver la Interacción fluido-estructura por elemento finito, está implementado en el software de modelado multifísica COMSOL, razón por la cual es adoptado en la presente tesis. Lo anterior es debido a que su modo de aplicación se realiza automáticamente en COMSOL.
- El método de mecanoregulación propuesto por Hanna Isaksson se resuelve por elemento finito, el cual requiere el uso del software multifísica COMSOL para realizar las simulaciones. Pero además, dadas las facilidades que presenta COMSOL para introducir ecuaciones, es posible implementar el criterio de deformación octaédrica sin necesidad de programar rutinas de usuario como en otros códigos comerciales de elementos finitos.

- El método de expresiones matemáticas para generar las estructuras de los andamios para el tejido óseo, requiere del uso del software 3Dsurf para definir las geometrías utilizadas en las simulaciones.

1.5. Trabajos relacionados con la presente tesis.

A la fecha en la revisión bibliográfica que se ha realizado concerniente a los bioreactores de perfusión, así como el estado del arte en cuanto a simulación de bioreactores, se encontró que existen pocos autores que tratan el tema de la simulación de bioreactores. Los cuales se enlistan a continuación en la tabla 1. Como podemos observar hasta el momento no existen trabajos que consideren la interacción fluido-estructura en sus simulaciones. Y todos simulan el andamio como un conjunto de celdas unitarias, ya que por el momento no es posible simular todo el andamio por limitaciones tecnológicas.

Tabla 1. Trabajos relacionados con simulación en bioreactores o andamios para Ingeniería de Tejidos.

Autor	Simulación de bioreactor	Simulación de andamios	Análisis de flujo	Análisis estructural	Interacción fluido-estructura
Porter [3]	*	*	*		
Lacroix [4,5]		*	*	*	
Villagómez[6]		*	*	*	
Sandino [7]		*	*	*	
Lawrence [8]	*		*		
Boscheti [9]		*	*	*	
Cioffi [10]		*	*	*	
Kelly [11]	*	*	*	*	

Lo anterior apunta a que el presentar un trabajo de interacción fluido-estructura representa un aporte para el estado del arte.

Capítulo 2 Antecedentes

2.1. Introducción

La Ingeniería de Tejidos es un nuevo desarrollo en Biomedicina, involucra una serie de estrategias, los elementos principales son los mecanismos basados biológicamente para reparar y curar un tejido dañado o afectado. Esencialmente, un nuevo tejido funcional vivo, es fabricado usando células vivas que normalmente son asociadas con una matriz o andamio que puede ser natural, sintético o compuesto. Las células pueden migrar hacia el implante después de la implantación o pueden ser asociadas a la matriz por medio de un cultivo celular antes de la implantación [12]. En la Figura 2 se representa el proceso general en Ingeniería de Tejidos, considerando los componentes principales para la obtención de un nuevo órgano.

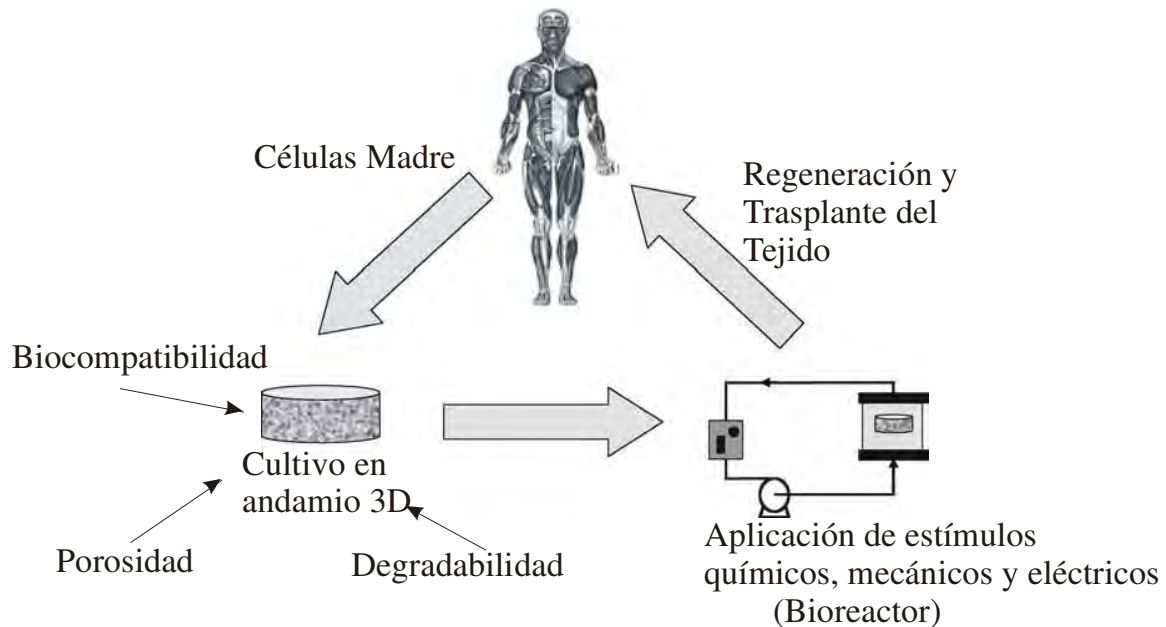


Figura 2. Proceso general en Ingeniería de Tejidos [13].

Por ejemplo si consideramos que un paciente con algún tipo de cáncer óseo necesita un trasplante o cubrir la cavidad dejada por la remoción del cáncer, sería necesario extraer células mesenquimales de la cresta iliaca (cadera), expandirlas en el laboratorio para posteriormente depositarlas en un andamio que les proporcionara a las células la estructura base para adherirse, proliferar, diferenciarse y formar un nuevo tejido óseo. Dicho andamio debe ser controlado en un sistema que le proporcione estímulos mecánicos y químicos, una temperatura adecuada y condiciones óptimas de distribución de nutrientes, para que las células puedan desarrollar el nuevo hueso. Una vez que tenemos el hueso neoformado se procede al trasplante en el paciente.

2.2. Antecedentes

En el siglo XVI Tagliacozzi de Bologna, Italia, reporta en su trabajo “Decusorum Chirurgia per Insitionem” una descripción de reemplazo de nariz que él reconstruyó de un colgajo de antebrazo [12].

En el siglo XIX con la comprensión de la teoría de enfermedad por gérmenes y la introducción de las técnicas de esterilización, surge la cirugía moderna [12].

A mediados del siglo XIX el desarrollo de la anestesia permitió la rápida evolución de varias técnicas quirúrgicas [12].

Con la obtención de nuevos órganos e introducción de nuevos métodos científicos se puede comprender el mundo natural. En esencia, un nuevo tejido funcional es fabricado usando células vivas, y son asociadas con una matriz o andamio para el desarrollo del tejido, creando nuevas posibilidades en numerosos ámbitos. Este método ha ganado interés en los últimos años, es la ingeniería con la biología, unida a los avances en el control celular y de la estructura, composición y función de los tejidos biológicos, están dando paso a nuevas ideas sobre los materiales del futuro, con características propias de tales tejidos, como la autoreparación o la adaptabilidad al entorno.

2.3. Células madre

Las células madre que sustituyen un tejido del cuerpo, pueden definirse como una pequeña sub-población de células proliferativas indiferenciadas que tienen la capacidad, bajo determinados eventos, de diferenciarse o transformarse en diversos tipos de células funcionales que requieren los tejidos. En la Figura 3 se representan las diferentes fuentes de células madre. De las cuales las más importantes son: las células embrionarias, las células fetales y las células de un huésped adulto [14].

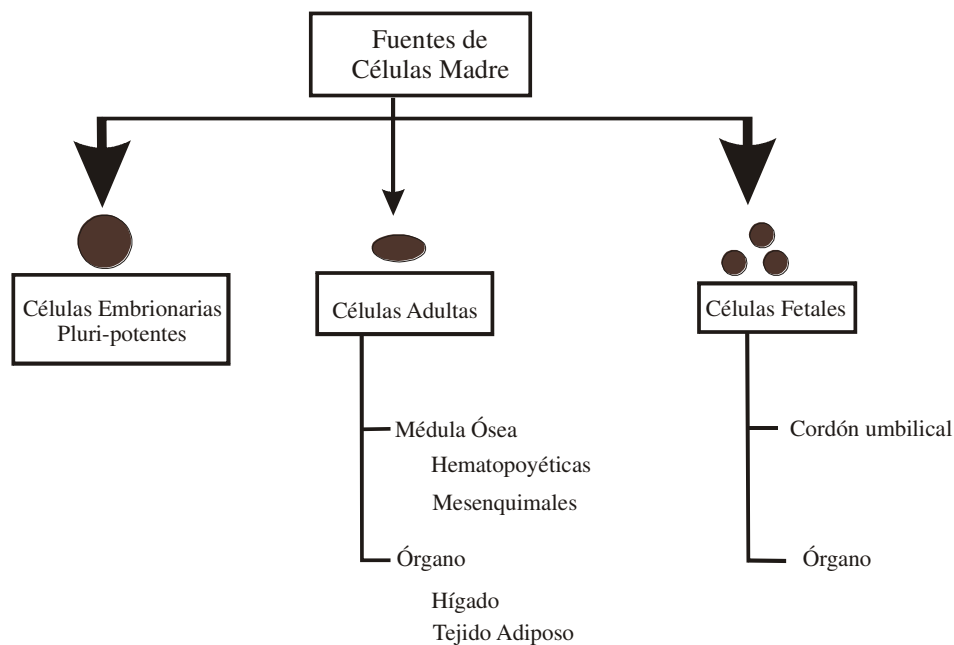


Figura 3. Diferentes fuentes de células madre [14].

Las células embrionarias pluri-potentes (ES) son aisladas de la masa celular interna de los blastocitos que son capaces de dar origen a células que se encuentran en las tres capas germinales del embrión [14].

Las células fetales son células pluri-potentes obtenidas de la sangre del cordón umbilical, placenta, líquido amniótico y órganos fetales [14].

Las células adultas contienen poblaciones de células madre multi-potentes, y tienen la capacidad de renovación después de un trauma, enfermedad, etc. Al estudiar este tipo de

células madre no se presenta controversia ética como en las células embrionarias o fetales [14].

Existen 4 tipos de células madre:

Células totipotenciales (Cigóticas)

- Capacidad ilimitada de crecimiento
- Puede desarrollar todos los tejidos y órganos post-embrionarias

Células pluri-potentes (ESCs, blastocito)

- Capacidad de originar variedades de tejidos

Células multi-potentes (HSCs, MSCs)

- Especializadas en originar determinados tipos celulares

Células unipotentes

- Son las que se obtienen de un órgano y siguen la misma línea

Las células más estudiadas en la actualidad son las células mesenquimales. En la Figura 4 se representan algunos ejemplos de las rutas que se desarrollan para obtener un determinado órgano.

Proceso Mesengénico

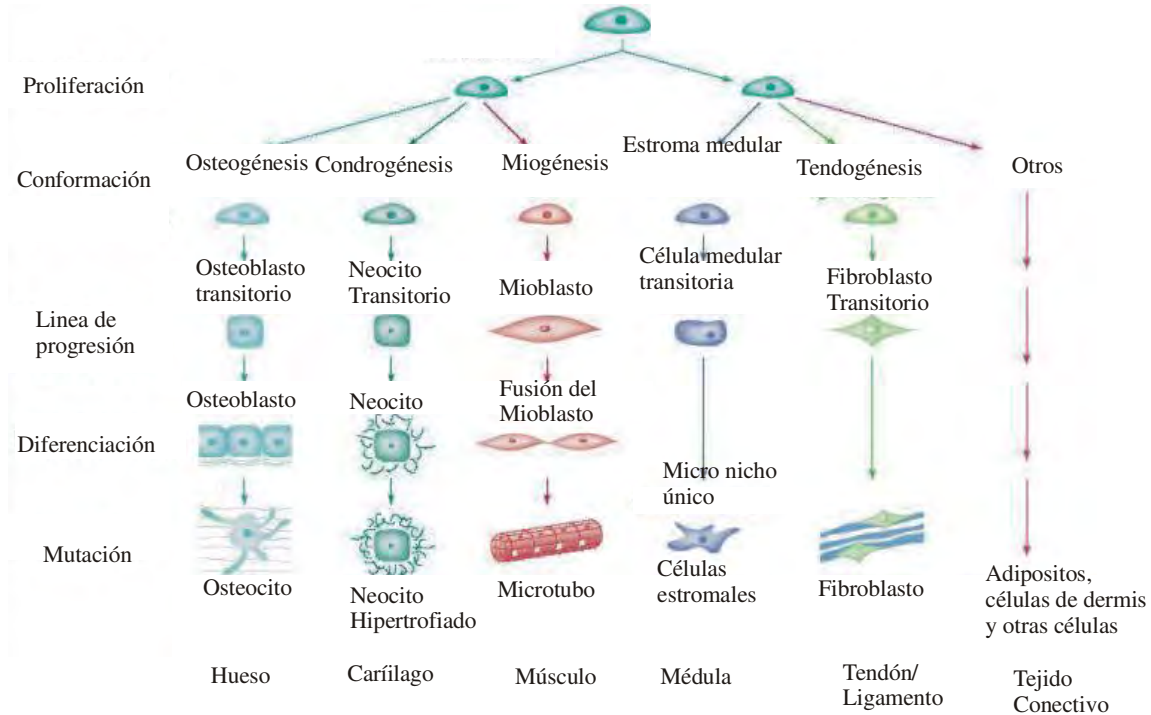


Figura 4. Células Mesenquimales [12].

En general, las células madre pueden ser caracterizadas como células que tienen la capacidad de autorrenovación prolongada, así como la capacidad de producir células diferenciadas, para mantener la estructura del tejido y renovar los tejidos después de un daño [15,16]. En los órganos adultos, se sabe que existen las células madre mesenquimales (MSC) en varios lugares, incluyendo la médula ósea, el periostio y en tejidos conectivos, es decir, en todos los que potencialmente son importantes en la curación de hueso [17-19].

