



## Trabajo Fin de Máster

Evaluación de propiedades mecánicas de un andamio estructural de ácido poli-L-láctico (PLLA) en entorno dinámico.

Autor

Alejandro Duizabo Ingalaturre

Director: Ignacio Ochoa Garrido

Co-Director: Víctor Andrés Acosta Santamaría

PONENTE: José Manuel García Aznar

Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón  
Escuela de Ingeniería y Arquitectura  
Universidad de Zaragoza

Febrero de 2013



*A mi familia.*



## *Agradecimientos.*

*Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a los Doctores Ignacio Ochoa Garrido, Víctor Andrés Acosta Santamaría y José Manuel García Aznar, directores de este Trabajo fin de Máster, por su apoyo científico, por su experiencia transmitida, por sus consejos y aportaciones en la ejecución de este trabajo, y sobre todo por el interés, disponibilidad, ayuda y paciencia que han mostrado en todo momento.*

*A los equipos de trabajo del Centro de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos de la Universidad Politécnica de Valencia (CBIT), del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Royo Villanova de Zaragoza.*

*A los que me apoyaron a lo largo del proyecto, Carlos Marzo M., Aitor Sanesteban G., José Ángel Pardo G., Ricardo Ríos J., José Ignacio Peña T. y Fernando Usón J.*

*A los amigos y a los compañeros del área de Ingeniería Biomédica, Rosa, Daniel, Alejandro, Guillermo, Chema, José Luis, Alberto, Diana, Rebeca, Carol, Clara, Nieves, Sara y Jamal.*

*A mis amigos, y a mi familia.*

*A todos, muchas gracias.*

*Alejandro Duizabo Ingalaturre*

*Zaragoza, Febrero de 2013*



# Resumen.

La degradación del cartílago articular, principal síndrome de la artrosis, es una causa muy común de dolor y discapacidad en la población activa y jubilada. Al día de hoy no existen recursos eficaces para evitar esta enfermedad ni métodos para detener su empeoramiento [1]. Por estos motivos, la Ciencia de Materiales junto a la *Ingeniería de Tejidos* proponen una estrategia basada en la regeneración del cartílago articular a través de sustitutos fabricados con biomateriales que proporcionan a las células un entorno mecánicamente estable y estimulante para favorecer la regeneración del tejido [2].

Varios estudios han demostrado la eficacia del ácido poli-L-láctico (**PLLA**) como biomaterial para la fabricación de estructuras tridimensionales (andamios) destinadas a la *Ingeniería Tisular* del cartílago [3, 4, 17], pero sus propiedades mecánicas y estructurales se han caracterizado principalmente en entornos estáticos. Para obtener productos que respondan de manera adecuada a las solicitudes mecánicas de la articulación, particularmente de rodilla, es necesario estudiar en profundidad las propiedades mecánicas de este biomaterial en entornos que simulen el comportamiento fisiológico de actuación.

En este proyecto, se propone estudiar la evolución de las propiedades mecánicas de un andamio estructural de **PLLA** en entornos dinámicos de flujo y de deformación a través de experimentaciones diseñadas y realizadas a propósito. Se evalúa la permeabilidad y los cambios estructurales del andamio de **PLLA** sometido a deformaciones compresivas tanto escalonadas como dinámicas, y se estudia el comportamiento de la permeabilidad de la estructura sometida a una degradación bajo flujo. Los resultados obtenidos demuestran que la arquitectura del andamio, inicialmente heterogénea, se homogeneiza al aplicarle una deformación de forma graduada, lo que se refleja en la conducta de su permeabilidad que disminuye hasta que las trabéculas se colapsen. En cambio, cuando se somete el andamio a deformaciones cíclicas de fatiga, su permeabilidad aumenta en acorde con la amplitud de deformación, y su arquitectura tiende a redistribuirse frente al colapso de las trabéculas delgadas y se vuelve más heterogénea. El análisis de la degradación dinámica bajo flujo no pudo interpretarse debido a la contaminación fúngica de las muestras durante la experimentación.



# Índice general.

<b>I Memoria .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>17</b>
1.1. Objetivos .....	19
1.2. Metodología .....	19
1.3. Subíndice - descripción del trabajo .....	20
<b>2. Comportamiento de la permeabilidad del andamio de PLLA bajo gradientes de deformación .....</b>	<b>21</b>
2.1. Permeabilidad .....	21
2.2. Materiales y métodos .....	22
2.2.1. Ensayo de permeabilidad .....	22
2.2.2. Análisis de la macro-estructura .....	27
2.3. Resultados y discusiones .....	29
2.3.1. Permeabilidad .....	29
2.3.2. Macro-estructura .....	31
2.4. Conclusiones y trabajos futuros .....	32
<b>3. Comportamiento de la permeabilidad del andamio de PLLA durante un proceso de degradación bajo flujo continuo .....</b>	<b>33</b>
3.1. Degradación del PLLA .....	33
3.2. Materiales y métodos .....	35
3.2.1. Preparación de las muestras .....	35
3.2.2. Protocolo experimental .....	36
3.2.3. Ensayo de permeabilidad .....	36
3.3. Resultados y discusiones .....	37
3.4. Conclusiones .....	39

<b>4. Comportamiento del andamio de PLLA bajo deformaciones dinámicas .....</b>	<b>41</b>
4.1. Materiales y métodos .....	41
4.1.1. Preparación de las muestras .....	42
4.1.2. Ensayo de permeabilidad .....	42
4.1.3. Protocolo experimental .....	43
4.2. Resultados y discusiones .....	46
4.2.1. Deformación dinámica .....	46
4.2.2. Permeabilidad .....	50
4.3. Conclusiones .....	51
<b>5. Conclusiones y trabajos futuros .....</b>	<b>53</b>
5.1. Conclusiones .....	53
5.2. Trabajos futuros .....	54
<b>Bibliografía .....</b>	<b>55</b>
<b>II Anexos .....</b>	<b>57</b>
<b>A. Proceso de síntesis de los andamios de PLLA .....</b>	<b>59</b>
<b>B. Diseño de discos porosos para los ensayos de permeabilidad .....</b>	<b>61</b>
<b>C. Presentación de los sistemas BOSE-ElectroForce® BioDynamic .....</b>	<b>63</b>
<b>D. Resumen de las prácticas del Trabajo Fin de Máster .....</b>	<b>67</b>
<b>E. Trabajos complementarios .....</b>	<b>69</b>

# Índice de tablas y figuras.

- Figura 1.1: *Andamios estructurales de ácido poli-L-láctico (PLLA)*. Pág.20
- Figura 2.1: *Cámara EBERS® P3D-6, discos porosos y montaje con un andamio de PLLA*. Pág.23
- Figura 2.2: *Disco poroso inferior, andamio de PLLA, y disco superior*. Pág.25
- Figura 2.3: *Puntos de referencia para medir la deformación del andamio*. Pág.25
- Figura 2.4: *Esquema y montaje del sistema de medición para ensayos de permeabilidad de andamios de PLLA*. Pág.25
- Figura 2.5: *Micro-tomografía realizada a un andamio de PLLA en la que se detalla la distribución y la homogeneidad de los macro-poros por unidad de volumen*. Pág.27
- Figura 2.6: *Evolución de la permeabilidad en función del grado de deformación del andamio de PLLA*. Pág.30
- Figura 2.7: *Evolución de la presión diferencial en función del grado de deformación del andamio de PLLA*. Pág.30
- Figura 2.8: *Imágenes DICOM transversales de la macro-estructura del andamio de PLLA sin deformar, y comprimido al 40%*. Pág.31
- Figura 2.9: *Evolución de la porosidad del andamio de PLLA sometido a gradientes de deformación*. Pág.31
- Figura 3.1: *Gráfica ilustrando la interdependencia entre la pérdida de peso molecular y la disminución de la masa de un andamio estructural tridimensional frente al tiempo en la ingeniería de tejido de cartílago*. Pág.34
- Figura 3.2: *Montaje del circuito de degradación de los andamios de PLLA bajo flujo continuo*. Pág.37
- Figura 3.3: *Evolución de la permeabilidad del andamio de PLLA contaminado en función del tiempo de degradación bajo flujo de PBS*. Pág.37
- Figura 4.1: *Pistón de compresión y cámara BioDynamic ensamblada*. Pág.44
- Figura 4.2: *Andamio de PLLA alojado entre los pistones de compresión dentro de una cámara BioDynamic*. Pág.44

Figura 4.3: *Cámara instalada en el dispositivo BioDynamic 5210, con un andamio de PLLA inmerso en su interior.* Pág.44

Figura 4.4: *Curvas representativas de la tensión soportada por el andamio de PLLA frente a deformaciones cíclicas del 2%, 5% y 10% respecto a su espesor inicial.* Pág.47

Figura 4.5: *Gráfica de la tensión máxima para cada amplitud de deformación dinámica.* Pág.48

Figura 4.6: *Gráfica de la deformación acumulada para cada amplitud de deformación dinámica.* Pág.49

Figura 4.7: *Imagen por Microscopía Electrónica de Barrido y micro-tomografía de un andamio estructural de PLLA.* Pág.50

Figura 4.8: *Permeabilidad del andamio de PLLA para cada amplitud de deformación dinámica aplicada durante 200 000 ciclos.* Pág.51

Figura 4.9: *Presión diferencial para cada amplitud de deformación dinámica aplicada al andamio de PLLA durante 200 000 ciclos.* Pág.51

Figura A.1: *Diagrama de una molécula de ácido poli-L-láctico (PLLA).* Pág.59

Figura A.2: *Diagrama de una molécula de dioxano 1-4.* Pág.60

Figura B.1: *Representación tridimensional de un disco poroso, y discos porosos fabricados por prototipado rápido.* Pág.61

Figura C.1: *Sistema Biodynamic 5210 multi-espécimen, y sistema generador de pulso fluídico.* Pág.64

Figura C.2: *Sistema Biodynamic 5170 mono-espécimen con micrómetro de láser.* Pág.64

Figura E.1: *Diseño tridimensional de los componentes del gradient maker, y piezas fabricadas por prototipado rápido, ensambladas.* Pág.70

Tabla 1: *Resultados de  $\Delta P$  y de  $k$  para los andamios de PLLA sometidos a gradientes de deformación.* Pág.29

Tabla 2: *Resultados de  $\Delta P$  y de  $k$  para los andamios de PLLA sometidos a gradientes de deformación.* Pág.38

Tabla 3: *Resultados de la tensión máxima para cada amplitud de deformación dinámica y número de ciclos.* Pág.48

Tabla 4: *Resultados de la deformación acumulada para cada amplitud de deformación dinámica y número de ciclos* Pág.49

Tabla 5: *Resultados de  $\Delta P$  y de  $k$  para los andamios de PLLA sometidos a deformaciones dinámicas durante 200 000 ciclos.* Pág.51





## **Parte I**

### **Memoria**



# Capítulo 1

## Introducción.

El uso de materiales en aplicaciones y tratamientos médicos como substitutos de componentes biológicos se remonta a épocas históricas muy antiguas. Ya en la civilización Egipcia se tienen referentes arqueológicos de momias con prótesis implantadas, o en las civilizaciones Romana y Griega indicios del uso de diversos metales para tratamientos particulares. A mediados del siglo XX, finalizada la Segunda Guerra Mundial, la necesidad de generar tratamientos masivos para diversos procesos biomédicos promueve una gran evolución en diversas áreas del conocimiento, y dentro del mismo, la profundización en la ciencia e ingeniería de los biomateriales.