Las células mesenquimales han sido hasta ahora difíciles de reconocer, y aún no hay marcadores para identificar exclusivamente las células madre mesenquimales. En un tejido sano hay poca actividad de las células madre con las células que descansan en un estado no proliferado y este estado se mantiene hasta que las células se requieren para regenerar o reparar un tejido [20]. Sin embargo, donde se requiere un tejido adicional, las células madre son capaces de reproducir células progenitoras del tejido, que después se diferencian.

Las células mesenquimales pueden diferenciarse en varios fenotipos de células altamente diferentes, por ejemplo, en fibroblastos, condrocitos u osteoblastos (Fig.4). Las células diferenciadas comienzan a sintetizar la matriz extracelular de los tejidos correspondientes. Varios factores influyen en la trayectoria de la célula y en la diferenciación de los tejidos. Estos factores incluyen señales bioquímicas y condiciones mecánicas [21,22]. Las células mesenquimales derivadas de la médula ósea tienen un papel importante como progenitoras de los componentes del tejido esquelético, en la morfogénesis del esqueleto y en la curación [20,23]. Por lo tanto, la comprensión de las células mesenquimales, la proliferación y diferenciación es de gran interés para la regeneración del tejido.

2.4. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas o polipéptidos con profunda influencia en la proliferación y crecimiento celular. Capaces de modular diversas actividades celulares como: la diferenciación, migración, adhesión y expresión génica [14]. En la Tabla 2 se listan algunos de los factores de crecimiento usados en Ingeniería de Tejidos.

La utilización de factores de crecimiento en los andamios sintéticos para hueso se establece por el hecho de que en la fisiología normal del hueso, la proliferación osteoprogenitora, la migración del tejido óseo, y la diferenciación en osteoblastos (osteoconducción) ocurre bajo la influencia de los factores de crecimiento. Por ejemplo, el osteoblasto secreta el factor de transcripción Cbfa-1/Runx-2 que juega un papel clave en la remodelación ósea y es requerido para la expresión de los genes específicos para osteoblastos y proteínas, tales como la osteocalcina. Ha habido una variedad de factores de crecimiento identificados *in vitro* e *in vivo* [2].

Tabla 2. Factores de crecimiento usados en Ingeniería de Tejidos [14].

Factores de crecimiento	Abreviación	Efectos
Factor de crecimiento Fibroblasto básico	bFGF, FGF-2	La angiogénesis; Fibroblastos y osteoblastos mitógeno
Proteínas Morfogénicas óseas	BMP-2, BMP-7	El crecimiento y el desarrollo de algunos tejidos; osteogénesis
Factor de crecimiento transformante	TGF- β 1	Proliferación y diferenciación de las células formadoras de hueso; la síntesis matriz de fibroblastos
Factor de crecimiento endotelial vascular	VEGF	Angiogénesis; Proliferación y migración de células endoteliales
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF	Proliferación de las células musculares lisas; mitógenos de fibroblastos y la matriz de síntesis
Factor de crecimiento del Hepatocito	HGF	Mitógeno hepatocito; motogen y facto anti-apoptóticos de las células; angiogénesis
Factor de crecimiento de queratinocito	KGF	Epitelización de las heridas
Factor de crecimiento epidérmico	EGF	Proliferación de las epiteliales; células mesenquimales y fibroblastos
Factor de crecimiento como insulina	IGF-1	Desarrollo y la homeostasis del cartílago; formación de hueso

Los factores de crecimiento pueden estimular o inhibir la división celular, la diferenciación y la migración. Los factores de crecimiento regulan el proceso celular, tal como: la expresión de genes, ADN y síntesis de proteínas, y la liberación del factor autocrino y paracrino. Los factores de crecimiento pueden causar disimiles de respuestas cuando se aplica a diferentes tipos de células o tejidos, y su efecto en un determinado tipo de célula o tejido puede variar de acuerdo a la concentración o el tiempo de aplicación.

Algunos se almacenan temporalmente en la matriz extracelular, y algunos deben unirse a moléculas de la matriz para convertirse en activos. Los factores de crecimiento pueden adicionarse al medio de cultivo celular, actuando en el crecimiento del tejido *in vitro*. El control de la adición de los factores de crecimiento también puede ser propuesto [2].

Capítulo 3 Simulación de flujo en un bioreactor para Ingeniería de Tejidos.

3.1. Introducción

Un Bioreactor en Ingeniería de Tejidos es un sistema capaz de controlar la reproducción de células, la proliferación del tejido, e imitar fisiológicamente y mecánicamente el medio ambiente del tejido a producir así como asegurar el transporte de nutrientes a una temperatura de 37°C y una humedad atmosférica con 5% de CO₂.

En Ingeniería de Tejidos lo más común, y simple es cultivar células en un medio estático. Sin embargo, la transferencia de nutrientes es baja [24,25]. El medio estático en un tiempo largo conduce a limitar la viabilidad de la célula y la formación de la matriz extracelular en el andamio [26-30].

Investigaciones recientes han demostrado que los problemas relacionados con difusiones bajas se pueden mitigar con un bioreactor de perfusión [26-30]. El medio es forzado a través de una red de poros interconectados al andamio. Una ventaja adicional y crítica en los bioreactores de perfusión es inducir estímulos mecánicos a través del flujo en las células que se encuentran dentro del andamio, lo que puede aumentar la producción de la matriz extracelular [31-33]. Debido a que la carga *in vivo* varía sustancialmente en los diferentes tejidos, la carga óptima para la formación del tejido *in vitro* en un biorreactor también debe variar entre los tipos de tejidos.

La mayoría de los bioreactores de perfusión han sido diseñados para hueso y cartílago en Ingeniería de Tejidos. Los bioreactores de perfusión han sido diseñados específicamente con andamios rígidos, como malla de titanio [34], cerámicos [35], y varios polímeros [36,37]. Sin embargo, para la generación de hueso y cartílago dichos andamios son sometidos a cargas dinámicas *in vivo*. En cultivos de dos dimensiones, los osteoblastos han demostrado ser más mecano-sensibles a flujo pulsante y oscilatorio comparado con un flujo constante [38]. El flujo

oscilatorio puede ser usado para aumentar la formación de hueso porque aumenta los osteoblastos en el andamio [39]. Una investigación detallada sobre los efectos diferenciales en el flujo que puede ser constante, por pulsos y oscilatorios en osteoblastos y condrocitos puede proporcionar información crítica para la optimización del bioreactor en hueso y cartílago respectivamente en Ingeniería de Tejidos.

El bioreactor de perfusión ofrece mayor transferencia de masa en el interior del andamio de tres dimensiones [40]. Este tipo de bioreactor utiliza una bomba para adicionar un medio (flujo) continuamente a través de la red porosa interconectada en el andamio. La vía de fluidos debe limitarse a fin de asegurar la trayectoria del flujo a través del andamio, en lugar de los alrededores del borde. Ofrece una conveniente forma de proporcionar estimulaciones mecánicas a las células por el flujo de esfuerzo cortante (en las células de hueso se sabe que son estimuladas por señales mecánicas). La cantidad de esfuerzo cortante experimentada por las células en un bioreactor de perfusión puede ser variado simplemente modificando la velocidad de flujo a través del bioreactor. Por supuesto, dependiendo de la estructura porosa, el esfuerzo cortante local experimentado por las células individuales puede ser variable y dependiente de micro arquitectura del andamio.

Los bioreactores de perfusión tienen evaluaciones muy limitadas con el andamio y el bioreactor de perfusión o la caracterización del flujo con estos sistemas. Esta evaluación es vital en la optimización del bioreactor [41].

3.2. Diseño fisiológico para bioreactores de perfusión.

Para el diseño del bioreactor de perfusión se considera lo siguiente:

- El flujo debe pasar por el centro del andamio en lugar del borde [42].
- La transferencia de masa debe ser efectiva debido a los perfiles de flujo, la velocidad del fluido requerida para mantener la viabilidad de la célula en el andamio y estimular mecánicamente las células (0.01–2.0 ml/min) para hueso y cartílago [26,27].
- Deber ser repetible, controlable y coherente respecto con la velocidad de flujo.

- Debe ser esterilizado y mantener las condiciones de esterilización durante el periodo del cultivo. La contaminación puede alterar los resultados, causando conclusiones incorrectas.
- Debe ser operable, cuanto más complicado y problemático sea un sistema se convierte en más espacio para los factores ajenos que sin querer complican los efectos y por lo tanto alteran los resultados.

3.3. Bioreactor de perfusión diseñado por Michael J. y colaboradores.

El sistema consta de una bomba de jeringa, una cámara donde se encuentra el andamio y un depósito (como se muestra en la fig. 5A), los cuales están conectados por: un gas permeable, tubos de silicona, platino curado y dos conectores rápidos (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). Para mantener las condiciones óptimas en el cultivo celular, todo el sistema se coloca en una incubadora estándar de CO₂. Un tapón para el gas permeable (AGB, Dublin, Ireland) se utiliza en la parte inferior del depósito (Bellco Glass, Vineland, NJ), para mantener la esterilidad y mejorar el intercambio de gases O₂/CO₂ durante el cultivo celular. En la fig 5B el andamio se encuentra sostenido por los empaques de silicona (diámetro interno de 12.1 mm) entre dos piezas de policarbonato que conforman el bioreactor. La bomba de jeringa (NE-1600, New Era Pump Systems, Farmingdale, NY) se puede programar para un flujo constante, por pulsos y oscilatorio, los perfiles de flujo se muestran en la fig. 5C. Las mediciones de la velocidad de flujo volumétrico en flujo constante se evaluaron en un rango de 0.1 -2 ml/min. Para el flujo pulsante y oscilatorio fue de 0.5-2 ml/min [43].

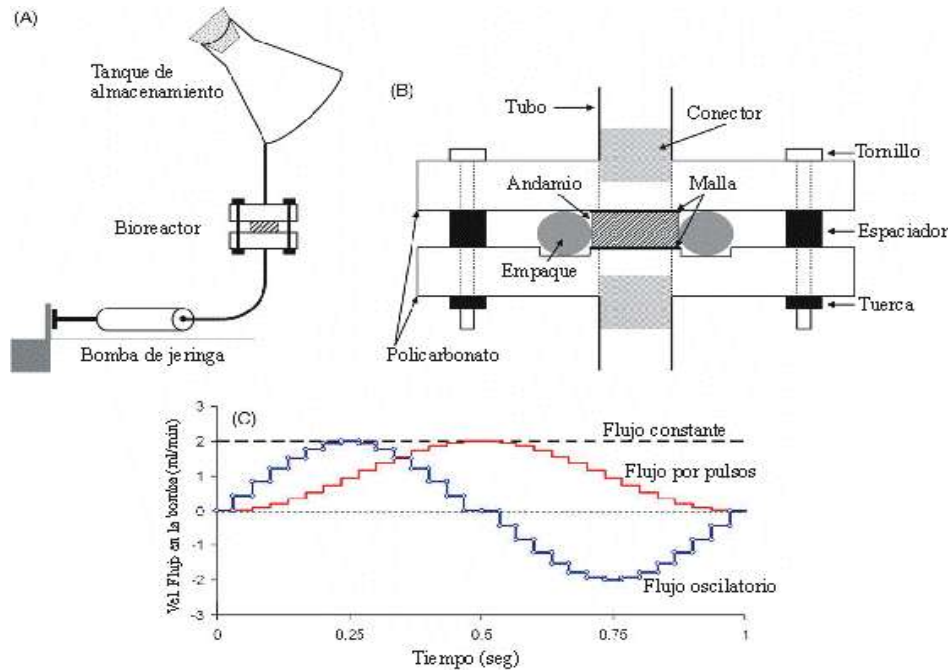


Figura 5. Flujo dinámico en el bioreactor de perfusión: (A) Sistema del bioreactor, (B) Sección del andamio y (C) Perfiles de flujo programados en una bomba de jeringa [43].

Para obtener el flujo de perfusión, los empaques tienen un diámetro interno de 12.1 mm, el diámetro de la pieza de polycarbonato es de 9.5 mm, todo el perfil de flujo tiene un caudal máximo de 2.0 ml/min y los perfiles de flujo tienen una frecuencia de 1Hz. Los cambios en la velocidad de flujo se utilizan para aproximar las formas de onda senoidal para los perfiles de flujo dinámico [43].

3.4. Metodología

Materiales:

- Se requiere el uso del software multifísica COMSOL para realizar las simulaciones de flujo en el bioreactor de perfusión.
- Para diseñar los componentes del bioreactor se utilizó el mismo software COMSOL, en virtud de su facilidad para manejar geometrías paramétricas.

- Se tomaron como propiedades del fluido las correspondientes al agua, en virtud de que las especies químicas disueltas en el medio de cultivo tienen una contribución despreciable al cambio de las propiedades físicas del agua, componente principal del medio de cultivo.
- Se utilizó una computadora HP Intel core7i con 8 Gb de memoria RAM.

3.5. Definición de la geometría

El bioreactor debe de estar diseñado para dirigir el flujo a través del interior del andamio. Se propone un bioreactor con la siguiente arquitectura, en la Fig. 6, se muestra la geometría del bioreactor de perfusión considerando una sola área. En este enfoque se generó un sólido de revolución para generar la geometría en 3D.

Sin embargo, al realizar las simulaciones se tuvieron problemas en los resultados debido al mallado inconsistente.

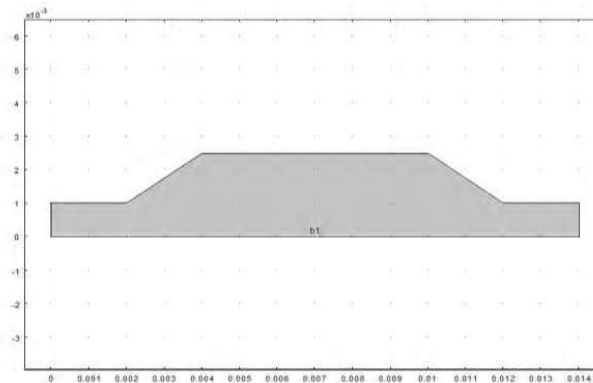


Figura 6. Arquitectura del bioreactor de perfusión considerando un área.