A lo largo del tiempo la definición de *biomaterial* ha adoptado diversos cambios, paralelos al desarrollo que se ha logrado generar en el área. Actualmente el término *biomaterial* designa a aquellos materiales farmacológicamente inertes, utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con los sistemas biológicos, incorporados o implantados para reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y sus funciones [5]. En el desarrollo y avances de los biomateriales se pueden catalogar tres grandes generaciones. La primera generación tenía como objetivo encontrar materiales inertes con propiedades similares a las del tejido a reemplazar, pero debido a la presencia de lesiones provocadas por los implantes, la segunda generación florece con la prioridad de inducir una reacción controlada por parte del tejido vivo, es decir, materiales bioactivos y biodegradables. Actualmente se desarrollan e investigan los de la tercera generación, centrados en la autorregeneración del tejido mediante estímulos a nivel celular y molecular [6]. Para ello se utilizan los materiales de la segunda generación, o híbridos orgánicos e inorgánicos.

Muchos de los dispositivos biomédicos son fabricados con materiales poliméricos, debido a la gran cantidad de formulaciones y a la versatilidad de aplicaciones que este material otorga, desde el diseño de sistemas de liberación de fármacos, en dispositivos para la fijación de fracturas, estructuras tridimensionales que sirven como soporte de células vivas, y en el remplazo de tejidos ya sean duros o blandos [7]. Esas dos últimas utilidades se investigan y se desarrollan dentro de un campo de la biomedicina conocido como *Ingeniería de Tejidos*. Esta disciplina se compone principalmente por tres factores: matriz extracelular (**ECM**), células y estímulos. En sí, la **ECM** proporciona un soporte mecánico para las células y al mismo tiempo actúa como un conductor de señales mecánicas y bioquímicas, como por ejemplo los factores de crecimiento.

Una de las grandes líneas de investigación en *Ingeniería de Tejidos* se dedica a la regeneración del cartílago articular. Este tejido tiene funciones específicas tales como la de disminuir la fricción entre las superficies articulares en contacto y proteger el hueso subyacente de los requerimientos mecánicos. Su estructura uniforme, densa y con ausencia de vasos sanguíneos, linfáticos e inervación le otorga las propiedades mecánicas para cumplir con su cargo, pero en contrapartida posee una limitada capacidad de reparación debido a su falta de irrigación [8,9]. Por ello, una lesión del cartílago articular puede extenderse progresivamente y llegar a provocar cambios en la estructura y morfología del tejido hasta la pérdida de sus características mecánicas y la degeneración del mismo, que son los síndromes principales de la artrosis [10].

En este contexto, la Ciencia de Materiales y las técnicas de *Ingeniería Tisular* ofrecen alternativas para la regeneración del cartílago articular (*Musgrave et al.*, 2002), evitando la sustitución de la articulación. Una de las estrategias se basa en el desarrollo de implantes de condrocitos, células fundamentales del cartílago, en el interior de matrices tridimensionales habitualmente constituidas por biomateriales de tercera generación, que actúan como andamiaje (o andamio, scaffold en inglés) [11, 12]. El papel del andamio es ofrecer a las células un soporte viable y favorable a su adhesión, proliferación y diferenciación, proporcionándoles un ambiente mecánico adecuado [13], y conservando los factores bioquímicos de su entorno a través de la difusión de nutrientes del medio biológico y de la evacuación de los productos de desecho metabólicos [14]. Por estas razones, el material empleado para tales estructuras debe ser biocompatible, tener una alta porosidad interconectada, además de presentar unas propiedades mecánicas semejantes a las del cartílago articular (como la rigidez o la permeabilidad), y una degradabilidad progresiva coordinada con la cinética de formación del tejido permitiendo mantener las propiedades mecánicas del mismo.

El ácido poli-L-láctico (**PLLA**), polímero termoplástico de la familia de los poliésteres, demostró ser un biomaterial que reúne las características necesarias para su uso apropiado en la ingeniería tisular de cartílago [15]. Su biodegradación por hidrólisis dentro del cuerpo humano genera como producto el ácido láctico, un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos del organismo. Además, sus excelentes propiedades químicas, físicas y mecánicas, combinadas con una porosidad controlada a través de un proceso de síntesis adecuado, permiten diseñar y fabricar un andamio estructural óptimo como implante en la regeneración del cartílago articular.

El estudio realizado por *Acosta Santamaría V.A.* [17] expone la caracterización de las propiedades mecánicas y estructurales de un andamio de **PLLA**, en condiciones estáticas de deformación y degradabilidad en inmersión. El autor determina algunos factores críticos para el diseño y el uso adecuado de un andamio destinado a la regeneración del cartílago articular. Sin embargo, las condiciones estáticas limitan la definición de tales factores, y la exposición de un listado más amplio y preciso requiere caracterizar el andamio estructural bajo condiciones dinámicas, homólogas al entorno fisiológico de su futuro uso *in vitro* e *in vivo*.

## 1.1. Objetivos.

El presente trabajo, de carácter predominante hacia la experimentación, trata de ampliar y profundizar el estudio sobre la caracterización mecánica de andamios estructurales de **PLLA**. Para ello, el objetivo planteado es caracterizar las propiedades mecánicas de arquitecturas tridimensionales de **PLLA** bajo condiciones dinámicas de flujo y de deformación.

Para cumplir con el objetivo principal, se definen los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la evolución de la arquitectura tridimensional de **PLLA** frente a gradientes de deformación, analizando el comportamiento de la macro-estructura trabecular, la porosidad y la permeabilidad en cada estado de deformación.
- Estudiar experimentalmente la evolución temporal de la permeabilidad del andamio en un entorno de degradación sometido a flujo.
- Evaluar el comportamiento de las propiedades mecánicas del andamio sometido a compresiones dinámicas de fatiga.

## 1.2. Metodología.

El estudio desarrollado dentro del marco de este trabajo pretende evaluar las propiedades mecánicas de un andamio estructural de **PLLA**, destinado a la regeneración de cartílago articular, cuando el mismo se encuentra en entornos dinámicos de degradación inducidos por flujo, y por fatiga debida a compresiones cíclicas.

Se plantea una metodología experimental para determinar la permeabilidad del andamio, sometido a gradientes de deformación del 10, 20 30 y 40% de su espesor inicial, a partir de la medición de la presión generada en su interior por el paso de una corriente fluidica. Paralelamente, se efectúan micro-tomografías para cada estado deformado con la intención de valorar la evolución de la macro-estructura del andamio y de su porosidad.

Con un estudio en condiciones dinámicas de degradación, simulando un entorno de cultivo celular in vitro y con caudales de flujo controlados (1,5 y 3 mL/min), se evalúan en función del tiempo las características mecánicas del andamio (0, 3, 7, 14 y 21 días).

Finalmente, se propone analizar el comportamiento del andamio inmerso y sometido a deformaciones cíclicas, a través de un ensayo de fatiga con control en deformación. Se pretende simular con estas condiciones un entorno dinámico de cultivo celular, en el cual las propiedades mecánicas del andamio desempeñan un papel clave en la diferenciación de los condrocitos.

Las fases experimentales se efectúan sobre andamios tridimensionales de **PLLA** (Figura 1.1) fabricados y generosamente suministrados por el *Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular* (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia. El protocolo de síntesis y de manufactura de los andamios de **PLLA** se describe en el Anexo A.

### 1.3. Subíndice - descripción del trabajo.

El presente documento consta de 4 capítulos principales, los cuales se detallan a continuación:

El capítulo 2 presenta la descripción de la permeabilidad como factor de caracterización de un andamio, explicando la relevancia de esta característica en la regeneración del tejido articular. Se detalla el planteamiento y la realización del protocolo experimental que permite determinar los cambios en la permeabilidad del andamio de **PLLA** frente a un gradiente de deformación impuesta, además de la evolución de su macro-estructura mediante el análisis de micro-tomografías realizadas en cada etapa de su deformación. A partir de estos resultados, se realiza una reconstrucción tridimensional del andamio que permite evaluar el comportamiento de la porosidad de la estructura.

En el capítulo 3 se justifica la importancia de la degradación del andamio de **PLLA** y su implicación en la *Ingeniería Tisular*. Se establece un protocolo experimental para estudiar la evolución de las propiedades mecánicas de la estructura tridimensional durante un proceso de degradación dinámica bajo un flujo continuo.

El capítulo 4 describe la metodología experimental desarrollada para estudiar y analizar el comportamiento de las propiedades mecánicas del andamio en condiciones de deformación dinámica. El protocolo se basa en un ensayo de fatiga controlando la deformación de las muestras. De esta forma se analiza la influencia de diferentes amplitudes de deformación sobre la conducta del andamio.

Finalmente, en el capítulo 5 se presentan las conclusiones generales del trabajo, las aportaciones más relevantes en el estado del arte, para finalizar con una breve descripción de las líneas de trabajo futuro.



Figura 1.1: Andamios estructurales de ácido poli-L-láctico (**PLLA**).

## Capítulo 2

### Comportamiento de la permeabilidad del andamio de *PLLA* bajo gradientes de deformación.

Una de las propiedades clave para un andamio destinado a la *Ingeniería Tisular* y aplicado en la regeneración del cartílago articular es su permeabilidad. Dado que el cartílago articular está fisiológicamente sometido a demandas mecánicas, es importante conocer la influencia de la deformación de la estructura del andamio sobre este parámetro. Un conocimiento exhaustivo de estos fenómenos nos permitirá evaluar y asegurar el correcto intercambio de nutrientes y residuos metabólicos de las células alojadas dentro de la estructura, de tal modo que las mismas puedan proliferar bajo estímulos mecánicos y así mismo logren regenerar el tejido con las propiedades mecánicas adecuadas.

A continuación se presentan y analizan los resultados obtenidos experimentalmente y realizados con el objetivo de estudiar la permeabilidad del andamio (**PLLA**), sometido a diferentes gradientes de deformación mediante un protocolo experimental diseñado y optimizado. Adicionalmente, se estudia la arquitectura del biomaterial mediante micro-tomografías con el objetivo de determinar la evolución del tamaño de poro y su porosidad, frente a una deformación impuesta.

Estos resultados permitirán comprender el comportamiento de estos índices mecánicos del andamio frente a un gradiente de deformación aplicado, y establecer la coherencia de estas tendencias con los resultados obtenidos por otros autores [17].

#### 2.1. Permeabilidad.

La permeabilidad es una variable estructural asociada al porcentaje de porosidad y que permite establecer la resistencia que tiene un material poroso al paso de un fluido (líquido o gaseoso) por su interior sin alterar su estructura interna. Para una aplicación adecuada en la *Ingeniería Tisular*, un andamio estructural debe presentar una porosidad interconectada [16, 18-20] que permita tanto la difusión del medio que provee los

nutrientes a las células, como la evacuación de los residuos metabólicos. Además, la interconexión entre poros facilita la migración de las células en el interior del andamio [19, 21-24].

Para determinar la relación entre la porosidad y la interconectividad de la estructura, el grupo GEMM implementó un ensayo de permeabilidad fundamentado bajo la *ley de Darcy* [21, 22, 25, 26] (ver Ec. 1).

Esta formulación es una función de las propiedades del medio poroso y del fluido que lo atraviesa. De hecho, es intuitivo pensar que un fluido muy viscoso se desplazará a una tasa menor que el agua por el interior de un mismo tipo de material poroso. Por esta razón, la descarga es inversamente proporcional a la viscosidad dinámica del fluido  $\mu$ . En un andamio estructural la permeabilidad intrínseca  $k$  es una función del tamaño de los poros. Así, conforme más pequeño es el tamaño de los poros más grande es el área superficial trabecular en contacto con el fluido. Este aumento en el área superficial ocasiona un incremento en la resistencia por fricción al flujo e induce que la  $k$  disminuye.

$$k = \frac{\mu L}{A} \frac{Q}{\Delta P} \quad (1)$$

donde  $\mu$  es la viscosidad dinámica del fluido que atraviesa el andamio,  $L$  el espesor de la muestra,  $A$  su área transversal,  $Q$  el caudal volumétrico y  $\Delta P$  la diferencia de presión generada a través de la muestra.

Se puede calcular la  $k$  de un andamio poroso, conocidas sus dimensiones y midiendo la presión diferencial generada al pasar un flujo determinado a través de él.

## 2.2. Materiales y métodos.

### 2.2.1. Ensayo de permeabilidad.

Para llevar a cabo el ensayo experimental de permeabilidad bajo diferentes gradientes de deformación, se hizo uso de los siguientes insumos:

- 5 muestras cilíndricas de andamios estructurales porosos de **PLLA**, con diámetros de 6 a 6,5 mm y espesores de 5,2 a 5,5 mm.
- 2 cámaras para cultivo celular EBERS® P3D-6.
- 4 discos porosos diseñados especialmente para el ensayo (2 para cada cámara P3D-6). Se presenta el diseño en el Anexo B.
- Una bomba peristáltica Watson Marlow® 323 sciQ.
- Tubos Tygon® con diámetro interno de 3,2 mm.
- 2 conectores-válvulas de tres vías.
- Un amortiguador de pulso.
- Un frasco de 250 mL con agua destilada (cuya viscosidad es  $\mu = 10^{-3}$  Pa·s).
- Un manómetro diferencial (Testo®521).
- Un pie de rey digital.

A partir del protocolo experimental elaborado por *Acosta Santamaría V.A* [17], se realizan ciertas consideraciones y modificaciones que optimizan la fase experimental. Así, en vez de utilizar el permeámetro patentado por el grupo GEMM [27], ha sido preferible usar una cámara de cultivo celular P3D-6 de la empresa EBERS® junto con dos discos porosos diseñados con el propósito de sujetar y comprimir el andamio simultáneamente (Figura 2.1).

Las ventajas de la P3D-6 residen en su cierre ajustable, muy útil para infligir progresivamente a la muestra la deformación deseada. Además la transparencia del material de fabricación permite hacer el análisis de cada estado comprimido en un equipo de  $\mu$ -CT con facilidad y sin tener que retirar la muestra de su respectiva cámara.

Se diseñó un adaptador especial para colocar la cámara P3D-6 en el  $\mu$ -CT (con roscas Luer-Lock macho) de modo que la muestra a analizar se encuentre siempre en la misma posición en todas la micro-tomografías realizadas.

La adquisición de datos correspondientes a las  $\Delta P$  generadas a través del andamio se hizo mediante el software-controlador del manómetro empleado (Testo®Comfort). Para evitar posibles perturbaciones en las mediciones, se fabricó un soporte en el cual se ancla la cámara para así mantenerla fija y en una misma posición a la hora de realizar las medidas manométricas.



Figura 2.1: (1) Cámara EBERS® P3D-6, (2) discos porosos y (3) montaje con un andamio de PLLA.

### 2.2.1.1. Preparación de las muestras.

Las cinco muestras que se emplearon para el ensayo fueron previamente seleccionadas dentro de un lote de andamios cilíndricos de **PLLA** suministrados por el *Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular* (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia. Se eligen las muestras con las dimensiones más homogéneas posibles, y se recortan cuidadosamente las bases desiguales con un escalpelo para conseguir que las

bases de cada cilindro sean lo más planas posibles. El espesor medio de las muestras resultó ser de  $5,34 \pm 0,06$  mm y el diámetro medio de  $6,26 \pm 0,09$  mm.

De estas cinco muestras, una se reserva para ser analizada en cada etapa del ensayo mediante  $\mu$ -CT. El protocolo para esta muestra se detalla en la sección 2.2.2.

Una vez preparadas, todas las muestras son sumergidas sucesivamente en etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) a  $96^\circ$ ,  $80^\circ$  y  $70^\circ$  y finalmente en agua destilada. Cada inmersión se realiza durante 3 minutos dentro de una cámara de vacío a 0,5 bar para asegurarse la eliminación de posibles burbujas de aire atascadas dentro de los poros de la estructura. Se dejan las muestras inmersas de nuevo en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada durante 24h antes de seguir con el protocolo.

### 2.2.1.2. Protocolo experimental.

#### 1º. Ubicación de la muestra.

Cada muestra húmeda se coloca entre dos discos porosos y se inserta dentro de una cámara P3D-6, de tal manera que el disco inferior permita la sujeción del andamio mientras que el disco superior actúa como elemento compresor del andamio. La Figura 2.2 detalla la correcta colocación del andamio.

A continuación la cámara se cierra cuidadosamente, evitando comprimir y pre-acondicionar la muestra. Se recomienda dejar el menor espacio posible entre el disco y el andamio.

#### 2º. Distancia de referencia (estado inicial sin deformar).

Con un pie de rey se mide cuidadosamente la distancia entre los puntos **A** y **B** como se enseña en la Figura 2.3. Para una cámara con dos discos porosos y sin andamio la distancia **AB** es de  $14,30 \pm 0,05$  mm.

Esta medición previa sirve de referencia para poder deformar la muestra con precisión en los siguientes pasos del protocolo. Conocido el espesor medio de las muestras ( $5,34 \pm 0,06$  mm), se determinan los gradientes de deformación a ser aplicados y así reducir sus espesores en un 10, 20, 30 y 40%. Para ello, en cada nivel de deformación se reducirá la distancia **AB** de la cámara. Por ejemplo, una reducción de aproximadamente  $0,53 \pm 0,01$  mm será necesaria para lograr una deformación correspondiente de 10% del espesor medio de las muestras.

#### 3º. Montaje del sistema.

Como se mencionó anteriormente, se calcula la permeabilidad bajo el fundamento de la Ley de Darcy, midiendo la presión diferencial  $\Delta P$ . Para ello, se monta un circuito cerrado de agua destilada (con una  $\mu = 10^{-3}$  Pa·s) y provisto por una bomba peristáltica con la que se gradúa el caudal (**Q**) requerido. Después de la bomba se conecta un amortiguador con el objetivo de absorber los impulsos generados por la

misma. Este amortiguador elimina las posibles sobrepresiones que se puedan presentar sobre las paredes del andamio garantizando un flujo constante y evitando el ruido en la lectura de datos. Sigue, a continuación, la cámara P3D-6 empalmada con válvulas de tres vías que permiten la conexión en paralelo de un manómetro diferencial con el que se consigue capturar las mediciones de presión antes y después del andamio. Finalmente, la línea aguas abajo vacía su contenido en un recipiente que se convierte nuevamente en la entrada del fluido al sistema. El sistema utilizado se muestra esquemáticamente en la Figura 2.4.

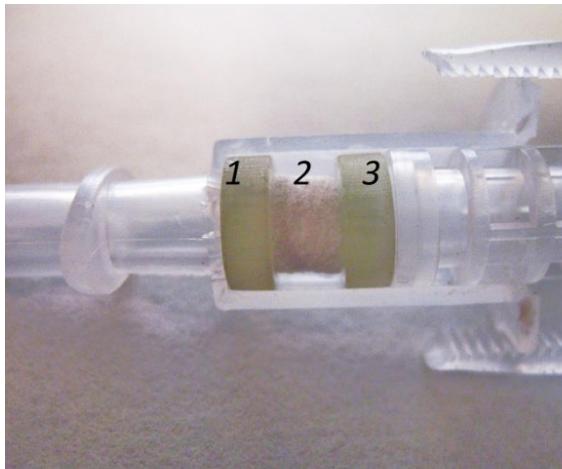


Figura 2.2: (1) Disco poroso inferior, (2) andamio de PLLA, y (3) disco superior.

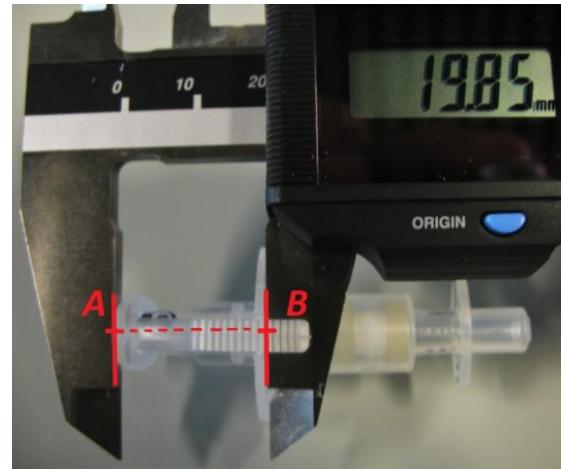


Figura 2.3: Puntos de referencia para medir la deformación del andamio.

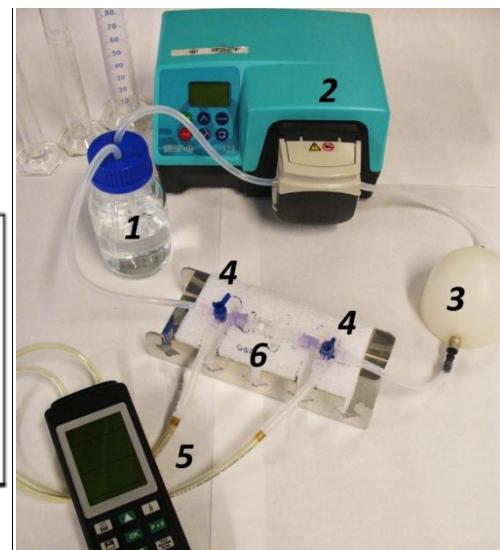
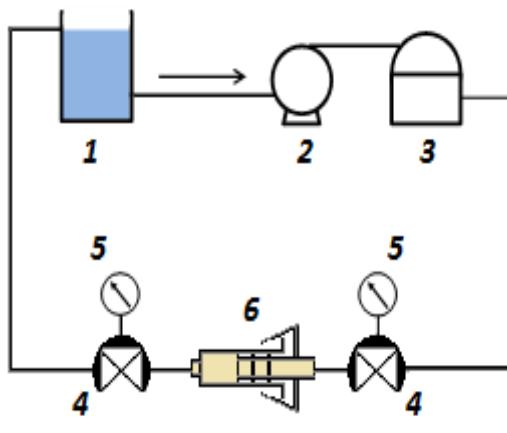


Figura 2.4: Esquema y montaje del sistema de medición para ensayos de permeabilidad de andamios de PLLA. (1) Almacenamiento (2) bomba peristáltica, (3) amortiguador, (4) válvulas de tres vías, (5) manómetro diferencial y (6) cámara P3D-6.

#### **4º. Medición de la presión diferencial.**

A cada andamio se le varía el caudal  $Q$  de forma incremental (**20, 40 y 60 mL/min**), siguiendo el siguiente protocolo:

- Se inicia con el llenado del sistema a un bajo  $Q$  (10 mL/min) para incidir de la menor forma posible sobre la estructura del andamio.
- Se detiene la bomba con el objetivo de estabilizar el sistema durante dos minutos para determinar un punto de referencia inicial con un  $\Delta P$  igual a cero.
- Se impone el primer  $Q$  (**20 mL/min**) dejando estabilizar el sistema durante dos minutos.
- Posteriormente se realiza la medición de  $\Delta P$  con la captura de 200 datos (1 captura/segundo) con el manómetro diferencial digital (Testo®521) el cual posee un rango de operación de 0 a 2000 hPa y una exactitud de  $\pm 0.1\%$ .
- Terminada la toma de datos se procede a incrementar de forma continua el  $Q$  (a **40 y 60 mL/min**) repitiendo los pasos intermedios hasta terminar el ensayo.

Al final del ensayo se obtienen tres mediciones diferentes de  $\Delta P$ , y al aplicar la *Ec. 1* se obtiene la  $k$  para cada variación de  $Q$ . Los valores son promediados para determinar finalmente la  $k$  intrínseca de cada estructura tridimensional. Se calcula el error estándar que determina la inexactitud en el pronóstico del valor experimental utilizado. Los resultados se presentan con la media  $\pm$  el error estándar.