En la Fig. 7, se muestra la geometría del bioreactor de perfusión considerando diferentes volúmenes a base de conos y cilindros. En la sección L_1 se conectarán las tuberías que suministrarán el fluido al bioreactor, en la sección L_3 se colocará el andamio para Ingeniería de Tejidos. Este nuevo enfoque nos permitió obtener una mejora de mallado y consecuentemente mejores resultados.

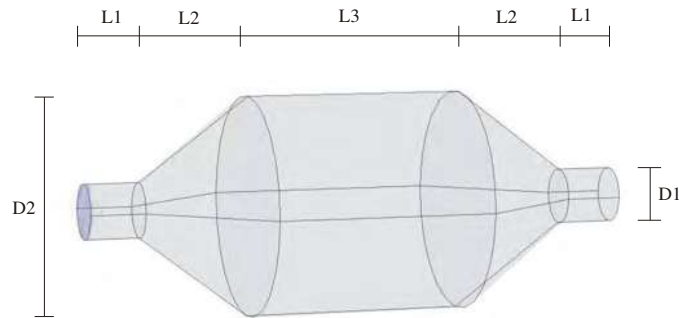


Figura 7. Arquitectura del biorreactor de perfusión considerando 3 cilindros y 2 conos.

3.5.1. Definición de los modelos a analizar en base a sus parámetros geométricos.

En la tabla 3, se muestran siete modelos considerados para nuestro análisis, y sus parámetros geométricos.

Tabla 3. Geometría considerando sus parámetros.

Geometría	1	2	3	4	5	6	7
	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
D1	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2
D2	2	3	4	5	6	7	8
L1	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6
L2	1	1.4	1.8	2	2.4	2.8	3
L3	2	2.5	3.5	4	4.5	5.5	6

3.5.2. Análisis de sensibilidad de la malla del bioreactor de perfusión.

Para determinar el tipo de malla a utilizar en todas nuestras simulaciones, se realizó un análisis de sensibilidad de la malla. Para ello se procedió a mallar la geometría con diversos tipos de mallado como se muestra en la tabla 4, tabulándose el número de elementos, el tiempo de cálculo de la simulación y la velocidad máxima del fluido.

Tabla 4. Datos para el análisis de sensibilidad.

No. Elementos	Tiempo Seg	Velocidad $\times 10^{-5}$ (m/seg)
163742	643.571	8.331
33836	250.008	8.313
10284	29.132	8.036
4319	15.091	8.247
2910	11.167	8.005
2150	9.61	8.089
1101	8.245	7.817
1044	8.626	7.872
532	7.325	8.472

Con los datos tabulados se generó la gráfica mostrada en la figura 8, en la cual podemos apreciar que la velocidad se mantiene estable a partir de 10,284 elementos tetraédricos, con un tiempo de solución de 29.132 s. en una computadora HP Intel core7i con 8 Gb de memoria RAM.

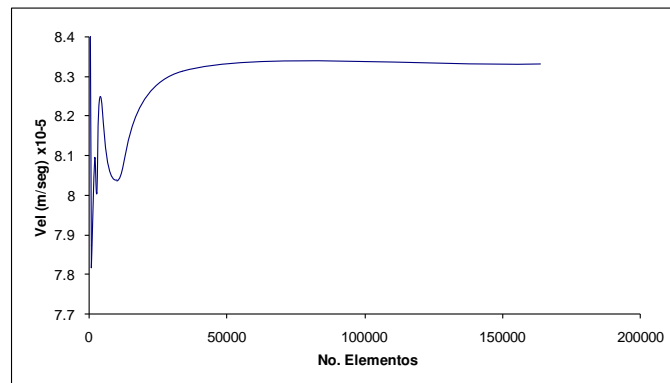


Figura 8. Análisis de sensibilidad.

Como se explicó anteriormente, para generar la geometría de estudio se utilizó el software COMSOL Multiphysics. Se generó un mallado volumétrico (ver figura 9), que consistió de 10,284 tetraedros, de acuerdo con el análisis de sensibilidad.

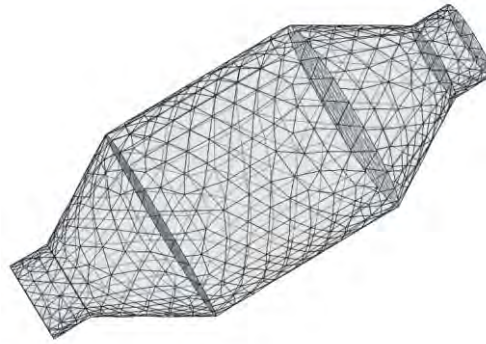


Figura 9. Mallado volumétrico para el bioreactor.

En la figura 10, se impusieron como condiciones de contorno, la velocidad de entrada (0.001-0.046 m/s) con incrementos de 0.005 m/s, considerando un total de 10 velocidades de entrada, la presión a la salida del bioreactor de $P = 0$ Pa y una temperatura constante de 310.15 K.

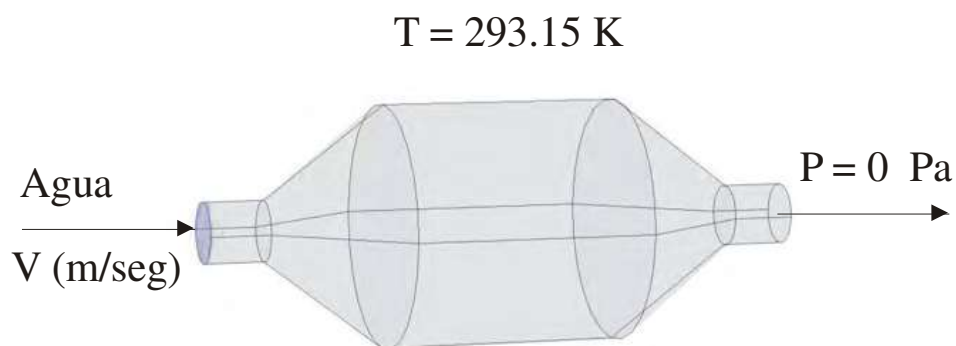


Figura 10. Condiciones de frontera en el bioreactor.

3.6. Resultados

En esta sección se presentan diferentes geometrías propuestas para el análisis de velocidad de flujo en el bioreactor, considerando, el tamaño del andamio para la formación de hueso, el perfil de velocidad para que las células dentro del andamio reciban los nutrientes necesarios y tengan una eficaz eliminación del producto de desecho. En nuestro caso hemos considerado una forma de cilindros y conos, el cual nos permite que el bioreactor sea reproducible y tenga beneficios para aplicaciones clínicas.

En la Fig 11, se muestra el perfil de distribución de la velocidad, para una velocidad de entrada de 0.03 m/s, en esta figura podemos observar que en el centro del bioreactor se alcanza la velocidad máxima y asegurar que las células reciban los nutrientes necesarios para la formación de hueso.

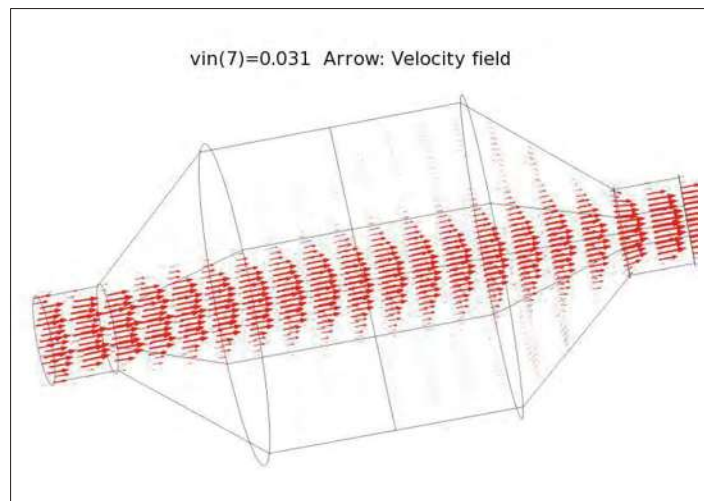


Figura 11. Perfil de velocidad en el bioreactor de perfusión.

En la Tabla 5, se muestran la velocidad máxima y el esfuerzo cortante máximo en las diferentes geometrías del bioreactor de perfusión, para diferentes velocidades de entrada (0.001-0.046 m/s) con incrementos de 0.005 m/s.

Tabla 5. Velocidad y esfuerzo cortante máximos en el bioreactor de perfusión.

Geometría	Vel. Max (m/seg)	Esfuerzo cortante (Pa)
1	0.0653	0.0605
2	0.0649	0.0556
3	0.0663	0.0362
4	0.0662	0.0318
5	0.0664	0.0269
6	0.0673	0.0213
7	0.0683	0.0188

Porter [3] declara que se asocia la muerte celular en un andamio, con un esfuerzo cortante de 5.7×10^{-2} Pa.

Podemos observar que para la geometría 1 y 2 el máximo esfuerzo cortante sobrepasa el límite reportado por Porter, por lo que podemos esperar que dichos bioreactores induzcan a la apoptosis, es decir a la muerte celular, por lo que no es conveniente utilizarlos para formación de tejidos puesto que las células cultivadas se morirían.

Para visualizar el comportamiento del esfuerzo cortante a lo largo del eje central del bioreactor se puede ver la figura 12. En ella se puede apreciar que se presentan máximos en los cambios de sección, así como en el centro del bioreactor.

Se puede deducir que podría presentarse muerte celular en el centro, así como en la sección final del bioreactor. Sin embargo, se debe considerar la geometría del andamio, pues éste tendería a modificar el patrón de flujo.

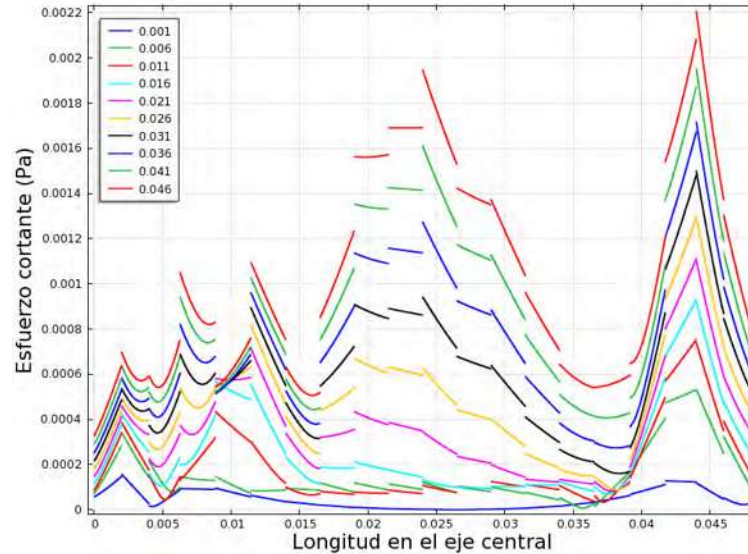


Figura 12. Distribución del esfuerzo cortante en la geometría 1 para diversos valores de velocidad de entrada.

Para cada bioreactor propuesto se generó un gráfico de la distribución de esfuerzos cortantes máximos, y se fijó una línea de referencia con los límites reportados por Porter [3]. A manera de ejemplo se presenta el gráfico para la geometría 1, en la cual se puede apreciar cómo a medida que se incrementa la velocidad de entrada se aproxima el esfuerzo cortante a la línea de referencia de apoptosis (ver figura 13).

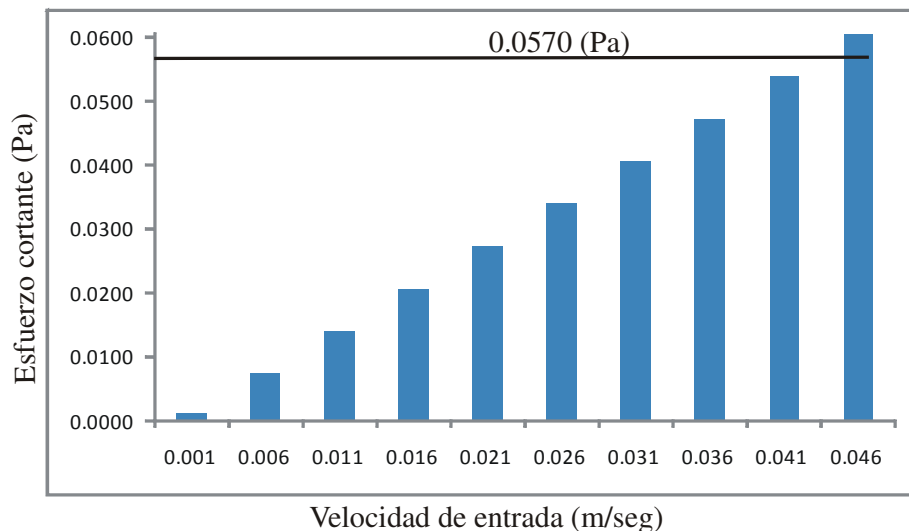


Figura 13. Velocidad de entrada respecto al esfuerzo cortante.

Capítulo 4 Modelado de andamios para Ingeniería de Tejidos.

4.1. Introducción

En Ingeniería de Tejidos, un neotejido generalmente es generado a partir de células sembradas en un andamio e incorporando factores de crecimiento. En teoría, cualquier tejido puede ser creado usando este principio de la Ingeniería de Tejidos. Sin embargo, con el fin de alcanzar con éxito la regeneración de tejidos u órganos basados en el concepto de Ingeniería de Tejidos, varios elementos críticos deben ser considerados con prudencia, incluyendo biomateriales que sirven como soporte mecánico para el crecimiento celular, células progenitoras que pueden diferenciarse en tipos celulares específicos, y factores de crecimiento inductivos que puedan activar las células [44].