Es importante aclarar que siguiendo este protocolo, el  $\Delta P$  medido con el manómetro corresponde al  $\Delta P$  del sistema cámara-discos-andamio ( $\Delta P_{Total}$ ), por lo cual el  $\Delta P$  del andamio aislado ( $\Delta P_{Andamio}$ ) se obtiene restando al  $\Delta P_{Total}$  el  $\Delta P$  de referencia correspondiente a la presión diferencial dentro de la cámara con los discos y sin el andamio:

$$\Delta P_{Total} = \Delta P_{Andamio} + \Delta P_{Referencia} \quad (2)$$

Se pueden medir los  $\Delta P_{Referencia}$  para cada gradiente de  $Q$  tanto antes como después del ensayo.

#### **5º. Deformación del andamio.**

Una vez medidos los  $\Delta P$ , se comprime el andamio hasta el siguiente gradiente de deformación, lo que se traduce en una reducción del espesor inicial de la estructura tridimensional y en la distancia  $AB$  en la cámara P3D-6.

Se repiten los pasos **4** y **5** para cada escalón de deformación (**20%, 30% y 40%**).

## 2.2.2. Análisis de la macro-estructura.

Adicionalmente al ensayo de permeabilidad, se realizó un estudio con *Micro-tomografía Computarizada ( $\mu$ -CT)* que permite evaluar cualitativamente la distribución de la macro-porosidad y la red trabecular dentro de la arquitectura tridimensional del andamio. El equipo de micro-CT usado es un *GE Healthcare eXplore Locus SP* con el filtro de rayos X número 2, a un voltaje de 45 KV y una potencia de 120 mA. La resolución teórica del equipo es de 8  $\mu$ m. El escaneo de cada muestra dura aproximadamente 6 horas.

A partir de una segmentación tridimensional de la muestra se consigue, con esta técnica, definir cuantitativamente el volumen total y el trabecular de la misma en  $\text{mm}^3$ , y por ende, el volumen de los espacios vacantes que determinan el porcentaje de porosidad de la estructura. A partir de un histograma, se logra obtener cuantitativamente el tamaño medio del macro-poro y visualizar cual es la distribución por unidad de volumen y homogeneidad de los mismos (ver Figura 2.5). Las desventajas están asociadas al rango mínimo de resolución del equipo, ya que este factor define la mínima información adquirida en el proceso de lectura de una muestra. En este caso la resolución del equipo no permitió estudiar el micro-poro ni la micro-estructura de este andamio, que sabemos por SEM que se corresponde a un tamaño de entre 3 y 5  $\mu$ m [17].

Finalmente, y mediante el tratamiento de imágenes, se puede obtener una malla de elementos finitos que se utilizará posteriormente en simulaciones computacionales con el objetivo de validar los resultados obtenidos en este estudio.

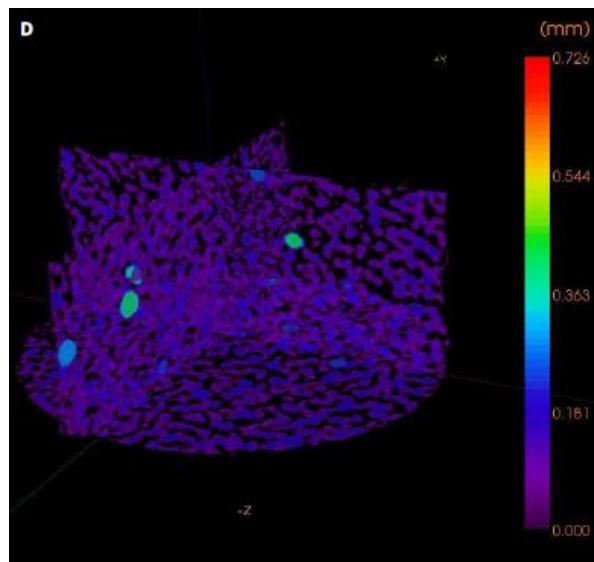


Figura 2.5: *Micro-tomografía realizada a un andamio de PLLA en la que se detalla la distribución y la homogeneidad de los macro-poros por unidad de volumen.* [17]

El protocolo experimental implementado es idéntico al anterior, salvo que se vincula la realización de micro-tomografías del estado inicial (andamio de **PLLA** sin deformación) y para cada gradiente de deformación impuesto. El objetivo se centra en

poder estudiar y evaluar los cambios macro-estructurales que presenta la estructura al estar sometida a una deformación impuesta. Los resultados permitirán sustentar las tendencias que se reporten en el estudio de permeabilidad.

Una sola muestra es suficiente para llevar a cabo esta serie de análisis, dado que lo interesante está en estudiar las variaciones ocasionadas en una misma estructura. Además, considerar posibles repeticiones elevaría considerablemente el coste en tiempo por el procesamiento de la información (máquina/hombre).

#### **1º. Ubicación de la muestra.**

Se coloca la muestra en su cámara de la misma manera que las anteriores, pero esta vez el andamio debe permanecer seco.

#### **2º. Análisis por $\mu$ -CT del estado inicial (sin deformar):**

Se ubica el montaje de la muestra seca en su correspondiente cámara dentro del equipo  $\mu$ -CT. De una muestra se obtienen 348 imágenes correspondientes a 360° de lectura (1 imagen para cada rotación de 1,03°). Estas imágenes, exportadas en formato DICOM (*Digital Imaging and Communication in Medicine*), sirven de base para el posterior estudio y análisis.

Adicionalmente, las imágenes DICOM sirven para generar modelos geométricos del andamio. La segmentación del volumen se obtiene por un barrido de todos los escaneos simultáneos mediante el software Mimics. La estructura reconstruida es de aproximadamente 7,06 mm<sup>3</sup> (3 mm de diámetro por 1 mm de espesor).

Una vez finalizada la micro-tomografía, se coloca una pipeta de plástico de 3 mL en una de las salidas de la cámara y se sumerge la otra salida en etanol a 96°, dando varios pipeteos largos durante 2 minutos para humedecer el andamio y evacuar las posibles burbujas de aire. Se repite la misma operación con etanol a 80°, 70°, y H<sub>2</sub>O destilada (dos veces).

Para los pasos **3, 4 y 5** se sigue con el mismo protocolo planteado en el apartado **2.2.1.2**, respectivamente los pasos **2, 3 y 4** de la misma sección.

#### **6º. Deformación del andamio.**

Se comprime el andamio en un **10%** de su espesor inicial, y se procede al secado de manera contraria a como se humedeció: con una pipeta de plástico de 3 mL, se pipetea sucesivamente en etanol a 70°, 80° y 96° para evacuar la máxima agua posible.

Se deja secar en estufa a 37°C durante 24h, y transcurrido este tiempo se vuelve a analizar por  $\mu$ -CT. (ver paso **2**).

Se repite el protocolo para las deformaciones de **20%, 30% y 40%** hasta acabar la serie de análisis y medidas.

## 2.3. Resultados y discusiones.

### 2.3.1. Permeabilidad.

Los resultados de las  $\Delta P$  medidas y de las  $k$  calculadas se muestran a continuación (ver Tabla 1 y Figuras 2.6 y 2.7). Se observa que la permeabilidad del andamio disminuye conforme la deformación aplicada va aumentando. Adicionalmente las barras de error (que explican la dispersión de los resultados experimentales) reportadas para  $k$  van disminuyendo conforme el andamio es comprimido (Figura 2.6). Esta tendencia puede interpretarse como una homogeneización de la arquitectura trabecular una vez la deformación se va incrementando. En su estado inicial, la estructura presenta una distribución no homogénea de macro-poros y, debido a limitaciones del proceso de fabricación, también se observan poros con un tamaño más grande de lo esperado. Este comportamiento se aprecia en las imágenes 2.5 y 2.8. Con respecto al aumento del gradiente de deformación, se intuye que el tamaño medio de poro y el área de la superficie disminuyen, lo que se refleja en el aumento del diferencial de presión y la disminución de la permeabilidad  $k$ . Se puede suponer que la  $k$  llegará a un valor mínimo debido al colapso de las trabeculas.

Finalmente, se puede establecer una función que explica el comportamiento de la permeabilidad para un andamio estructural de **PLLA** bajo un gradiente de deformación. Tal y como se ve en la Figura 2.6, los datos de permeabilidad se ajustaron a una curva exponencial con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9523$ . El análisis estadístico “one-way ANOVA” (Minitab v.15) aplicado a los datos de  $k$  determinó que el estado inicial (sin deformación) es significativamente diferente del resto de los casos evaluados, lo que permite deducir que desde el punto de vista del comportamiento de la permeabilidad, el estado inicial no es comparable con los demás estados deformados. Se aprecia además que el error estándar correspondiente a la  $k$  del estado no deformado es superior al de los demás estados comprimidos.

Los valores de la permeabilidad experimental del andamio deformado son superiores a los del cartílago articular sano en condiciones fisiológicas (entre  $10^{-14}$  y  $10^{-16} \text{ m}^4/\text{N}\cdot\text{s}$ ) [28], lo que permite afirmar que el andamio de PLLA estudiado en el presente trabajo es adecuado para permitir una distribución uniforme de las células y los nutrientes dentro de la estructura tridimensional, necesaria durante el periodo de proliferación en cultivos *in-vitro*.

Deformación	$\Delta P$ (Pa)	$k$ ( $\text{m}^2$ )
0%	$696,74 \pm 68,32$	$( 3,97 \pm 0,73 ) \cdot 10^{-10}$
10%	$967,08 \pm 115,77$	$( 2,05 \pm 0,36 ) \cdot 10^{-10}$
20%	$1129,30 \pm 204,39$	$( 1,65 \pm 0,38 ) \cdot 10^{-10}$
30%	$1218,35 \pm 197,72$	$( 1,22 \pm 0,25 ) \cdot 10^{-10}$
40%	$1340,77 \pm 183,93$	$( 0,94 \pm 0,18 ) \cdot 10^{-10}$

Tabla 1: *Resultados de  $\Delta P$  y de  $k$  para los andamios de PLLA sometidos a gradientes de deformación.*

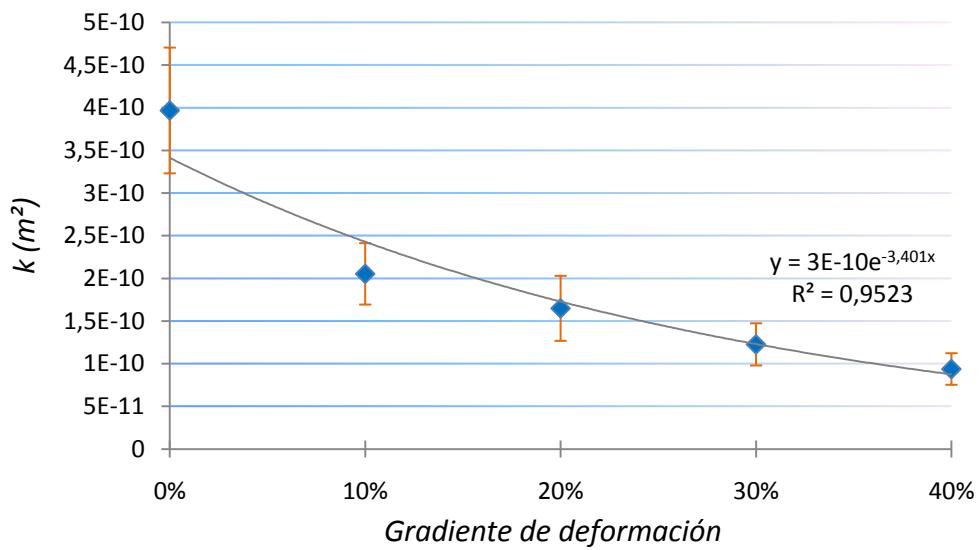


Figura 2.6: Evolución de la permeabilidad en función del grado de deformación del andamio de PLLA.