Un andamio, para Ingeniería de Tejidos es una estructura hecha de un biomaterial, que permite dar soporte y sustituir la matriz extra celular de órganos o tejidos. Además conduce y distribuye adecuadamente los nutrientes a las células. Proporciona a las células la superficie adecuada para poder adherirse, crecer, diferenciarse y proliferar en un ambiente en tres dimensiones. En general, los andamios varían con respecto al biomaterial, la geometría, la estructura, las propiedades mecánicas y la degradación [45].

Un biomaterial es un material del que se pretende que actúe interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o substituir algún tejido, órgano o función del organismo, por ejemplo colágenos o polímeros sintéticos. La geometría depende del tipo de material, por ejemplo pueden ser geles, mallas fibrosas y poros en forma de esponja. La estructura del andamio determina el transporte de nutrientes y moléculas regulatorias, dependiendo de la porosidad, distribución, orientación y conectividad de los poros.

Los andamios deben ser elaborados de materiales biocompatibles y degradables preferentemente los que se utilizan en productos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) [45].

La biocompatibilidad es la capacidad de un material para llevar a cabo sus prestaciones con una respuesta apropiada del huésped en una situación específica. Para ser compatible un biomaterial debe cumplir con las siguientes características:

- No ser tóxicos
- No ser trombogénicos
- No ser cancerígenos
- No producir reacciones inflamatorias significativas
- No ser alergénicos.
- No afectar al sistema inmunológico

4.1.1. Andamio para el tejido óseo

Hay dos formas de hueso llamadas, hueso cortical y hueso esponjoso, con diferente morfología debido a que sus funciones primarias son diferentes. En los adultos el esqueleto está compuesto de 80% de hueso cortical y 20% de hueso esponjoso, además las proporciones varían según el lugar del esqueleto. El hueso cortical tiene 10% de porosidad, dando soporte mecánico y protección a los órganos internos, el hueso esponjoso tiene entre 50-90% de porosidad y provee del medio ambiente las funciones metabólicas, tal como al sistema hematopoyético [46,47].

La ingeniería de tejidos óseo tiene como objetivo crear andamios adecuados para el tratamiento de lesiones traumáticas, la osteoporosis, la artritis y el cáncer de hueso [48].

El cultivo de células óseas *in vitro* está bien desarrollado en la estructura tradicional 2D [49]. Sin embargo, el tejido óseo no es de dos dimensiones y tiene una arquitectura definida en una estructura 3D. Por lo que se hace necesario poder cultivar las células óseas en estructuras

tridimensionales, para que puedan tener un mejor desarrollo y perciban dicha estructura como las trabéculas del hueso esponjoso, es decir perciban al andamio como un medio más acorde a su naturaleza.

4.1.2. Consideraciones del andamio para el tejido óseo

El andamio ideal para el tejido óseo debe imitar las propiedades naturales de la matriz extracelular producida por los osteoblastos, y tener propiedades mecánicas. Un buen andamio para Ingeniería de Tejidos lo propuso Yang [50], quien consideró la estructura, el tamaño de poro y la porosidad que son de importancia para el diseño requerido para hueso. El diámetro de las células en suspensión dicta el tamaño mínimo de los poros, que varían con el tipo de células [51].

El tamaño de poro óptimo debe tener en cuenta el potencial de vascularización así como el cambio en el tamaño de poro por la degradación y la invasión de células [52]. Whang [51] reporta el tamaño de poro óptimo para el crecimiento interno del osteoide en andamios bioreabsorbibles de 40-100 μm , y 100-350 μm para la regeneración de hueso en poros cerámicos [53]. Hulbert reporta que con un tamaño de poro de 50-150 μm induce a la formación del osteoide y 150-500 μm se da la mineralización de hueso [54]. Sin embargo, Holy [55] reporta la formación de hueso *in vitro* de PLGA con tamaño de poros de 1.5-2.2 mm.

La microporosidad, la estructura molecular y la rugosidad afectan al crecimiento del hueso [56-58]. Las propiedades químicas y fisicoquímicas del andamio son vitales para un buen acoplamiento celular, migración, proliferación y funcionalidad de las células en el cultivo.

4.2. Diseño de andamios

El diseño de un andamio es esencial para la correcta interacción con las células, además, es esencial que se cumpla la función *in vivo*.

La ciencia de los biomateriales ha adoptado principalmente un acercamiento de prueba y error, con las modificaciones que son hechas a un diseño existente basado en resultados experimentales *in vitro* o *in vivo*. Las mejoras en las condiciones de cultivo celular y el desarrollo de bioreactores han mejorado grandemente la confiabilidad de experimentos *in vitro*. No obstante, el diseño asistido por computadora (CAD) puede también contribuir a la reducción de pruebas experimentales y acortar el proceso de diseño de andamios [59-61]. Esta técnica se puede utilizar para diseñar cualquier clase de componente o de material y podría ser muy útil para el diseño de andamios en la Ingeniería de Tejidos. Hollister y colaboradores, trabajaron sobre el diseño de andamios, quiénes demostraron que los andamios de un material pueden ser definidos por el módulo de Young y el coeficiente de Poisson [62, 63]. Esta técnica tiene gran alcance ya que permite el cálculo de la respuesta mecánica de un andamio, es versátil, puesto que un andamio con diversos tamaños o tipos de poro pueden ser modelados. Sin embargo, este acercamiento de asumir que las morfologías de crecimiento podrían presentar la mejor geometría de andamio no es completamente cierto.

4.3. Superficies nodales periódicas en el diseño de andamios

El uso de superficies matemáticas para definir la morfología de materiales porosos permite generar modelos que pueden ser analizados en un ambiente virtual sin la necesidad de cualquier prueba física. Reduciendo costos de equipo, eliminando errores inevitables debido a la heterogeneidad de las características de las probetas de origen. Errores de medición que surgen siempre en las experimentaciones y configuraciones, de esta manera pueden ser evitados. Una ventaja adicional de estos modelos es que pueden ser generados fácilmente y rápidamente, modificando y cambiando pensamientos entre científicos e ingenieros que pueden retroalimentar sus resultados al resto de la comunidad científica [64].

La principal desventaja es que los modelos no son capaces de simular completamente el comportamiento real del objeto. En la investigación de diferentes propiedades se requiere la generación de modelos diferentes para el mismo sistema.

Los modelos son creados para resolver problemas individuales relacionados en general a un sistema complejo. Incluso para conocer la respuesta mecánica de un material poroso en términos de la distribución de esfuerzos bajo ciertas cargas se requieren modelos diferentes, a menudo en diferentes escalas, para una investigación apropiada.

Los materiales porosos pueden describirse a partir de un punto de vista topológico. La superficie de separación que define el arreglo interno de la porosidad puede ser considerada. La superficie de separación entre el sólido y la parte vacía de la estructura será diseñada a través de un modelo matemático sobre la base de las funciones y restricciones definidas en el material [64].

Una de las ventajas de utilizar expresiones matemáticas que definen la superficie es que un número deseado de parámetros pueden ser asignados al modelo para optimizar la forma posterior y generarse de una manera relativamente fácil.

Estos modelos pueden ser generados con la ayuda de una rutina escrita por Michael Carley con el uso de GNU Triangulated Surface Library [65]. Finalmente la geometría puede ser estudiada por análisis de elemento finito (Finite Element Analysis (FEA)), para determinar el esfuerzo a partir de una carga.

4.4. Modelado de andamios mediante superficies

El número de posibles superficies continuas que satisfacen el requisito de dividir el espacio en dos partes de volumen dado es, evidentemente, infinito. Varios métodos han sido y están siendo adoptados para modelar superficies periódicas con ciertas geometrías mediante el uso de funciones y limitaciones prescritas [66]. A continuación se describen dos métodos para generar la geometría del andamio.

El primer método consiste en utilizar una aplicación de software de modelado sólido. Con programas de modelos tridimensionales es relativamente fácil construir estructuras a partir de objetos elementales, tales como cilindros. Los cilindros se pueden unir, agrupar para obtener

una célula paramétrica. Una serie periódica puede completar el ejercicio. Aunque este método parece rápido e intuitivo, la información almacenada en una computadora aumenta rápidamente cuando se manejan NURBS (Non Uniform Rational B-Spline) y hay límites para la superficie continua en las uniones.

NURBS son curvas matemáticas obtenidas por la unión de más curvas polinomiales. Son ampliamente utilizados en ordenadores gráficos debido a su gran versatilidad en la representación de las formas y la facilidad con que puede ser impuesta a la geometría.

El segundo método consiste en generar las estructuras puramente por expresiones matemáticas. Este estudio considera un aumento en la superficie mínima, descubierto en 1890 por Hermann Schwarz [67] y en 1970 por Alan Schoen [68], de forma similar es considerado por varios autores en los últimos años para diferentes áreas [69, 70]. Este método es muy versátil porque las geometrías producidas, se definen por una sola expresión matemática, y fácilmente se modifican. Una ventaja adicional es que el azar puede ser introducido en la red, de modo que su distorsión proporciona propiedades isotrópicas de la materia porosa macroscópica. El único inconveniente es que a un cambio en los parámetros se traducirá en un cambio aparentemente impredecible en la forma.

Las superficies se pueden expresar por la siguiente igualdad:

$$f(x, y, z) = 0 \quad (4.1)$$

Donde f es una función declarada de forma implícita. Usando una combinación de funciones trigonométricas es posible generar un amplio rango de formas periódicas, en la forma:

$$\sum_{i=1}^3 \prod_{j=1}^n \cos(x_i) + k = 0 \quad (4.2)$$

Donde la simetría está garantizada por la intercambiabilidad rotacional de cada variable espacial.

En la figura 14 se representan 3 superficies diferentes que satisfacen la ec. 4.1, así como sus restricciones y definir sus propiedades estructurales: el prisma, el diamante y el giroide. Estas superficies tienen interconectividad.

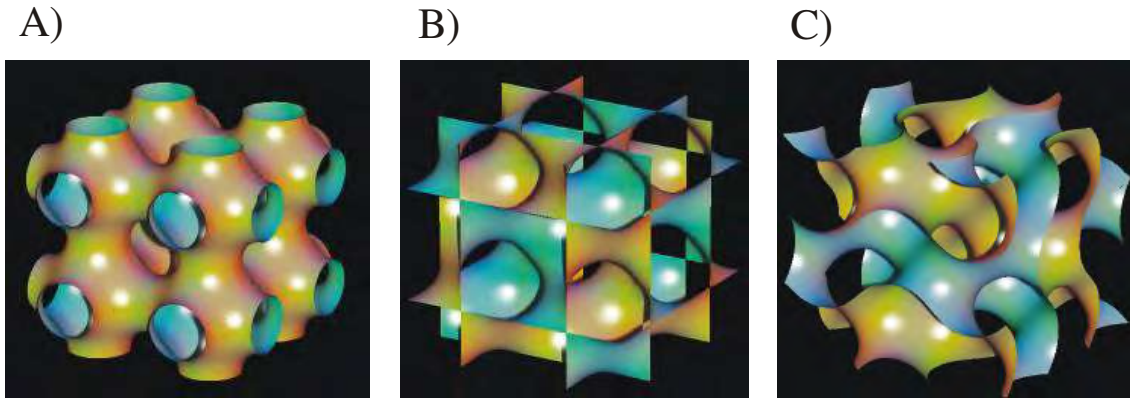


Figura 14. Representación de las superficies: A) Prisma, B) Diamante y C) Giroide [64].

Se elaboraron en 3DSurf varias geometrías para representar las estructuras porosas de los andamios para Ingeniería de Tejidos óseos que se colocarían en el bioreactor.

La ecuación número 4.3, genera un giroide con una porosidad de 99% (ver figura 15).

$$\begin{aligned}
 & -1.46 + \cos(x) * \sin(y) + \cos(y) * \sin(z) \\
 & + \cos(z) * \sin(x) - 0.07 * (\cos(2 * x) * \cos(2 * y) \\
 & + \cos(2 * y) * \cos(2 * z) + \cos(2 * z) * \cos(2 * x)) = 0
 \end{aligned} \tag{4.3}$$

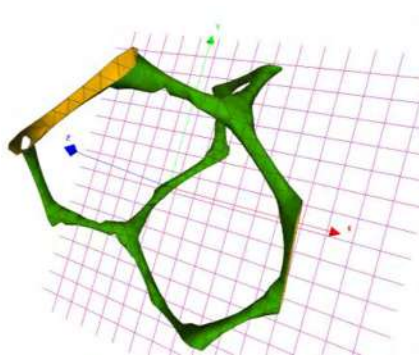


Figura 15. Giroide con porosidad de 99% creado con el software 3DSurf.

La ecuación número 4.4, genera un giroide con una estructura irregular (ver figura 16).

$$\begin{aligned}
 &1.47 + \cos(x) * \sin(y) + \cos(y) * \sin(z) \\
 &+ \cos(z) * \sin(x) + 0.76 * (\cos(2 * x) * \cos(2 * y) \\
 &+ \cos(2 * y) * \cos(2 * z) + \cos(2 * z) * \cos(2 * x)) = 0
 \end{aligned} \tag{4.4}$$

La cual presentó varios problemas para generar una malla superficial cerrada por la irregularidad de los elementos superficiales y su consecuente transformación a volumen.

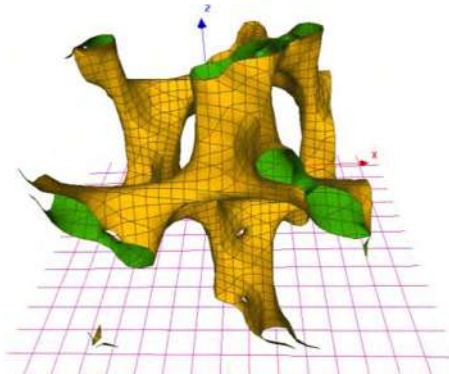


Figura 16. Giroide 1 creado con el software 3DSurf.