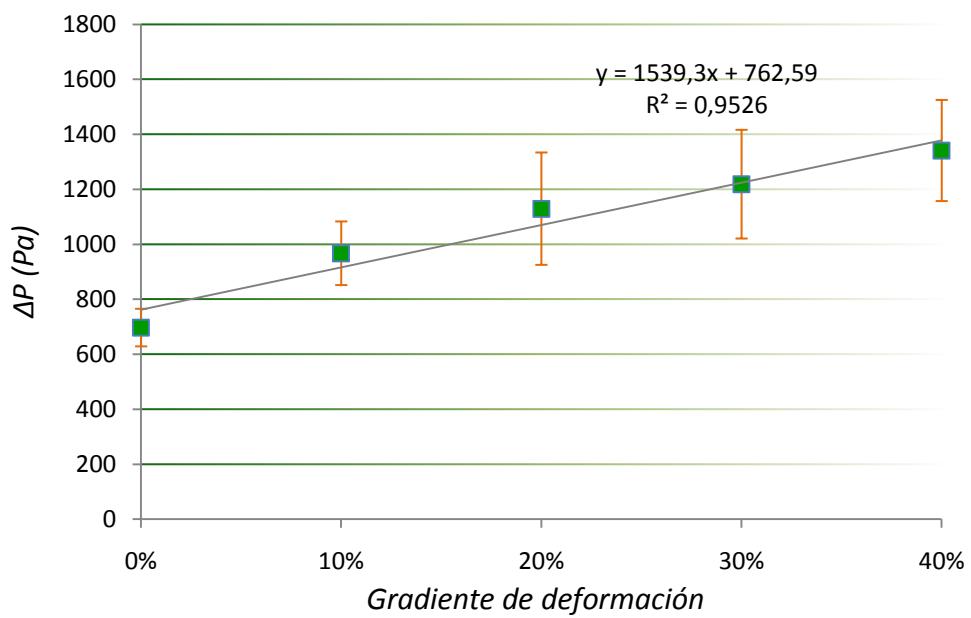


Figura 2.7: Evolución de la presión diferencial en función del grado de deformación del andamio de PLLA.

## 2.3.2. Macro-estructura.

La estructura de un andamio polimérico define las propiedades físicas del mismo, incluidas las mecánicas. La información obtenida del análisis de las imágenes DICOM para cada una de las micro-tomografías del andamio de **PLLA** y correspondientes a cada estado de deformación, permitió corroborar los resultados y tendencias obtenidas en la fase experimental.

Las imágenes muestran una estructura heterogénea y la presencia de diferentes tamaños de macro-poros. Esta morfología explica el margen de error observado en la permeabilidad experimental descrita anteriormente (apartado 2.3.1). En la Figura 2.8 se compara la estructura sin deformar y deformada al 40% del andamio. Se puede apreciar como la arquitectura heterogénea se homogeneiza al aplicarle una deformación ya que a medida que se comprime la estructura los macro-poros van cambiando de tamaño y los más grandes finalmente se asimilan a los demás poros, lo que apoya el comportamiento de la  $k$  del andamio. El porcentaje de porosidad de la estructura obtenido a partir de los volúmenes segmentados y del tratamiento de imágenes determina una tendencia similar a la de la permeabilidad (Figura 2.9).

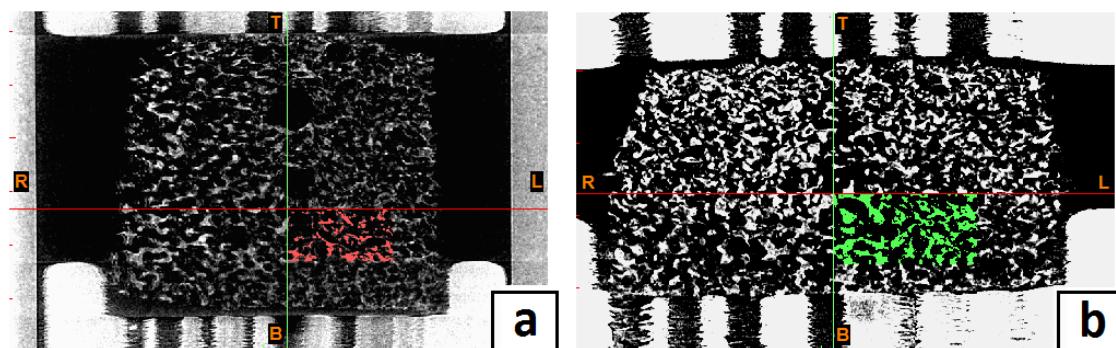


Figura 2.8: *Imagenes DICOM transversales de la macro-estructura del andamio de PLLA (a) sin deformar y (b) comprimido al 40%.*

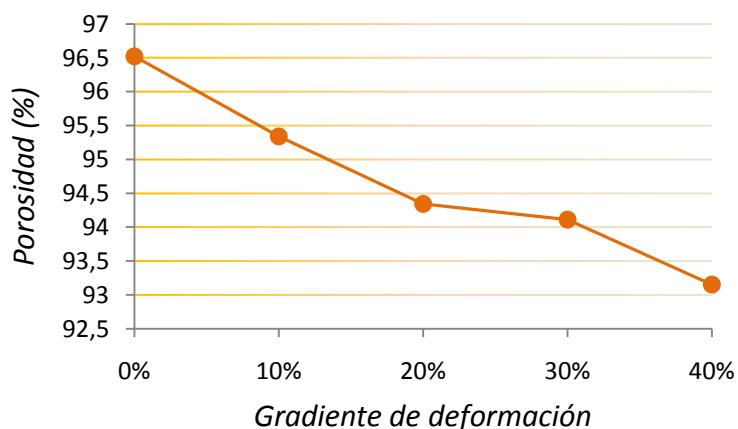


Figura 2.9: *Evolución de la porosidad del andamio de PLLA sometido a gradientes de deformación.*

## 2.4. Conclusiones y trabajos futuros.

El protocolo experimental presentado en este capítulo permitió determinar tanto el comportamiento de la permeabilidad del andamio de **PLLA**, como el de su estructura trabecular, cuando está sometida a gradientes de deformación. La permeabilidad y la porosidad disminuyen conforme se comprime el andamio, hasta llegar a un supuesto colapso de los poros. La heterogeneidad de la estructura en su estado inicial, relacionada con la permeabilidad significativamente diferente de la de sus estados deformados, debe tomarse en cuenta a la hora de diseñar y fabricar el andamio de **PLLA** en vista de optimizar su comportamiento para su posterior uso tanto *in vitro* como *in vivo*. Un detalle relevante en este estudio ha sido determinar el comportamiento de los macroporos de la estructura polimérica, que bajo la deformación aplicada se colapsan en primer lugar y logran contribuir a la homogeneidad de la arquitectura, reflejada además con el comportamiento de la permeabilidad del andamio.

Los datos obtenidos en los análisis por  $\mu$ -*CT* siguen en tratamiento para la futura elaboración y publicación de un modelo computacional del comportamiento del andamio de PLLA bajo deformación, en colaboración con *Malve M., Mena A. y Acosta Santamaría V.A.* Este modelo se basara en la simulación de las propiedades físicas del andamio partiendo de los resultados obtenidos en el presente estudio.

# Capítulo 3

## Comportamiento de la permeabilidad del andamio de **PLLA** durante un proceso de degradación bajo flujo continuo.

Para cumplir con su correcta función, un andamio estructural de **PLLA** debe presentar unas propiedades mecánicas estables bajo condiciones dinámicas, además de una degradación progresiva después de la implantación, coordinada con la cinética de producción del tejido *in-vivo*, permitiendo mantener sus propiedades mecánicas adecuadamente.

Varios autores han estudiado el comportamiento del andamio de **PLLA** durante un proceso de degradación estática [4, 29, 30, 31]. Pero realmente, tanto *in-vitro* como *in-vivo*, la estructura polimérica estará expuesta a un entorno dinámico en el cual la degradación desempeña un papel primordial ya que está relacionada con el comportamiento mecánico de la estructura.

En este capítulo se presenta el protocolo experimental diseñado y aplicado para estudiar la evolución de la permeabilidad y de las propiedades mecánicas del andamio de **PLLA** durante un proceso de degradación dinámica bajo un flujo continuo. Debido a una contaminación fúngica descontrolada en las muestras durante los diferentes ensayos, los resultados del experimento de permeabilidad no se pudieron analizar productivamente. En cambio se propone una optimización del protocolo experimental para su futura aplicación.

### 3.1. Degradación del **PLLA**.

La biodegradabilidad para un andamio en Ingeniería de Tejidos es esencial puesto que su misión es servir de soporte mecánico hasta ser eliminado por las células que formarán el tejido regenerado, sin la necesidad de una intervención quirúrgica adicional. La degradación debe ser progresiva después de la implantación del andamio, en coordinación con la regeneración del tejido *in-vivo* y así permitir mantener las propiedades mecánicas del mismo (ver Figura 3.1). Mientras las células están

fabricando su propia estructura matricial, el andamio debe proporcionar un soporte estructural para la lesión, hasta el momento en que el tejido regenerado sea capaz de tolerar la carga mecánica impuesta. La degradación depende de la superficie del andamio, de su forma, densidad, lugar de implantación y masa molecular del polímero empleado. Un fallo en la velocidad de degradación puede incidir negativamente en la regeneración del tejido, y en el peor de los casos en un colapso del mismo.

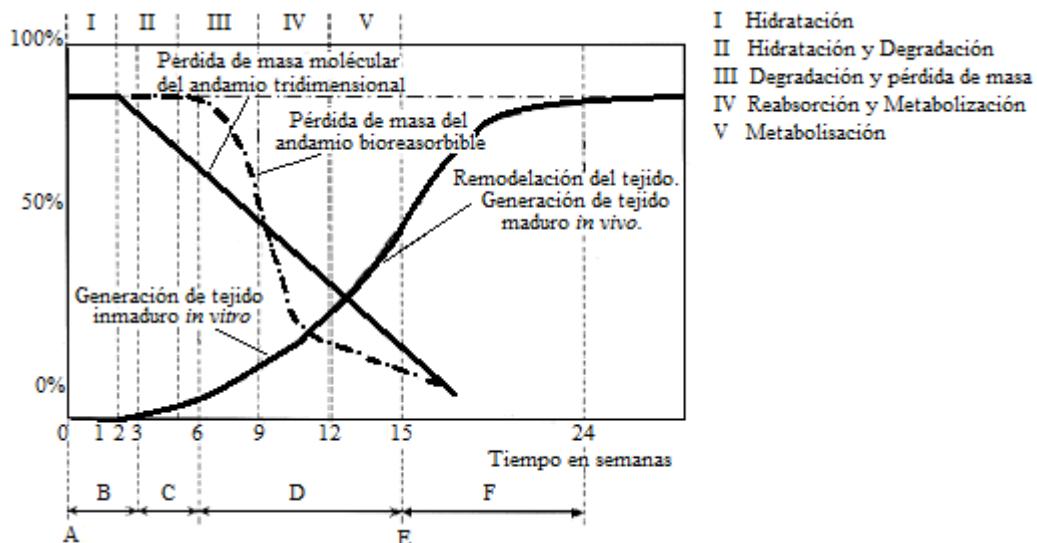


Figura 3.1: Gráfica ilustrando la interdependencia entre la pérdida de peso molecular y la disminución de la masa de un andamio estructural tridimensional frente al tiempo en la ingeniería de tejido de cartílago. (A) Fabricación del andamio reabsorbible; (B) Sembrado de condrocitos dentro del andamio en cultivos estáticos; (C) Crecimiento de tejido inmaduro en entorno dinámico; (D) Crecimiento de tejido maduro en entorno fisiológico; (E) Trasplante quirúrgico; (F) Asimilación del tejido trasplantado.

Fuente: [30], traducido por A. Duizabo.

El uso de polímeros biodegradables como andamios temporales para el crecimiento de células/tejidos *in-vitro* para la aplicación en la regeneración de tejidos *in-vivo* se ha convertido en un aspecto muy importante de la investigación y del desarrollo dentro de la *Ingeniería de Tejidos*. Los polímeros biodegradables deben fabricarse con diseños que aporten estructuras mecánicamente estables antes de que puedan utilizarse como andamios aplicados en *Ingeniería de Tejidos*. La estabilidad mecánica de la estructura del andamio es importante durante la regeneración ya que debe mantener su forma y tamaño tanto *in-vitro* como *in-vivo*.

El **PLLA** es un termoplástico de la familia de los poliésteres biodegradables. Se diferencia de otros poliésteres por sus excelentes propiedades químicas, físicas y mecánicas. Al mismo tiempo, es el poliéster biodegradable que requiere mayores tiempos para su degradación. El tiempo en inmersión que corresponde a una pérdida de resistencia mecánica del 50%, es de aproximadamente 6 meses [32].

La degradación del **PLLA** se realiza por procesos hidrolíticos y genera como subproducto moléculas de ácido láctico. Este subproducto del polímero es incorporado dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica de los carbohidratos del organismo fácilmente metabolizable.

Esta característica convierte el **PLLA**, desde el punto de vista toxicológico, en un producto ideal para su uso en *Ingeniería de Tejidos*. Sin embargo, hay que destacar también que la degradación de este polímero provoca la acidificación del medio en el que se encuentra, aspecto que no siempre es tolerable por el tejido.

## 3.2. Materiales y métodos.

Para evaluar el comportamiento de las propiedades mecánicas del andamio de **PLLA** durante su degradación bajo un flujo continuo, se emplearon los siguientes insumos:

- 24 muestras cilíndricas de **PLLA** poroso, con diámetros de 5,6 a 6,2 mm y espesores de 2,8 a 3,2 mm.
- 6 cámaras para cultivo celular EBERS® P3D-6.
- Una bomba peristáltica con 8 canales ECOLINE®.
- Tubos Tygon® con diámetro interno 3,2 mm, y 6 tubos con pasadores con diámetro interior 0,88 mm.
- Conectores-adaptadores de diámetro 3,2 mm a 0,88 mm.
- 12 conectores-válvulas de tres vías.
- 3 frascos de 250 mL con PBS (Phosphate Buferred Saline).
- Penicilina estreptomicina (P/S\*).
- Anfotericina B (Fungizone®).

La degradación de las muestras se experimentó a temperatura ambiente y bajo dos caudales distintos de PBS (**1,5 y 3 mL/min**). Se realizó el seguimiento del ensayo a **3, 7, 14 y 21 días**. Se emplearon 3 muestras de **PLLA** para cada tiempo de seguimiento y caudal de flujo, aprovechando así continuamente 6 de los 8 canales disponibles por la bomba peristáltica empleada. El experimento duró 24 días para cada rango de caudal.

### 3.2.1. Preparación de las muestras.

Las muestras empleadas para el experimento se seleccionaron de la misma manera que en el ensayo de permeabilidad presentado en el **Capítulo 2** sección **2.2.1.1**. El espesor medio de las muestras elegidas fue de  $(3,0 \pm 0,2)$  mm y el diámetro medio de  $(5,9 \pm 0,3)$  mm.

Una vez preparadas, se sumergen sucesivamente en etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) de gradación decreciente a  $96^\circ$ ,  $80^\circ$  y  $70^\circ$  y finalmente en PBS. Se realiza cada inmersión durante 3 minutos dentro de una cámara de vacío a 0,5 bar. Finalmente, las muestras se dejan inmersas de nuevo en PBS durante 24h antes de seguir con el protocolo.

Al medio empleado (PBS) se le añade un tratamiento bactericida compuesto por una dosis de P/S\* (Penicilina estreptomicina) correspondiente al 1% del volumen total de medio y de Fungizone® (Anfotericina B) correspondiente al 0,5% del volumen total.

### 3.2.2. Protocolo experimental.

Los andamios de **PLLA** humidificados se colocan en las cámaras P3D-6, cerrándolas cuidadosamente de manera que no se pre-acondic和平n las muestras. Las cámaras se conectan mediante conectores-válvulas de tres vías a un circuito fluídico (Figura 3.2) similar al del montaje del ensayo de permeabilidad (sección **2.2.1.2, Capítulo 2**):

- Cada frasco de almacenamiento provee medio a dos muestras, por lo cual llevan tapones perforados con 5 agujeros: 2 entradas, 2 salidas, y 1 toma de aire (con un filtro) para que la presión dentro del sistema sea homogénea (presión atmosférica).
- El medio contenido en los frascos se trata con bactericida (1% de P/S\* y 0,5% de Fungizone®) cada 2~3 días para evitar la aparición de bacterias y la formación de hongos dentro del andamio. Además se recomienda proteger de la luz el contenido de los frasco por razón de la fotosensibilidad del Fungizone®.
- Las salidas de medio se anclan en los canales de la bomba, que impulsa el PBS con un caudal de **1,5 mL/min** hasta las cámaras conectadas al circuito mediante las válvulas de tres vías. El medio vuelve al frasco de almacenamiento por el canal de entrada.
- Se emplean simultáneamente 6 de los 8 canales disponibles de la bomba peristáltica, organizados de la siguiente manera: tres canales corresponden a las tres muestras de cada tiempo de degradación (**3, 7, 14, 21 días**). Se dedican los tres primeros canales al seguimiento de 7 días de degradación, y los otros tres al de 21 días. Una vez transcurrido los 7 días de degradación de las primeras muestras, los mismos canales son dedicados al seguimiento de 14 días de degradación de tal manera que se terminen al mismo tiempo los seguimientos de 14 y 21 días de degradación. Finalmente se realiza el seguimiento de 3 días de degradación.

Una vez terminados todos los seguimientos para la degradación bajo caudal de 1,5mL/min, se retiran las muestras, y se repiten los pasos anteriores cambiando el caudal del flujo de degradación a **3 mL/min** para las nuevas muestras.

Se procede al lavado de las muestras degradadas, sumergiéndolas en agua destilada durante 3 minutos dentro de una cámara de vacío a 0,5 bar.

### 3.2.3. Ensayo de permeabilidad.

Se mide la permeabilidad de los andamios de **PLLA** degradados siguiendo el protocolo experimental presentado en la sección **2.2.1.2** del capítulo anterior (pasos **3 y 4**).

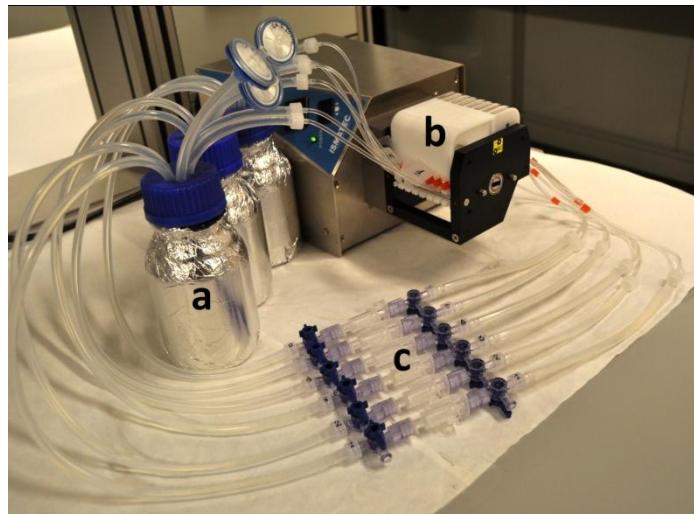


Figura 3.2: Montaje del circuito de degradación de los andamios de PLLA bajo flujo continuo. (a) Almacenamiento, (b) bomba peristáltica, (c) cámaras P3D-6 con válvulas de tres vías.

### 3.3. Resultados y discusiones.

Como se ha mencionado al principio de este capítulo, el protocolo experimental no fue productivo debido a la contaminación por hongos que sufrieron las muestras. A pesar de mantener el tratamiento bactericida a lo largo del ensayo, la proliferación no se pudo contener y las repercusiones sobre los resultados fueron evidentes a partir del 3º día de degradación bajo los dos caudales de flujo. Los datos obtenidos del ensayo de la permeabilidad se muestran en la Figura 3.3 y la Tabla 2.

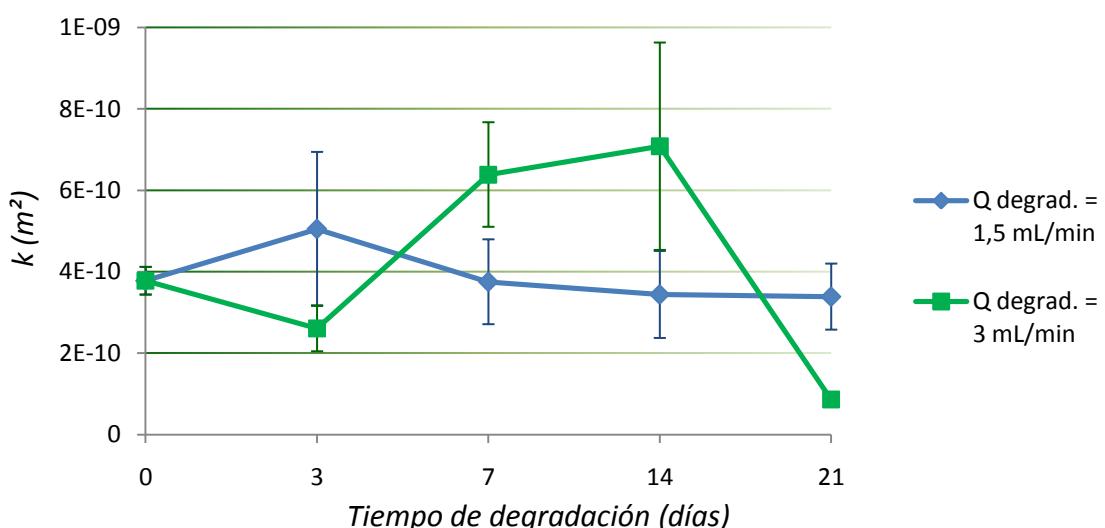


Figura 3.3: Evolución de la permeabilidad del andamio de PLLA contaminado en función del tiempo de degradación bajo flujo de PBS a caudales de 1,5 mL/min (en azul) y 3 mL/min (en verde).

Tiempo de degradación	Degrado a $Q = 1,5$ mL/min		Degrado a $Q = 3$ mL/min	
	$\Delta P$ (Pa)	$k$ ( $m^2$ )	$\Delta P$ (Pa)	$k$ ( $m^2$ )
0 días	$523,1 \pm 20,1$	$( 3,78 \pm 0,34 ) \cdot 10^{-10}$	$523,1 \pm 20,1$	$( 3,78 \pm 0,34 ) \cdot 10^{-10}$
3 días	$530,3 \pm 88,4$	$( 5,05 \pm 1,89 ) \cdot 10^{-10}$	$630,5 \pm 58,0$	$( 2,61 \pm 0,57 ) \cdot 10^{-10}$
7 días	$550,8 \pm 53,2$	$( 3,75 \pm 1,04 ) \cdot 10^{-10}$	$442,1 \pm 20,4$	$( 6,39 \pm 1,28 ) \cdot 10^{-10}$
14 días	$638,6 \pm 155$	$( 3,44 \pm 1,07 ) \cdot 10^{-10}$	$501,3 \pm 99,5$	$( 7,08 \pm 2,55 ) \cdot 10^{-10}$
21 días	$560,9 \pm 52,5$	$( 3,39 \pm 0,81 ) \cdot 10^{-10}$	$1235,6 \pm 68,9$	$( 8,62 \pm 0,11 ) \cdot 10^{-10}$

Tabla 2: *Resultados de  $\Delta P$  y de  $k$  para los andamios de PLLA sometidos a gradientes de deformación.*

A la vista de tales resultados, es evidente que la presencia de hongos ha afectado el experimento porque la alta dispersión de los datos experimentales para ambos rangos de caudales de degradación, expresado por el error estándar, muestra la alteración del experimento debido a la contaminación.