La ecuación número 4.5, genera un giroide con una porosidad de 55% (ver figura 17).

$$\begin{aligned}
 &\cos(x) * \sin(y) + \cos(y) * \sin(z) \\
 &+ \cos(z) * \sin(x) = 0
 \end{aligned} \tag{4.5}$$

Que es analizado por Olivares [71], y se ha tomado para contrastar nuestros resultados.

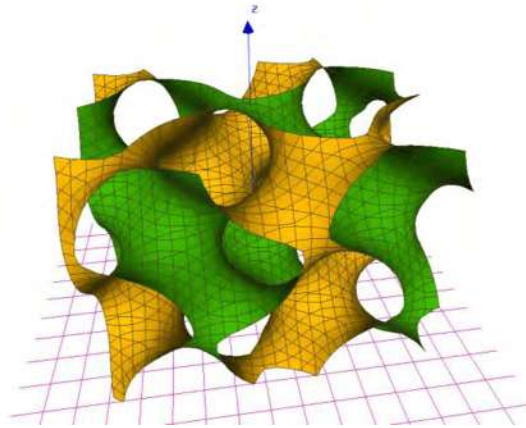


Figura 17. Giroide analizado por Olivares [71], creado con el software 3DSurf.

Una vez creadas las figuras geométricas de los giroides, se procedió a exportarlos con formato STL e importarlos en COMSOL Multiphysics, donde se generó el mallado volumétrico (ver figura 18).

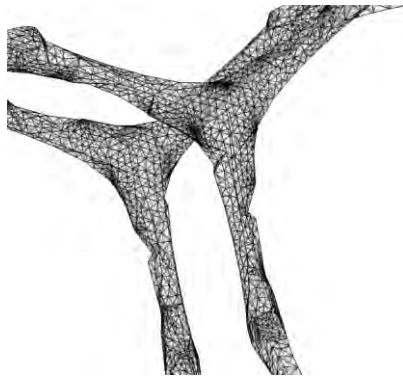


Figura 18. Mallado tetraédrico del giroide 99.

Este tipo de mallado se utilizó para resolver los modelos de interacción fluido-estructura y mecanoregulación.

Capítulo 5 Interacción fluido-estructura en andamios para ingeniería de tejidos.

5.1. Introducción

Muchos fenómenos en la vida real están caracterizados por el flujo de un fluido que es afectado por la deformación de una estructura sólida, que a su vez es deformada por las fuerzas ejercidas por el fluido. Modelar la interacción fluido estructura (FSI) involucra acoplamientos multifísicos específicos entre las leyes que describen la dinámica de fluidos y la mecánica estructural.

En COMSOL Multiphysics, la interfaz de modelado para una simulación FSI consta de tres partes: una estructura sólida, el dominio del fluido y un conjunto de ecuaciones que generan una extensión suave de la deformación de la malla del sólido dentro del dominio del fluido. En la parte sólida, la malla sigue al material, y las ecuaciones no lineales de la estructura se escriben respecto a la forma no deformada. En el dominio del fluido, los desplazamientos son suavizados por las ecuaciones de Wislow, que han sido diseñadas para mantener la calidad del elemento tan elevada como sea posible [72].

La tecnología que permite realizar esto en COMSOL Multiphysics está basada en un conjunto de marcos (frames). Cada marco define esencialmente un conjunto de coordenadas. Excepto por el marco de referencia que ya viene configurado por defecto, y está basado en la malla original, diferentes marcos representan diferentes conjuntos de coordenadas de desplazamiento. Éste puede determinarse a través de la deformación del sólido, con una ecuación de suavizado en el fluido, o con expresiones definidas por el usuario. La interfaz de modelado FSI usa una combinación de las dos primeras alternativas.

Todas las variables dependientes deben estar unidas al marco, y el software evalúa sus derivadas parciales en dicho marco. En un modelo FSI, las ecuaciones de la estructura se escriben con respecto al marco de referencia, mientras que las ecuaciones de dinámica de fluidos se definen sobre el marco espacial deformable. Cualquier ecuación escrita

originalmente en coordenadas espaciales (Euler) puede aplicarse sin modificación en un marco móvil. Así mismo, se pueden configurar las ecuaciones en las coordenadas de referencia (Lagrange) sobre un marco de referencia fijo. La combinación de estas formulaciones configura el método arbitrario Lagrange-Euler (ALE). El método ALE es adoptado automáticamente por el modo de aplicación, pero también se puede acceder a él como un modo de aplicación independiente [72].

En un modelo FSI, la deformación de la malla es parte de la solución. La precisión es mejorada ampliamente pues no es necesaria ninguna interpolación en la interfaz fluido-sólido porque el mismo código resuelve los dos tipos de sistemas físicos (estructura y fluido). De esta forma, la continuidad de la velocidad y la conservación de la masa pueden garantizarse. Al mismo tiempo, una formulación integral de la condición de contorno puede asegurar un balance de fuerza muy exacto en la interfaz, así como un postprocesado más preciso de arrastre y elevación.

A pesar de todas estas posibilidades, la verdadera fortaleza de COMSOL Multiphysics es que la aproximación usada para el modelado FSI es extensible a cualquier otro tipo de acoplamientos de modelado, incluyendo mallas móviles, directamente en la interfaz de usuario [72].

5.2. Metodología

En COMSOL Multiphysics, la interfaz de modelado para una simulación FSI combina el flujo del fluido con la mecánica del sólido para capturar la interacción entre el fluido y la estructura sólida.

El flujo del fluido es descrito por la ecuación de Navier-Stokes, que proporciona una solución para el campo de velocidad \mathbf{u} . La fuerza total ejercida sobre el límite del sólido por el fluido es el negativo de la fuerza de reacción sobre el fluido.

$$\mathbf{f} = -\mathbf{n}*(p\mathbf{I} + \eta(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)) \quad (5.1)$$

Donde p denota la presión, η es la viscosidad dinámica para el fluido, \mathbf{n} es la normal exterior al límite y \mathbf{I} es la matriz identidad. La ecuación de Navier-Stokes se resuelve en el espacio, mientras que para la física de la mecánica del sólido se define en el marco del material, una transformación de la fuerza es necesaria. Esto se hace de acuerdo con:

$$\mathbf{F} = \mathbf{f}^* \frac{dv}{dV} \quad (5.2)$$

Donde dv y dV son los factores de malla de los elementos de escala para el marco espacial y el marco del material, respectivamente.

En COMSOL Multiphysics, la interfaz de modelado para una simulación FSI proporciona las ecuaciones y funciones para la interacción fluido-estructura, dando solución a los desplazamientos, velocidad del fluido y presión del fluido.

Para generar la geometría del estudio se importaron en COMSOL Multiphysics las figuras geométricas de los giroides. Se generó el mallado volumétrico (ver figura 19), que consistió de 107,377 tetraedros y un total de 222,994 grados de libertad.

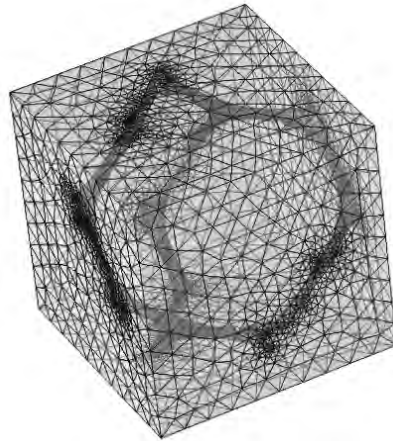


Figura 19. Mallado volumétrico para la interacción fluido-estructura.

En la figura 20, se muestran las condiciones de contorno que se impusieron: un empotramiento en los extremos de la estructura del giroide; la velocidad de entrada de fluido fue de 1 mm/s, 5 mm/s, 10, mm/s y 15 mm/s; a la salida una presión de 0 Pa; y sin deslizamiento de fluido en las paredes. Se consideraron dos materiales, un polímero D,L-PLA con módulo de Young de

3.3 GPa y coeficiente de Poisson de 0.3; y un cerámico Hidroxiapatita con módulo de Young de 7 GPa y coeficiente de Poisson de 0.3[71].

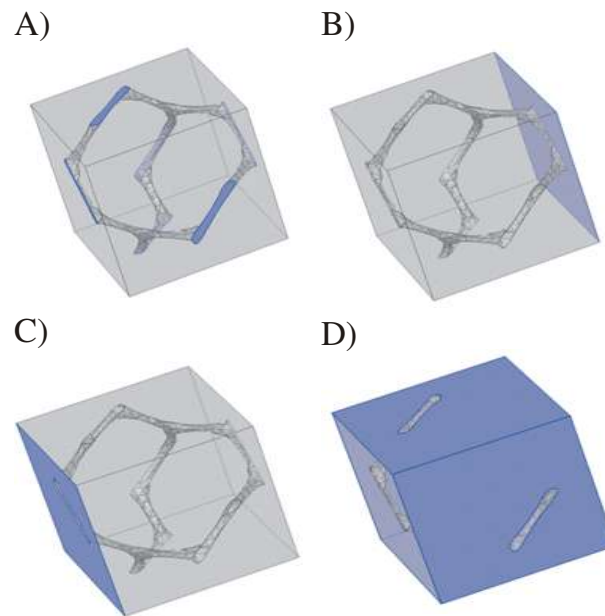


Figura 20. Condiciones de frontera: A) Empotramiento del giroide, B) entrada de fluido, C) salida del fluido, D) Paredes sin deslizamiento de fluido.

5.3. Resultados

En esta sección se presenta el análisis de velocidad de flujo para un andamio con una porosidad del 99%, los cálculos se realizaron con el programa COMSOL Multiphysics®, con elementos y modelos constitutivos, para resolver las ecuaciones de Navier-Stokes, considerando un fluido Newtoniano.

En la figura 21, se presenta el análisis de interacción fluido-estructura para un andamio con una porosidad del 99%, los cálculos se realizaron con el programa COMSOL Multiphysics, con elementos y modelos constitutivos. La barra que se encuentra junto al andamio muestra la velocidad máxima y la barra siguiente muestra el esfuerzo de Von Mises.

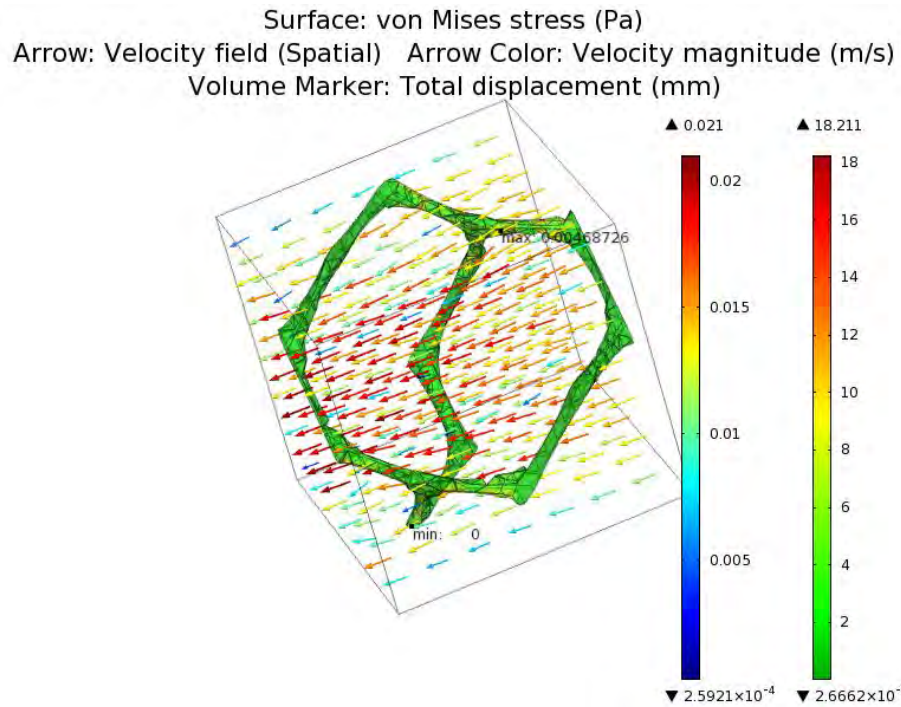


Figura 21. Análisis de interacción fluido-estructura.

En la figura 22, se presenta el análisis de la presión ejercida por el fluido para un andamio con una porosidad del 99%, los cálculos se realizaron con el programa COMSOL Multiphysics, con elementos y modelos constitutivos. La presión ejercida sobre el andamio es en la entrada del andamio.

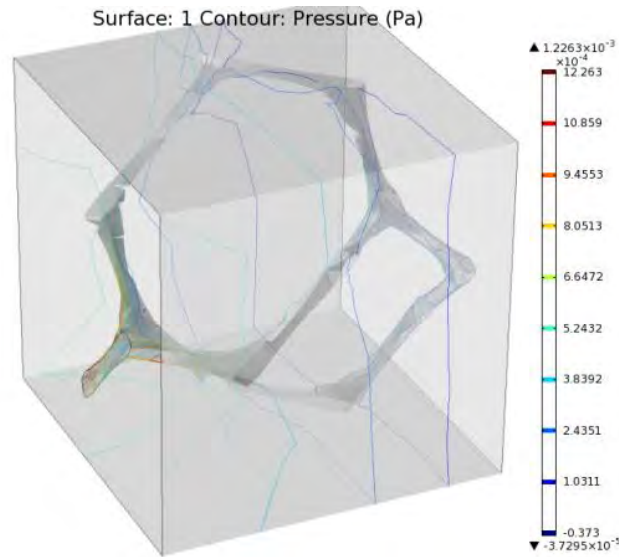


Figura 22. Presión ejercida por el fluido.