Además, la limitación en el número de andamios de **PLLA** (suministrados generosamente por el grupo CBTI de la Universidad Politécnica de Valencia) ha hecho imposible repetir los experimentos ni aumentar el tamaño muestral (3 andamios para cada tiempo de degradación) para obtener resultados estadísticamente relevantes. Todas las anteriores consideraciones indujeron a interpretar estos resultados como no aplicables para un análisis adecuado de la evolución de la permeabilidad de un andamio de **PLLA** en condiciones de degradabilidad dinámica bajo flujo.

Para optimizar y mejorar el protocolo utilizado, y dado que tanto el PBS y el ácido poli-láctico son productos nutritivos y metabolizables para los organismos celulares, se proponen las siguientes modificaciones:

- Preparar las muestras de **PLLA** y el medio de PBS bajo un ambiente estéril (campana de flujo laminar).
- Higienizar y/o esterilizar los componentes del circuito fluídico de degradación.
- Realizar el montaje fluídico de degradación dentro un biorreactor, una incubadora o una estufa aseptizada, a temperatura de 37°C y en ausencia de luz.
- Prever un mayor número de muestras, como mínimo 48 andamios de **PLLA**. El coste en tiempo del ensayo de degradación se doblará, pero asegurando en contraparte la caracterización de las propiedades mecánicas con un muestreo comparable estadísticamente.
- Dedicar al mínimo un andamio como muestra de control, a la cual se realizará el seguimiento de su macro-estructura con micro-tomografías en cada tiempo de degradación.

### 3.4. Conclusiones.

Este protocolo experimental resultó ser inapropiado e insuficiente para las condiciones en las que se deseó degradar los andamios de **PLLA**. La falta de esterilidad de las muestras y de los componentes del circuito fluídico para el ensayo de degradación han podido ser un factor muy relevante en el origen y la proliferación de la contaminación fúngica en los andamios de **PLLA**.



## Capítulo 4

### Comportamiento del andamio de **PLLA** bajo deformaciones dinámicas.

La *Ingeniería de Tejidos* se basa principalmente en tres etapas: el diseño y la fabricación de un andamio estructural capaz de soportar las condiciones mecánicas y fisiológicas del tejido a reparar, un cultivo *in vitro* de células específicas que permitan la regeneración del tejido dentro del andamio seleccionado, y la implantación *in vivo* del andamio en la zona lesionada. Para el diseño óptimo del andamio se deben tener en cuenta las condiciones mecánicas y fisiológicas a las que puede estar sometido tanto en los períodos *in vitro* como *in vivo* [33].

En este capítulo se presenta el protocolo experimental diseñado y realizado para estudiar el comportamiento de la permeabilidad del andamio de **PLLA** sometido a deformaciones cíclicas. Se evaluaron y analizaron los cambios experimentados por la tensión máxima soportada por la estructura frente a los niveles de deformación impuesta, la deformación acumulada a lo largo de los ciclos del ensayo, y la permeabilidad al inicio y al final del tratamiento.

Varios autores emplearon protocolos similares para estudiar el efecto de cargas compresivas dinámicas sobre la biosíntesis de condrocitos [34], o la degradación *in vitro* de andamios estructurales de otras composiciones [35, 31]. Mientras unos eligen la estimulación dinámica con control en carga, otros optan por el control en deformación, con amplitudes del 2% hasta 10% del espesor inicial de las muestras, a frecuencias fisiológicas (entre 0,1 y 1 Hz) y durante ensayos continuos o interrumpidos [33].

Los resultados obtenidos permitirán completar el estado del arte sobre el comportamiento del andamio de **PLLA** en condiciones dinámicas, y evaluar la capacidad de la estructura polimérica estudiada a cumplir con sus futuros objetivos.

#### 4.1. Materiales y métodos.

El experimento descrito en este capítulo se realizó empleando los siguientes materiales e instrumentos:

- 9 muestras cilíndricas de andamios estructurales de **PLLA**, con diámetros de 5,8 a 6,2 mm y espesores de 2,8 a 3,1 mm.
- Un equipo BOSE-ElectroForce® BioDynamic 5210 Multi-specimen.
- 3 cámaras BioDynamic equipadas con pistones de compresión uniaxial.
- 3 células de carga BOSE® de 225 N.
- 3 conectores-válvulas.
- Agua destilada.
- Tapones Luer-Lock.

Se diseñó el experimento basándose en un ensayo de fatiga de amplitud constante, con control de desplazamiento: se impone a las muestras una deformación cíclica controlada para medir la respuesta en carga.

En el ensayo, los andamios se evaluaron bajo condiciones de inmersión en agua destilada. Este medio carece de aditivos nutricionales como sí los pueden contener el PBS (Phosphate Buffered Saline) y el SBF (Simulated Body Fluid), medios usados para el cultivo celular *in vitro*. El tiempo de inmersión de las muestras (desde su preparación hasta finalizar la experimentación) fue entre 7 y 8 días.

Para este trabajo, se elaboraron tres series de ensayos, correspondientes a tres amplitudes de deformación sinusoidal distintas (**2, 5 y 10%** con respecto al espesor inicial del andamio), durante periodos ininterrumpidos de **200000 ciclos** a una frecuencia de **0,75 Hz** (equivalente a una zancada humana lenta [36]).

#### **4.1.1. Preparación de las muestras.**

En este experimento, y para cada rango de deformación, se emplearon 3 muestras de andamios estructurales de **PLLA**, para un total de 9 muestras. Su preparación y acondicionamiento es similar a la utilizada en los protocolos anteriormente expuestos (ver detalles en la sección **2.2.1.1 del Capítulo 2**).

Es importante asegurar que el espesor y las caras de las diferentes muestras sean homogéneos entre sí. Para tal fin, se hizo uso de un pie de rey digital (con una precisión de 0,01 mm), y de papel de lija (tamaño de grano 240). De este modo, se obtuvieron tres tríos de muestras con espesores de  $2,80 \pm 0,02$  mm,  $3,00 \pm 0,01$  mm y  $3,10 \pm 0,03$  mm.

#### **4.1.2. Ensayo de permeabilidad.**

Antes y después del experimento de deformación dinámica de los andamios, se mide la permeabilidad de las muestras de **PLLA** siguiendo el protocolo experimental descrito en los pasos **3 y 4** de la sección **2.2.1.2 del Capítulo 2**. Para las mediciones post-experimentales, se dejaron las muestras recuperarse de la deformación acumulada a lo largo el experimento, sumergiéndolas en agua destilada durante 24h.

### **4.1.3. Protocolo experimental.**

Para llevar a cabo el experimento de deformación dinámica de los andamios de **PLLA**, se utilizó el dispositivo BioDynamic 5210 creado por BOSE-ElectroForce®, por su capacidad a ensayar varias muestras simultáneamente (ver el Anexo C para una descripción más completa del dispositivo). A pesar de ser diseñado como un biorreactor para cultivos celulares dinámicos en *Ingeniería Tisular* de hueso y cartílago, también permite realizar ensayos de tracción y compresión uniaxial. Dentro de estos ensayos se vinculan los de fatiga de materiales.

El equipo a disposición del I3A consta de tres cámaras de ensayo y células de carga, por lo cual se aprovechó esta capacidad para poner a prueba tres andamios simultáneamente. A continuación se detalla el protocolo experimental con el cual se realizó el ensayo de compresión dinámica sobre andamios de **PLLA** inmersos en agua destilada [37]:

#### **1º. Montaje de las cámaras BioDynamic.**

- Se ensamblan las cámaras BioDynamic con los pistones de compresión, bloqueados con collares y placas retenedoras (Figura 4.1).
- Las tapas de metacrilato delanteras deben permanecer abiertas, mientras que las traseras están cerradas.
- Los canales de los laterales de las cámaras se cierran con tapones Luer-Lock, excepto uno situado a la mayor altura donde va un conector-válvula (ver Figura 4.3).

#### **2º. Llenado de las cámaras y colocación de las muestras.**

- Con las cámaras posicionadas horizontalmente y los conectores-válvulas cerrados, se procede al llenado de cada cámara con un volumen aproximado de 150 mL de agua destilada.
- Para colocar las muestras de andamios de **PLLA** pre inmersas, se separan los pistones de compresión aflojando únicamente los collares.
- Sujetando cuidadosamente los andamios con unas pinzas se juntan los pistones hasta que las muestras logren mantenerse en posición, evitando comprimir las y pre-acondicionarlas (Figura 4.2).

#### **3º. Montaje del sistema BioDynamic.**

- Una vez los andamios de **PLLA** correctamente colocados, se cierran las tapas delanteras de las cámaras y se procede a su instalación en el dispositivo BioDynamic (ver Figura 4.3).

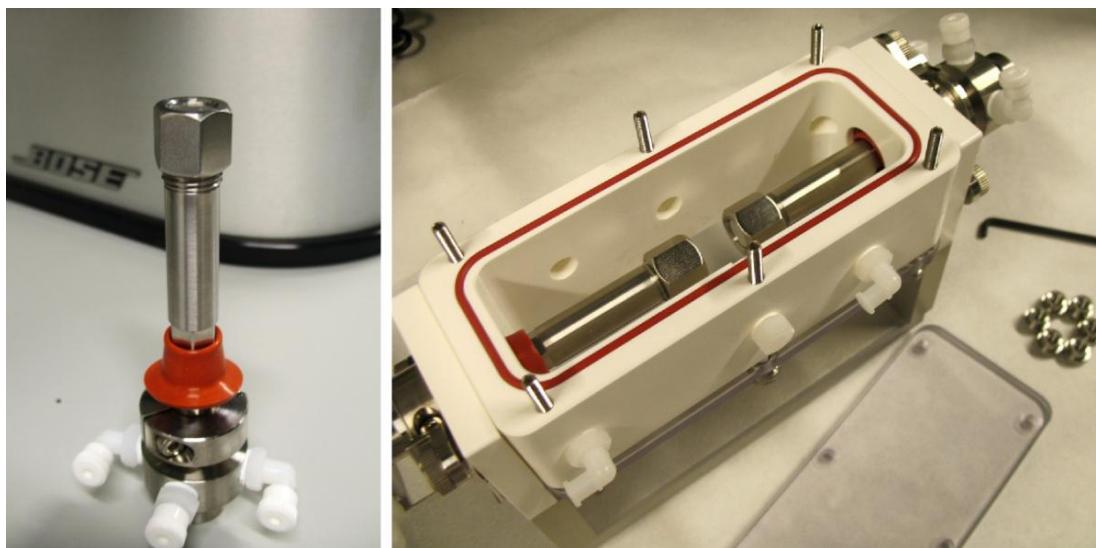


Figura 4.1: Pistón de compresión (izquierda) y cámara BioDynamic ensamblada (derecha).

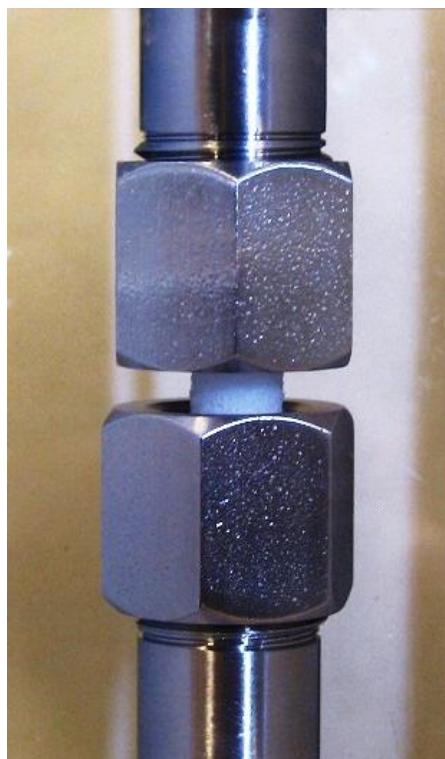


Figura 4.2: Andamio de PLLA alojado entre los pistones de compresión dentro de una cámara BioDynamic.