En la tabla 6, se muestran los datos obtenidos de la simulación de interacción fluido-estructura para diferentes velocidades de entrada. Así como los resultados de: la velocidad máxima, el esfuerzo de Von Mises y la presión.

Tabla 6. Resultados de la simulación de interacción fluido-estructura

Velocidad de entrada (mm/s)	Velocidad Máxima (mm/s)	Esfuerzo de Von Mises (Pa)	Presión (Pa)
1	1.4450	0.1151	0.0023
5	7.0305	2.2387	0.0347
10	14.0000	8.3844	0.1241
15	21.0000	18.211	0.2669

Claes y Heigele [73] propusieron un modelo de mecano-regulación cuantitativo a partir de los resultados que obtuvieron en 1999 de presión hidrostática. La formación de tejido óseo en la superficie de regeneración ósea ocurre para presiones menores a 0.15MPa, en cambio, la formación de tejido del cartílago se produce para valores mayores a 0.15MPa. Debido a que los valores obtenidos no exceden este límite, se puede concluir que favorecerá la creación de tejido óseo.

Capítulo 6 Mecanoregulación en andamios para Ingeniería de Tejidos.

6.1. Introducción

El objetivo de la Mecanobiología es precisamente entender la respuesta celular bajo una acción mecánica, mediado, a su vez, por otros factores que inhiben o ayudan a la reacción celular ante un determinado nivel tenso-deformacional. La característica esencial es el acoplamiento fuerte entre Biología y Mecánica, produciéndose una comunión inseparable entre ambas e influyendo una sobre otra.

La Mecanobiología es una disciplina muy joven. De hecho, esta palabra clave aparece por primera vez en la base de datos PubMed en 1998 en un artículo de revisión en el Journal of Clinical Orthopaedic Related Research, titulado “Mechanobiology of skeletal regeneration”.

Un fenómeno de importancia es la osteointegración. Se entiende por tal, la integración física de tejido óseo con un implante sin que aparezca entre ambos tejido fibroso. A pesar de las elevadas tasas de éxito que están consiguiéndose con la generación actual de implantes, todavía se producen fallos en la práctica clínica. Las causas de esos fallos son tanto mecánicas (por diseño del implante, de su superficie o del proceso de inserción quirúrgica) como biológicas (osteolisis y reabsorción por tensión). Una mejor comprensión de este proceso biológico de interacción hueso-implante es de enorme importancia para la mejora del diseño de los mismos. El daño ya sea parcial o total en tejidos biológicos es muy común. Puede deberse a una sobrecarga por encima de la resistencia del tejido en cuestión, o bien a una carga más o menos cíclica que produce una acumulación gradual de daño que, eventualmente, puede llevar a la fractura (fracturas por tensión o fatiga en el tejido óseo o muscular por ejemplo) cuando dicho daño no se repara con la rapidez suficiente en el proceso habitual de remodelación.

Tras una fractura global se activan procesos de reparación tisular (cicatrización, consolidación ósea, etc.). La fractura ósea, por ejemplo, es uno de los agentes de mayor incidencia social y económica dentro del ámbito sanitario en las sociedades desarrolladas. Un mejor entendimiento de la influencia del ambiente mecánico en el proceso de consolidación ósea permitiría reducir el periodo de rehabilitación y el diseño de protocolos específicos para los pacientes, con el consecuente interés económico y social.

Otro problema que afecta a millones de personas en el mundo es la artrosis que, inducida por la acumulación de daño en el cartílago articular, deriva en ocasiones en la aparición de defectos condrales. La regeneración natural del cartílago es muy reducida, siendo de especial relevancia conseguir un mejor entendimiento del ambiente mecanobiológico en el que éste se desarrolla con objeto de mejorar los protocolos de tratamiento y terapias como la microfractura ósea, mosáicoplastia e ingeniería tisular en general.

En particular, la simulación matemática de estos procesos permite establecer predicciones sobre resultados que pueden durar años en producirse y cuya evaluación experimental es muy costosa y a veces imposible. En la actualidad, se está haciendo un esfuerzo relevante multidisciplinar entre biólogos, médicos e ingenieros para establecer modelos mecanobiológicos fiables y útiles en la práctica clínica. Éstos permitirán conseguir un mejor entendimiento de los patrones de comportamiento de los tejidos vivos, de la influencia de patologías determinadas y del efecto de fármacos sobre un proceso celular concreto, y con ello plantear protocolos de experimentación de forma más dirigida y menos costosa. Los problemas más graves en estos casos, en lo que a un modelado y resolución se refiere, son la existencia de múltiples problemas acoplados con muy distintas constantes de tiempo, la fuerte relación micro-meso-macro, con varias escalas espaciales a correlacionar y, finalmente, la poca información disponible para validar los modelos desarrollados, junto a la fuerte variabilidad de los parámetros implicados.

Los estímulos mecánicos pueden inducir a remodelación de fractura o alterar los caminos biológicos.

La mecanobiología describe los mecanismos por el cual los procesos biológicos son regulados por señales que son inducidas por las cargas mecánicas en las células. Cuando los mecanismos de formación de tejidos mecánicamente regulados son entendidos y bien definidos a nivel celular, las condiciones fisiológicas y los agentes farmacológicos pueden desarrollarse y utilizarse para prevenir la in consolidación ósea y además, para ayudar a acelerar la reparación de fracturas y restaurar la función óptima. Los modelos computacionales están teniendo un efecto profundo en la investigación científica. Muchos procesos biológicos, incluyendo la remodelación del hueso, son tan complejos que la experimentación física consume demasiado tiempo, son muy caras o imposibles. Como resultado de ello, los modelos matemáticos que simulan los sistemas complejos son más utilizados.

En mecanobiología, los modelos matemáticos se han desarrollado y usado junto con experimentos *in vivo* e *in vitro* para determinar cuantitativamente las normas que rigen los efectos de la carga mecánica en las células, la diferenciación en tejidos, el crecimiento, la adaptación y el mantenimiento de los huesos. Las perturbaciones mecánicas son aplicadas a la geometría del modelo, y el medio ambiente mecánico es calculado usando el método de elementos finitos.

Los algoritmos de mecanoregulación se propusieron para investigar la influencia de los estímulos mecánicos en la diferenciación de los tejidos durante la curación de hueso.

Los algoritmos de mecanoregulación necesitan ser validados contra los datos directos *in vivo*. La validación podría ayudar tanto a la comprensión de la biología básica como en la regeneración ósea y en el desarrollo de protocolos de tratamiento clínico para la curación de fracturas, adicionalmente, los modelos validados pueden ser útiles en el diseño de nuevos experimentos [74].

6.2. Mecanobiología

El principio de mecanobiología es que los procesos biológicos celulares son regulados por señales, generadas por cargas mecánicas [75].

La mecanobiología computacional determina las leyes cuantitativas que gobiernan los efectos de las cargas mecánicas en la diferenciación de tejidos, crecimiento, adaptación y mantenimiento. Las consideraciones del modelo incluyen: la aplicación de fuerza en los límites, una fuerza de transmisión a través de la matriz del tejido, mecanopercepción y la transducción por células, la expresión génica celular, y la transformación de las características de la matriz extracelular. Todas estas partes son combinadas en un modelo de simulación computacional. Estos modelos pueden ser representados por variables, parámetros y relaciones matemáticas. Algunas de éstas son conocidas o pueden ser medidas (por ejemplo, morfología, propiedades mecánicas del tejido, características de las cargas externas), y otras son estimadas.

6.3. Modelos mecanobiológicos

Respecto a los procesos biológicos, involucrados para curar el hueso, la experimentación física es muy compleja, consume demasiado tiempo, es cara o imposible. Como resultado, los modelos matemáticos llegan a ser cada vez más importantes. El modelo de elemento finito fue el primero en biomecánica ortopédica en 1972 para evaluar el esfuerzo en huesos humanos [76,77].

Los modelos de elemento finito se han utilizado, por ejemplo, para el diseño y análisis de implantes, para investigar la dependencia del tiempo en el proceso de adaptación en los tejidos [78,79]. Para lograr esto, han sugerido teorías en términos de algoritmos por computadora. Algunos algoritmos propuestos con respecto a la diferenciación del tejido y la sanación del hueso se describen a continuación.

La mayoría de las fracturas sanan a través de curaciones indirectas o secundarias. En una fractura el cartílago se forma dentro de la misma, que se calcifica y se reemplaza por hueso

inmaduro, que luego es remplazado por hueso maduro. Esta secuencia de diferenciación de los tejidos se sabe que es sensible al medio ambiente mecánico local en el tejido. Sin embargo, los mecanismos de mecano transducción no son bien entendidos.

El crecimiento, la adaptación, y remodelación de los tejidos son causados por los procesos activados en el interior del tejido. Estos procesos son ejecutados por células. Los procesos se involucran cambiando el tejido de un fenotipo a otro, o por reemplazar todo junto; de cualquier manera una nueva población de células se convierte en residente en el lugar donde la diferenciación ha ocurrido. En el sentido matemático, se considera un dominio lleno por tejidos biológicos como un reactivo continuo [80].

Un tipo de célula que es fundamental para este proceso es la célula madre. De acuerdo a Bianco y Robey [81], el concepto de célula madre se originó a principios del siglo XX. Los investigadores recientemente han intentado dilucidar lo que controla la diferenciación de la célula madre. Se ha sugerido que los estímulos químicos y mecánicos pudieran controlar la diferenciación de la célula madre en un esqueleto adulto (también llamadas células mesenquimales) en cualquier tejido fibroso conectivo, tejido del cartílago, hueso o tejido adiposo [82]. Muchos investigadores han intentado establecer una relación entre las fuerzas mecánicas de un tejido no diferenciado y el final fenotipo formado. Sin embargo, todos parten de la teoría de Pauwels [83].

En 1960, Pauwels propuso el primer marco teórico riguroso el cual los efectos de las fuerzas mecánicas sobre los caminos o rutas que un tejido sigue para diferenciarse ocurren con la deformación mecánica de los tejidos [83].

Pauwels, fue el primero que propuso un concepto basado en la presión hidrostática y deformación cortante octaédrica para relacionar la formación del tejido fibroso y formación del cartílago en la cura de la fractura. Este concepto fue desarrollado en una formulación matemática por Carter et al. (1988) [84], y extendido para incluir la formación del hueso en función de los mismos estímulos mecánicos. Después Claes & Heigele (1999) [73], han refinado este concepto para cuantificarlo y validarlo con análisis de elemento finito. Otro

concepto fue propuesto por Prendergast et al. (1997) [85], basado en esfuerzos cortantes hechos por la naturaleza bifásica de los tejidos: la fase sólida compuesta de colágeno y la fase fluida del líquido intersticial. Propusieron dos estímulos biofísicos: la deformación cortante octaédrica para la fase sólida y la velocidad de flujo para la fase del líquido intersticial.

En la fig. 23 se muestra el modelo de mecanoregulación propuesto por Prendergast et al. (1997) [85], y validado por Lacroix y Prendergast 2002 [86], este algoritmo se diseñó para el sanado de una fractura ósea, no para andamios, aún así se intenta relacionar los niveles de los estímulos en la superficie del andamio, comparándolos con este algoritmo. De acuerdo con este algoritmo, la diferenciación de las células madre depende de la magnitud de la velocidad del fluido y la deformación cortante octaédrica respecto del tiempo.

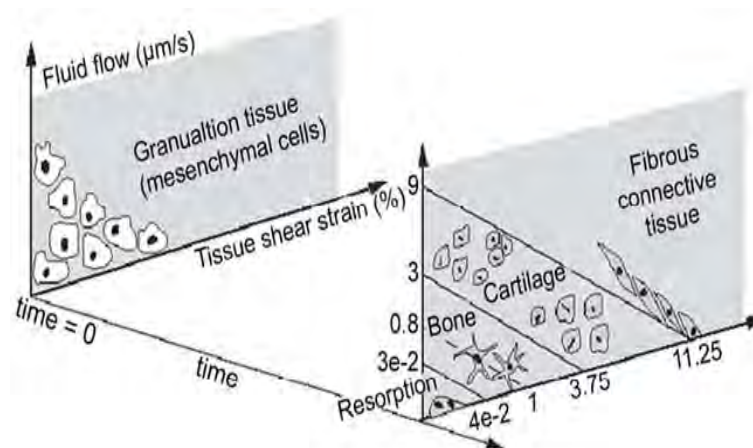


Figura 23. Diferenciación de las células madre dependiendo de la magnitud de la velocidad del fluido y la deformación cortante octaédrica. [85].

De acuerdo con el algoritmo de Lacroix y Prendergast 2002 [86], la diferenciación del tejido es función de las magnitudes de deformación octaédrica (γ) y velocidad del fluido (v) según la siguiente ecuación:

$$S = \frac{\gamma}{a} + \frac{v}{b} \quad (5.3)$$

Donde los valores de las constantes, $a = 0,0375\%$ y $b = 3\mu\text{ms}^{-1}$ son parámetros obtenidos experimentalmente.

El valor que se obtiene de S , da información sobre el tipo de tejido que se obtiene con el tiempo.

Hanna Isaksson et al. (2007) [87], simuló por separado los efectos de la deformación deviatorica, la presión hidrostática y la velocidad del fluido, optimizando un rango de valores para obtener el algoritmo de mecano-regulación. La deformación deviatorica se calcula basada en las deformaciones principales de acuerdo a la ec. 5.4, donde: y_0 es la deformación deviatorica, y ε es la deformación principal en las direcciones 1(x), 2(y) y 3(z).

$$y_0 = \frac{1}{3} \sqrt{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)^2 + (\varepsilon_2 - \varepsilon_3)^2 + (\varepsilon_3 - \varepsilon_1)^2} \quad (5.4)$$

Los límites para el algoritmo se muestran en la fig. 24. en la cual se establecen rangos para la reabsorción, hueso maduro, hueso inmaduro, cartilago y tejido conectivo.

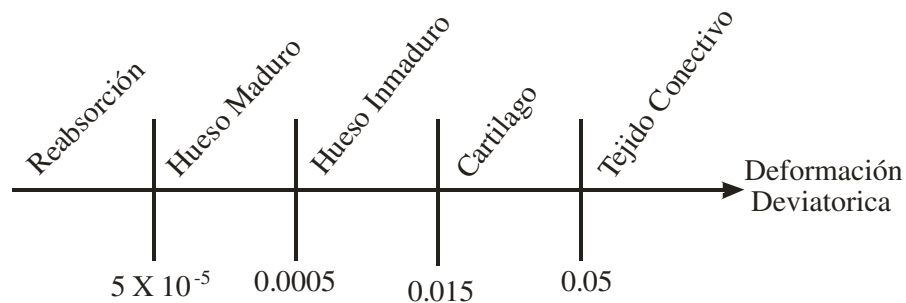


Figura 24. Rango de valores propuestos por Hanna Isaksson para la deformación deviatorica[87].

Para lograr esto, analizó y comprobó sus resultados con datos experimentales reportados por Bishop et al. (2006) [88], realizados *in vivo* en tibias de ovejas, a las cuales se les aplicaron cargas a torsión, tensión y compresión a diversos tiempos y se obtuvieron histologías cada 4 semanas para ver la evolución de la fractura ocasionada ex profeso. Después de haber

analizado los resultados de sus simulaciones y los datos experimentales validó su modelo. Por lo cual podemos asumir que el modelo propuesto es también válido para simular la formación de hueso en nuestros andamios.

6.4. Metodología

Para realizar el análisis de mecanoregulación en los andamios propuestos, se procedió a exportar con formato STL e importar en COMSOL Multiphysics, cada una de las geometrías de los giroides, donde se generó el mallado volumétrico (ver figura 25) que consistió de 34,013 elementos tetraédricos.

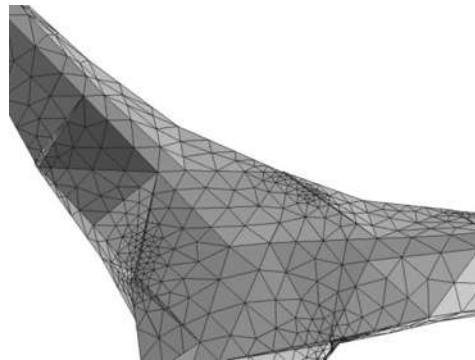


Figura 25. Detalle de la malla volumétrica

En la figura 26, se muestran las condiciones de contorno que se impusieron: un empotramiento en un extremo de la estructura del giroide, y un porcentaje de deformación de 0.33%, 0.5%, 2%, y 5%.

Para el análisis de elementos finitos se implementó en COMSOL, el modelo de mecanoregulación de Hanna Isaksson [87], que es un modelo mejorado de Damien Lacroix [86].

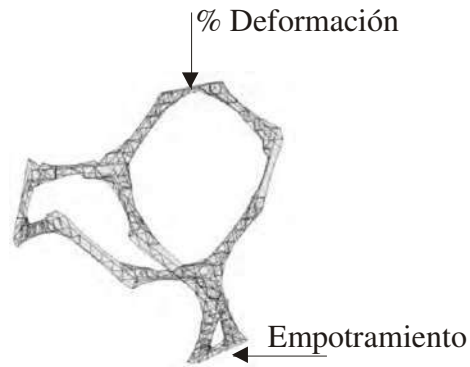


Figura 26. Condiciones de frontera.

6.5. Resultados

En esta sección se presentan ejemplos de análisis estructural para dos andamios D,L-PLA reportados por Olivares [20] con una porosidad de 70%, una velocidad de fluido de 0.1mm/s y una deformación impuesta de 0.5% (ver figura 27).

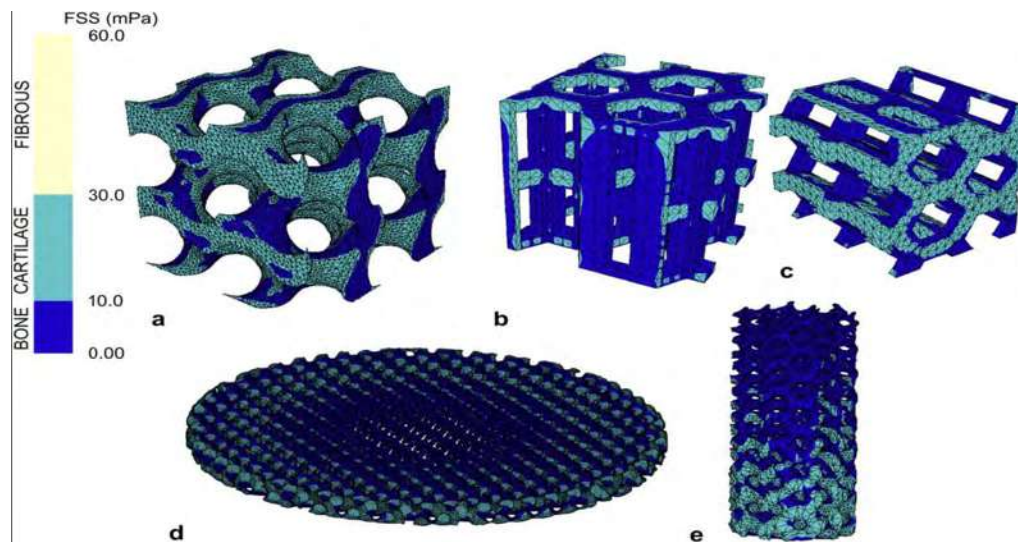


Figura 27. Mapa de colores de los estímulos de perfusión (0.1mm/s) en superficies de áreas: a) Gyroid_70, b) Hexag_70L, c) Hexag_70T, d) Gyroid_RG, e) Gyroid_LG. (Andy L. Olivares[20]).

En nuestro caso hemos considerado una porosidad de 99%, basándonos en el tamaño de poro óptimo para la formación de hueso, las mismas propiedades mecánicas del D,L-PLA y una deformación de 0.5% (ver figura 28).

Para el D,L-PLA se encontró que la mejor distribución para la formación de hueso maduro e inmaduro se presenta con una deformación del 0.5%. En la fig. 28, se muestra el comportamiento de la deformación deviatorica, con respecto al porcentaje de deformación. En la fig. 28a) se muestra la deformación total en la superficie del andamio, en la fig. 28b) se muestra el área donde habría reabsorción de acuerdo al rango obtenido por Hanna Isaksson [87] de $0-5 \times 10^{-5}$ mm, en la fig. 28c) se muestra el área donde habría formación de hueso maduro de acuerdo al rango obtenido por Hanna Isaksson [87] de $5 \times 10^{-5} - 0.0005$ mm, en la fig. 28d) se muestra el área donde habría formación de hueso inmaduro de acuerdo al rango obtenido por Hanna Isaksson [87] de $0.0005 - 0.015$ mm, en la fig. 28e) se muestra el área donde habría formación de cartílago de acuerdo al rango obtenido por Hanna Isaksson [87] de $0.015 - 0.05$ mm, en la fig. 28f) se muestra el área donde habría formación de tejido conectivo de acuerdo al rango obtenido por Hanna Isaksson [87] de 0.015 mm en adelante.

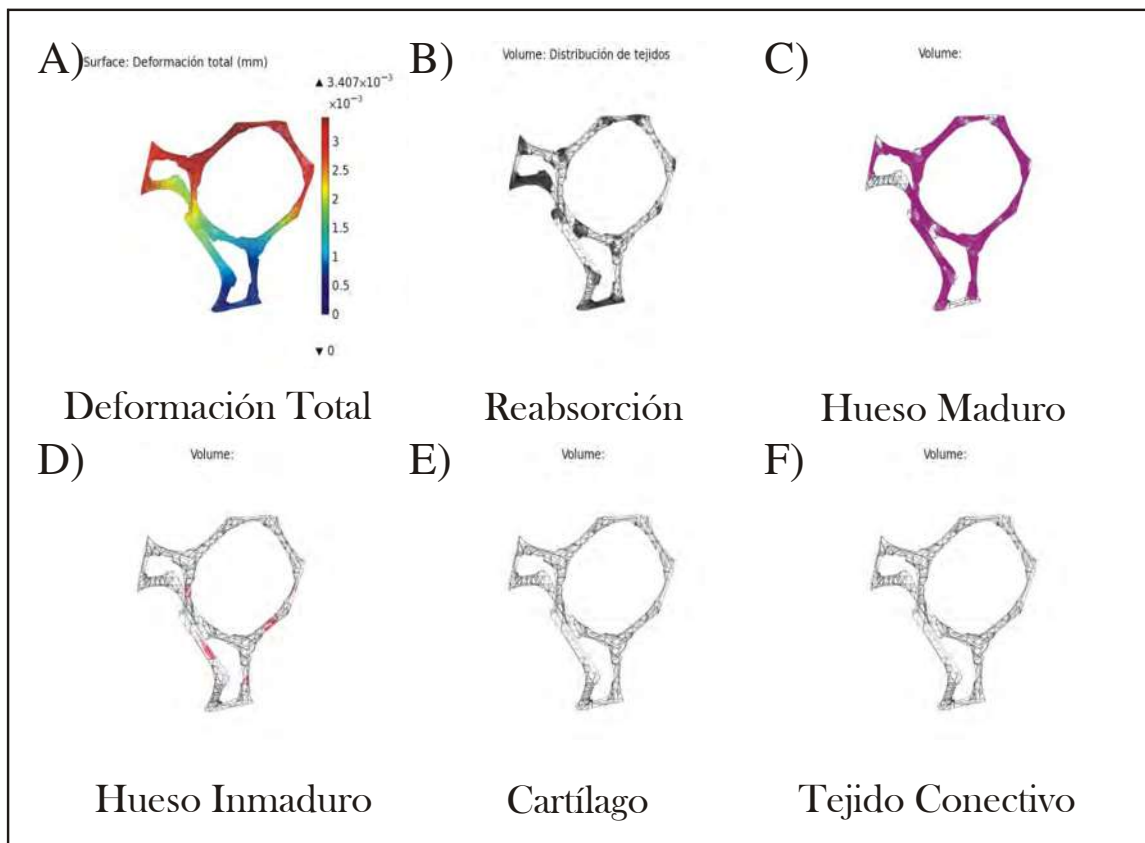


Figura 28. Mapa de colores y distribución de tejidos para un giroide con 99% de porosidad y deformación 0.5%

En dicha comparación de estudios se puede observar que se tiene congruencia en los resultados obtenidos en la presente tesis con los obtenidos por Olivares [71]. Andy Olivares [71] encuentra una distribución de hueso y cartílago para un giroide de 70% de porosidad, mientras que para el giroide de 99% de porosidad del presente estudio se muestra hueso en sus formas madura e inmadura, además de reabsorción. Cabe aclarar que la diferencia de porosidad puede influir en los resultados, así como también la diferencia en los modelos de mecanoregulación, es decir, que el modelo de Damien Lacroix [86] utilizado por Olivares [71] y el modelo de Hanna Isaksson [87] presentan diferencias en su implementación y la forma de distinguir los tejidos. Hanna Isaksson [87] distingue entre hueso maduro, hueso inmaduro y cartílago; en tanto que, Lacroix [86] únicamente lo hace para hueso y cartílago. No obstante podemos considerar que los resultados obtenidos son aceptables.

Capítulo 7 Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

Como conclusiones derivadas del presente trabajo de tesis, se pueden mencionar las siguientes:

- En el análisis de flujo en el bioreactor. Podemos observar que para la geometría 1 y 2 el máximo esfuerzo cortante obtenido fue de 0.087 y 0.08 Pa respectivamente, cuyos valores sobrepasan el límite reportado por Porter [3], quien declara que se asocia la muerte celular en un andamio, con un esfuerzo cortante de 5.7×10^{-2} Pa; por lo que podemos esperar que dichos bioreactores induzcan a la apoptosis, es decir a la muerte celular.
- El modelo de interacción fluido-estructura muestra que para valores de velocidad de fluido de 1 mm/s a 15 mm/s, la presión máxima es de 0.2669 Pa, valor muy por debajo al límite de 0.15 MPa para la formación de tejido óseo en la superficie de regeneración ósea propuesto por Claes y Heigele [73]. Debido a que los valores obtenidos en el presente estudio, no exceden este límite, se puede concluir que favorecerá la creación de tejido óseo.
- De los dos materiales, un polímero D,L-PLA con módulo de Young de 3.3 GPa y coeficiente de Poisson de 0.3; y un cerámico Hidroxiapatita con módulo de Young de 7 GPa y coeficiente de Poisson de 0.3, analizados con el modelo de mecanoregulación por deformación deviatorica, se observó que ambos materiales inducirían la formación de tejido óseo maduro e inmaduro al inducir una deformación del 0.5% a 2%.
- La mejor combinación de condiciones para la formación de hueso en el bioreactor propuesto son: Que el bioreactor tenga un diámetro mayor a 1 cm a la entrada, se induzca una deformación de entre 0.5% a 2% y la velocidad del fluido en los andamios esté comprendida entre 1 mm/s y 15 mm/s.

7.2. Recomendaciones y/o trabajos futuros

- Fabricar el bioreactor, y ponerlo en producción de tejidos óseos.
- Realizar una validación experimental, con micro-velocímetro por imágenes de partículas, para visualizar el flujo del medio de cultivo celular.
- Cultivar células osteoblásticas en los andamios propuestos para verificar su viabilidad y la expresión de marcadores específicos como la osteocalcina.
- Probar con diferentes geometrías.

Referencias

- [1] Hanna Isaksson, René van Donkelaar. Mechano-regulation by deviatoric strain and fluid flow predicts tissue differentiation during distraction osteogenesis. Technische universiteit Eindhoven.
- [2] Charles W Patruck Jr. (Ed. Pergamon) (1998). *Frontiers in Tissue Engineering*.
- [3] Porter B., Zael R., Stockman H., Guldberg R., Fyhrie D., 3-D computational modelong of media flow though scaffolds in a perfusion bioreactor, *Journal of biomechanincs*, 38 (2005), 543-549..
- [4] Lacroix, D; Villagomez, M; Planell, JA, Finite element study of regular scaffolds for bone tissue engineering, *Tissue engineering*, Volume: 13 Issue: 7, JUL 2007, 1633-1778
- [5] Lacroix D., Sandino C., Villagomez M., Ginebra M.P., Planell J.A., A micro-Finite Element analysis of fluidic and solid mechanical stimuli in bone tissue engineering scaffolds, *Journal of Biomechanics*, Volume 39, Supplement 1, 2006
- [6] Villagómez-Galindo M., Planell J.A., Lacorix D., Numerical Modelling of Porous Scaffolds of Well Defined Architecture for Bone Tissue Engineering - Septembrer 2007 21st European Conferene on Biomaterials, Brighton (UK)
- [7] C. Sandino, J. A. Planell, and D. Lacroix, A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering 41: 1005-1014, 2008
- [8] Lawrence, B. J., Devarapalli, M. and Madihally, S. V. (2009), Flow dynamics in bioreactors containing tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 102: 935–947.
- [9] Boschetti, F., Raimondi, M.T., Migliavacca ,F., & Dubini, G. Prediction of the micro-fluid dynamic environment imposed to three-dimensional engineered cell systems in bioreactors. *Journal of Biomechanics* **39**, 418-425 (2006).
- [10] M. Cioffi, F. Boschetti, M. T. Raimondi, and G. Dubini, Modeling Evaluation of the Fluid-Dynamic Microenvironment in Tissue-Engineered Constructs: A Micro-CT Based Model, *Biotechnology and Bioengineering*, 93(3): 500-510, 2005
- [11] Jungreuthmayer, C., Jaasma, M.J., Al-Munajjed, A.A., Zanghellini, J., Kelly, D.J., O'Brien, F.J., Deformation simulation of cells seeded on a collagen-GAG scaffold in a

- flow perfusion bioreactor using a sequential 3D CFD-elastostatics model., *Medical Engineering and Physics*, 31, 4, 2009, 420-427
- [12] Robert Lanza, Robert Langer, Joseph Vacanti.(Third Ed.) (2007). *Principles of Tissue Engineering*.
- [13] Joseph D. Bronzino (Ed. Taylor and Francis) (2006). *Tissue Engineering and Artificial Organs*.
- [14] John P. Fisher (Ed. Springer) (2006). *Tissue Engineering*.
- [15] Bianco,P., Riminucci,M., Gronthos,S., Robey,P.G., 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180-192.
- [16] Triffitt,J.T., 2002. Osteogenic stem cells and orthopedic engineering: summary and update. *J Biomed Mater Res* 63, 384-389.
- [17] Postacchini,F., Gumina,S., Perugia,D., De Martino,C. 1995. Early fracture callus in the diaphysis of human long bones. Histologic and ultrastructural study. *Clin Orthop Relat Res* 218-228.
- [18] Iwaki,A., Jingushi,S., Oda,Y., Izumi,T., Shida,J.I., Tsuneyoshi,M., Sugioka,Y., 1997. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res* 12, 96-102.
- [19] Gerstenfeld,L.C., Cullinane,D.M., Barnes,G.L., Graves,D.T., Einhorn,T.A., 2003b. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88, 873-884.
- [20] MacArthur,B.D., Please,C.P., Taylor,M., Oreffo,R.O.C., 2004. Mathematical modelling of skeletal repair. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 825-833.
- [21] Ashhurst,D.E., 1986. The influence of mechanical conditions on the healing of experimental fractures in the rabbit: a microscopical study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 313, 271-302.
- [22] Sandberg,M.M., Aro,H.T., Vuorio,E.I., 1993. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 292-312.
- [23] Baron, J. F., 1999. Blood substitutes. Haemoglobin therapeutics in clinical practice. *Crit Care* 3, R99-102.

- [24] Botchwey, E.A., Dupree, M.A., Pollack, S.R., Levine, E.M., Laurencin, C.T., 2003. Tissue engineered bone: measurement of nutrient transport in threedimensional matrices. *J. Biomed. Mater. Res. A* 67, 357–367.
- [25] Martin, I., Wendt, D., Heberer, M., 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 22, 80–86.
- [26] Cartmell, S.H., Porter, B.D., Garcia, A.J., Guldberg, R.E., 2003. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Eng.* 9, 1197–1203.
- [27] Freyria, A.M., Yang, Y., Chajra, H., Rousseau, C.F., Ronziere, M.C., Herbage, D., El Haj, A.J., 2005. Optimization of dynamic culture conditions: effects on biosynthetic activities of chondrocytes grown in collagen sponges. *Tissue Eng.* 11, 674–684.
- [28] Goldstein, A.S., Juarez, T.M., Helmke, C.D., Gustin, M.C., Mikos, A.G., 2001. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 22, 1279–1288.
- [29] Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., Mikos, A.G., 2002. Formation of threedimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 136–148.
- [30] Wendt, D., Stroebel, S., Jakob, M., John, G.T., Martin, I., 2006. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology* 43, 481–488.
- [31] Engbers-Buijtenhuijs, P., Buttafoco, L., Poot, A.A., Dijkstra, P.J., de Vos, R.A., Sterk, L.M., Geelkerken, R.H., Vermes, I., Feijen, J., 2006. Biological characterization of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials* 27, 2390–2397.
- [32] Jeong, S.I., Kwon, J.H., Lim, J.I., Cho, S.W., Jung, Y., Sung, W.J., Kim, S.H., Kim, Y.H., Lee, Y.M., Kim, B.S., Choi, C.Y., Kim, S.J., 2005. Mechanoactive tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds. *Biomaterials* 26, 1405–1411.
- [33] Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., Holtorf, H.L., Jansen, J.A., Mikos, A.G., 2003. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14683–14688.

- [34] Bancroft, G.N., Sikavitsas, V.I., van den Dolder, J., Sheffield, T.L., Ambrose, C.G., Jansen, J.A., Mikos, A.G., 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12600–12605.
- [35] Vance, J., Galley, S., Liu, D.F., Donahue, S.W., 2005. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. *Tissue Eng.* 11, 1832–1839.
- [36] Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N., Lemoine, J.J., Liebschner, M.A., Dauner, M., Mikos, A.G., 2005. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann. Biomed. Eng.* 33, 63–70.
- [37] Wendt, D., Marsano, A., Jakob, M., Heberer, M., Martin, I., 2003. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 205–214.
- [38] Jacobs, C.R., Yellowley, C.E., Davis, B.R., Zhou, Z., Cimbala, J.M., Donahue, H.J., 1998. Differential effect of steady versus oscillatory flow on bone cells. *J. Biomech.* 31, 969–976.
- [39] Vance, J., Galley, S., Liu, D.F., Donahue, S.W., 2005. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. *Tissue Eng.* 11, 1832–1839.
- [40] Gregory N. Bancroft, M.D., Vassilios I. Sikavitsas, and Antonios G. Mikos, Design of a Flow Perfusion Bioreactor System for Bone Tissue-Engineering Volume 9 Number 3, (2003), 549-554.
- [41] Michael J. Jaasma, Niamh A. Plunkett, Fergal J. O'Brien, Design and validation of a dynamic flow perfusion bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds, *Journal of biomechanics*, 133 (2008), 490-496.
- [42] Bancroft, G.N., Sikavitsas, V.I., Mikos, A.G., 2003. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng.* 9, 549–554.
- [43] Michael J. Jaasma, Niamh A. Plunkett, Fergal J. O'Brien. Design and validation of a dynamic flow perfusión bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds. *Journal of biotechnology*.

- [44] Yoshito Ikada, (First Edition), (2006). Tissue Engineering: Fundamentals and Application.
- [45] Jennifer H. Lee, John Kisiday and Alan J. Grodzinsky. Novartis Foundation Symposium 249. 2006. Tissue Engineering of Cartilage and Bone.
- [46] Buckwalter A, Glimcher MJ, Cooper R, Recker R. 1996. Bone biology. Journal of Bone Joint Surgery 77A:1256-1289.
- [47] Marks SC, Hermey DC. 1996. The structure and development of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press.
- [48] Beresford JN, Owen ME, editors. 1998. Marrow stromal cell culture. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 153 p.
- [49] Rose FRAJ, Oreffo ROC. 2002. Bone tissue engineering: Hope vs hype. Biochemical and Biophysical Communications 292:1-7.
- [50] Yang S, Leong K-F, Du Z, Chua C-K. 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Engineering 7(6):679-689.
- [51] Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH, Nuber GW, Glorieux FH, Travers R, Sprague SM. 1999. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. Tissue Engineering 5(1):35-51.
- [52] Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang LH, Langer R. 1991. Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic Glycolic Acid) Microspheres. Pharmaceutical Research 8(6):713-720.
- [53] Klawitter JJ, Hulbert SF. 1971. Application of porous ceramics for the attachment of load-bearing internal orthopedic applications. Journal of Biomedical Materials Research Symp 2:161.
- [54] Hulbert SF, Young F, Matthews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. 1970. The potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. Journal of Biomedical Materials Research 4:433-456.
- [55] Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. 2000. Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period. Journal of Biomedical Materials Research 51(3):376-382.

- [56] Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. 1996. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17(2):137-146.
- [57] Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. 1999. Implant surface characteristics modulate differentiation behaviour of cells in the osteoblastic lineage. *Advances in Dental Research* 13:38-48.
- [58] Schwartz Z, Lohmann CH, Sisk M, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. 2001. Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH)₂D-3 is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. *Biomaterials* 22(7):731-741.
- [59] Sun, W. & Lal, P. 2002 Recent development on computer aided tissue engineering a review. *Comput. Methods Prog. Biomed.* 67, 85–103.
- [60] Sun, W., Darling, A., Starly, B. & Nam, J. 2004a Computer aided tissue engineering: overview, scope and challenges. *J. Biotechnol. Appl. Biomech.* 39, 29–47.
- [61] Sun, W., Starly, B., Darling, A. & Gomez, C. 2004b Computer aided tissue engineering: biomimetic modelling and design of tissue engineering. *J. Biotechnol. Appl. Biomech.* 39, 49–58.
- [62] Hollister, S. J. 2005 Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* 4, 518–524.
- [63] Adachi, T., Osako, Y., Tanaka, M., Hojo, M. & Hollister, S. J. 2006 Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials* 27, 3964–3972.
- [64] Ruggero Gabbrielli. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. 2009. Foam geometry and structural design of porous material.
- [65] Available at <http://gts.sourceforge.net>, mar 2008.
- [66] Y. Wang. Periodic surface modeling for computer aided nano designs. *Journal of Materials Chemistry*, 39:179-189, 2007.
- [67] H. A. Schwarz. *Gesammelte Mathematische Abhandlungen*. Springer Verlag, Berlin (Reprinted by Chelsea Publishing Company, 1972, 1890).
- [68] A. H. Schoen. In_nite periodic minimal-surfaces without self-intersections. NASA Technical Note, D-5541:1-70, 1970.

- [69] Y. Wang. Periodic surface modeling for computer aided nano designs. *Journal of Materials Chemistry*, 39:179-189, 2007.
- [70] S. Rajagopalan and R. A. Robb. Schwarz meets schwann: design and fabrication of biomorphic and durataxic tissue engineering scaffolds. *Medical Image Analysis*, 10:693-712, 2006.
- [71] Andy L. Olivares, 2009, Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering
- [72] COMSOL Multiphysics® User guide, 2010, COMSOL AB.
- [73] Claes, L. E., and Heigele, C. A. (1999): 'Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing', *J. Biomech.*, 32, pp. 255-266.
- [74] Hanna Elisabet Isaksson, 2007. Mechanical and mechanobiological influences on bone fracture repair.
- [75] Roux, W. 1881. *Der Kampf der Teile im Organismus*. Engelmann, Leipzig.
- [76] Brekelmans, W.A., Poort, H.W., Slooff, T.J., 1972. A new method to analyse the mechanical behaviour of skeletal parts. *Acta Orthop Scand* 43, 301-317.
- [77] Huiskes, R., Chao, E. Y., 1983. A survey of finite element analysis in orthopedic biomechanics: the first decade. *J Biomech* 16, 385-409.
- [78] Huiskes, R., Hollister, S. J., 1993. From structure to process, from organ to cell: recent developments of FE-analysis in orthopaedic biomechanics. *J Biomech Eng* 115, 520-527.
- [79] Prendergast, P. J., 1997. Finite element models in tissue mechanics and orthopaedic implant design. *Clin Biomech (Bristol , Avon)* 12, 343-366.
- [80] M. Cerrolaza, M. Doblaré, G. Martínez, B. Calvo. Imperial College Press. 2004. *Computational Bioengineering*.
- [81] Bianco P., Robey P.G., Stem cell in tissue engineering. *Nature* 414 (2001) pp.118-212.
- [82] Caplan A.I., The mesengenic process. *Clin. Plast. Surg.* 21 (1994) pp. 429-435.
- [83] Pauwels, F., 1960. [A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure]. *Z Anat Entwicklungsgesch* 121, 478-515.

- [84] Carter, D. R., Blenman, P. R., and Beaupré, G. S. (1988): 'Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing', *J Orthop. Res.*, 6, pp. 736-748.
- [85] Prendergast, E J., Huiskes, R., and Soballe, K. (1997): 'Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces', *J. Biomech.*, 3D, pp. 539-548.
- [86] Lacroix, D., Prendergast, P. J., 2002. A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading. *J Biomech* 35, 1163-1171.
- [87] Hanna Elisabet Isaksson, 2007. Mechanical and mechanobiological influences on bone fracture repair.
- [88] Bishop, N. E., Van Rhijn, M., Tami, I., Corveleijn, R., Schneider, E., Ito, K., 2006. Shear does not necessarily inhibit bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 443, 307-314.