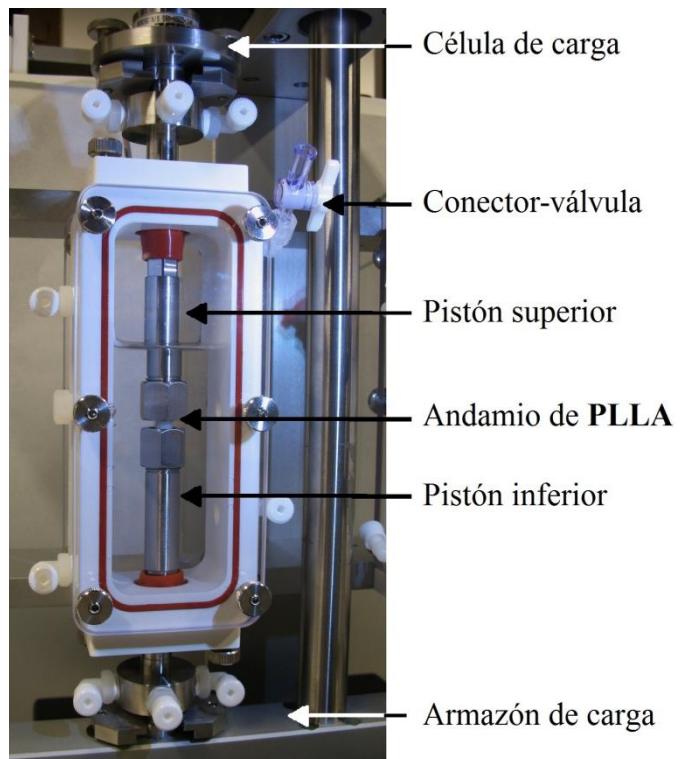


Figura 4.3: Cámara instalada en el dispositivo BioDynamic 5210, con un andamio de PLLA inmerso en su interior.

- Los pistones inferiores se anclan primero en el armazón de carga, luego los pistones superiores en cada célula de carga. Se abren las válvulas de las cámaras para homogeneizar la presión dentro de ellas (presión atmosférica).
- Los collares y las placas retenedoras se retiran, para así poder apretar los anclajes y ajustar la alineación entre los pistones de cada cámara.

#### **4º. Calibración de las células de carga.**

- A través del software controlador WinTest® 7, se inmoviliza el armazón de carga para que la calibración de cada célula de carga no pueda afectar a las demás.
- Mediante los tornillos de “micro-ajuste” situados en los soportes de las células de carga, se ajusta el espacio entre los pistones superiores y las muestras hasta conseguir que sea el menor posible sin que haya contacto entre ellos.
- Realizado este acondicionamiento, se ponen a cero las medidas de los sensores de carga mediante el comando “tara” del controlador.

#### **5º. Configuración del software controlador WinTest 7.**

Se establece un pre-contacto previo entre las muestras y los pistones de compresión a través de los tornillos de “micro-ajuste”. La pre-carga aplicada se define a -0,20 N (por convención, el signo negativo indica un esfuerzo de compresión). Los parámetros del ensayo se configuran de la siguiente manera:

- La compresión de las muestras se hace de forma **sinusoidal**.
- Frecuencia de deformación: **0,75 Hz**.
- Amplitud de deformación: **2%** del espesor inicial de las muestras.
- Número de ciclos: **200100 ciclos**.
- Toma de datos (ciclo, deformación, carga): 100 puntos durante 10 ciclos, a intervalos de 20 000 ciclos y a partir de la condición inicial (ciclo: 0).

Conviene añadir un margen de 100 ciclos para poder realizar la última toma de datos, correspondiente a la condición final (ciclo: 200000).

De este modo, para cada ensayo se obtienen 11 seguimientos, con los datos necesarios para realizar las curvas de tensión-deformación desde el primero hasta el dos cienmilésimo ciclo.

Una vez realizado el experimento, se repiten los pasos **1 a 5** para las deformaciones del **5 y 10%** sobre el espesor inicial de las muestras (sin deformación).

Es aconsejable tomar precauciones para evitar crear ruidos y perturbaciones en las medidas, debido a la alta sensibilidad de las células de carga.

Los datos, exportados en formato .txt, presentan los valores del desplazamiento del armazón de carga (mm) y de las cargas reportadas por las células de carga (N) para

las tres muestras ensayadas. Las fórmulas de conversión de estas medidas en deformación  $\varepsilon$  (%) y en tensión  $\sigma$  (MPa) son las siguientes:

$$\sigma = \frac{|F|}{A} \quad \varepsilon = \frac{\Delta L}{L} \quad (3)$$

donde  $|F|$  es el valor absoluto de la carga reportada por la estructura tridimensional ante la deformación impuesta,  $A$  su área transversal inicial,  $L$  el espesor inicial de la muestra y  $\Delta L$  el desplazamiento del armazón de carga cuya longitud depende de la deformación solicitada en función del espesor de la muestra.

## 4.2. Resultados y discusiones.

### 4.2.1. Deformación dinámica.

Las gráficas de tensión-deformación obtenidas a partir de las medidas experimentales se muestran en la Figura 4.4. Las curvas de tensión máxima  $\sigma_{\text{máx}}$  (Figura 4.5) se determinaron a partir de los valores promedios de la tensión alcanzada cuando la deformación llega al 98% de su amplitud máxima para cada ciclo (correspondiente a deformaciones de 1.96, 4.9 y 9.8% respectivamente). De la misma manera, se determinó la deformación acumulada por los andamios  $\varepsilon_{\text{acum}}$  (Figura 4.6) cuando la tensión medida sobrepasa su valor mínimo impuesto por la pre-carga inicial. Los valores de tensión máxima y de deformación acumulada se recompilan respectivamente en las tablas 3 y 4.

En las gráficas de tensión-deformación (Figura 4.4), se pueden identificar en los primeros ciclos de ensayo los bucles de histéresis elástica del andamio de **PLLA**, que se comprimen progresivamente con el paso de los ciclos. El área dentro de estos bucles corresponde a la diferencia entre los trabajos realizados durante la compresión y la relajación de las muestras. Para una deformación del orden de 2% del espesor inicial, los bucles se superponen entre sí durante la totalidad del ensayo. Tendencias que se ilustran en las Figuras 4.5 y 4.6, donde se aprecian las conductas lineales para  $\sigma_{\text{máx}}$  y a partir de los 40000 ciclos para  $\varepsilon_{\text{acum}}$ . A través de estas observaciones se refleja el comportamiento elástico de la estructura tridimensional de **PLLA**.

Bajo deformaciones del 5 y 10% con respecto al espesor inicial del andamio, la estructura sufre una mayor deformación acumulada, que se estabiliza al 2,55% a partir de los 60000 ciclos para la amplitud de deformación del 5%, y 5.70% a partir de los 80000 ciclos para la amplitud del 10% (ver Figura 4.5). De la misma manera la  $\sigma_{\text{máx}}$  disminuye hasta alcanzar valores más estables (alrededor de 0,033 MPa y 0,019 MPa respectivamente). Se puede intuir que la estructura de **PLLA** sufrió daños al nivel de las trabéculas: las más delgadas se colapsaron frente a las compresiones repetidas, dejando una arquitectura formada en su mayor parte por trabéculas más gruesas. Ellas solas siguen aguantando las cargas y contribuyen a la recuperación parcial de la deformación infligida al andamio. Esta redistribución de las trabéculas explicaría las tendencias lineales de  $\sigma_{\text{máx}}$  y  $\varepsilon_{\text{acum}}$  observadas para estas amplitudes de deformación en las Figuras 4.5 y 4.6.

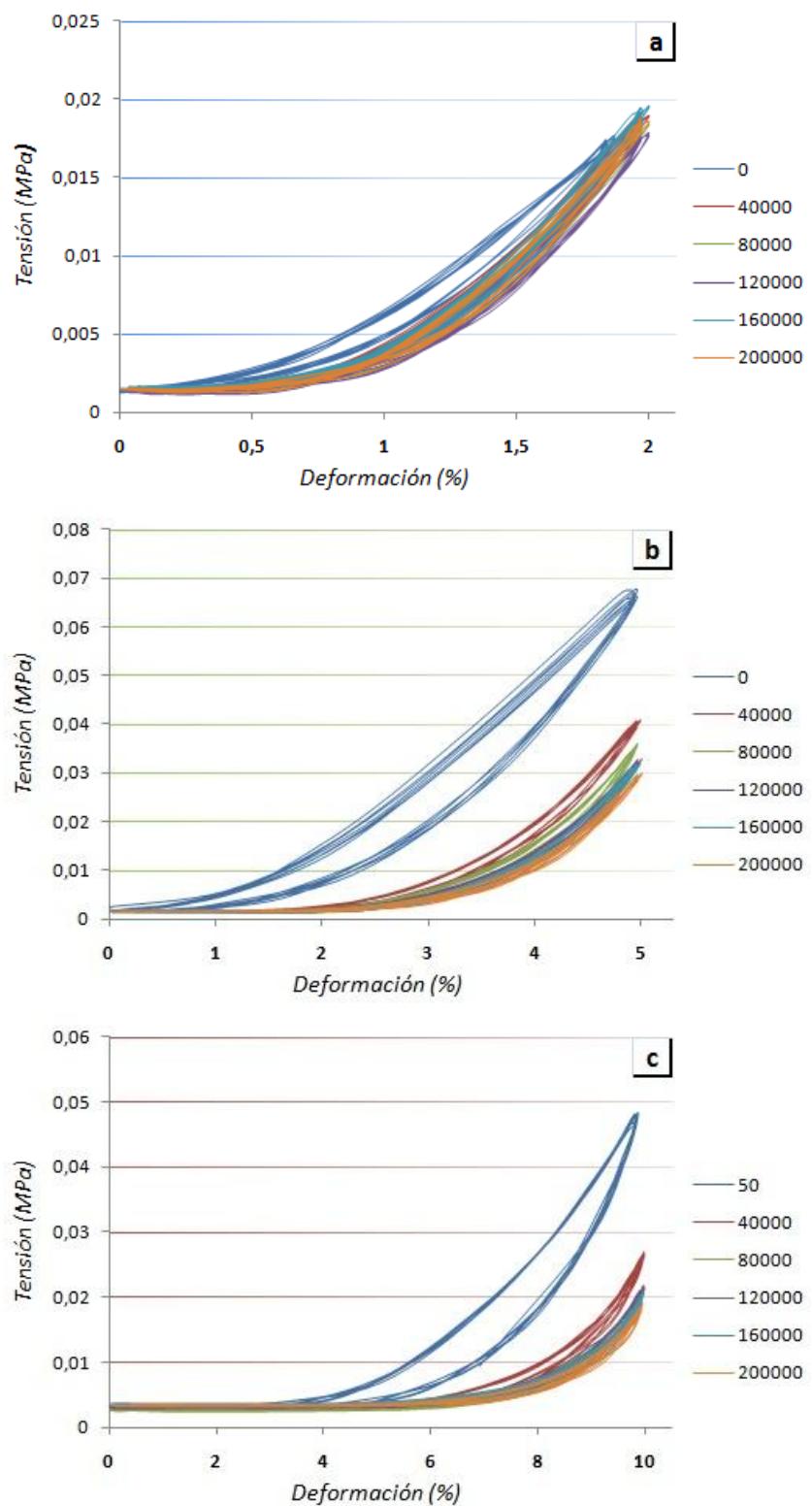


Figura 4.4: Curvas representativas de la tensión soportada por el andamio de PLLA frente a una deformación cíclica del (a) 2%, (b) 5% y (c) 10% respecto a su espesor inicial.

En el caso de deformaciones del 5 y 10% respecto al espesor inicial de las muestras, la variabilidad de los resultados reportados para  $\sigma_{\text{máx}}$  disminuye conforme pasan los ciclos (ver Tabla 3), lo que puede interpretarse como una heterogeneización de la arquitectura trabecular, que acaba constituida únicamente por las trabéculas más gruesas que no se colapsaron.

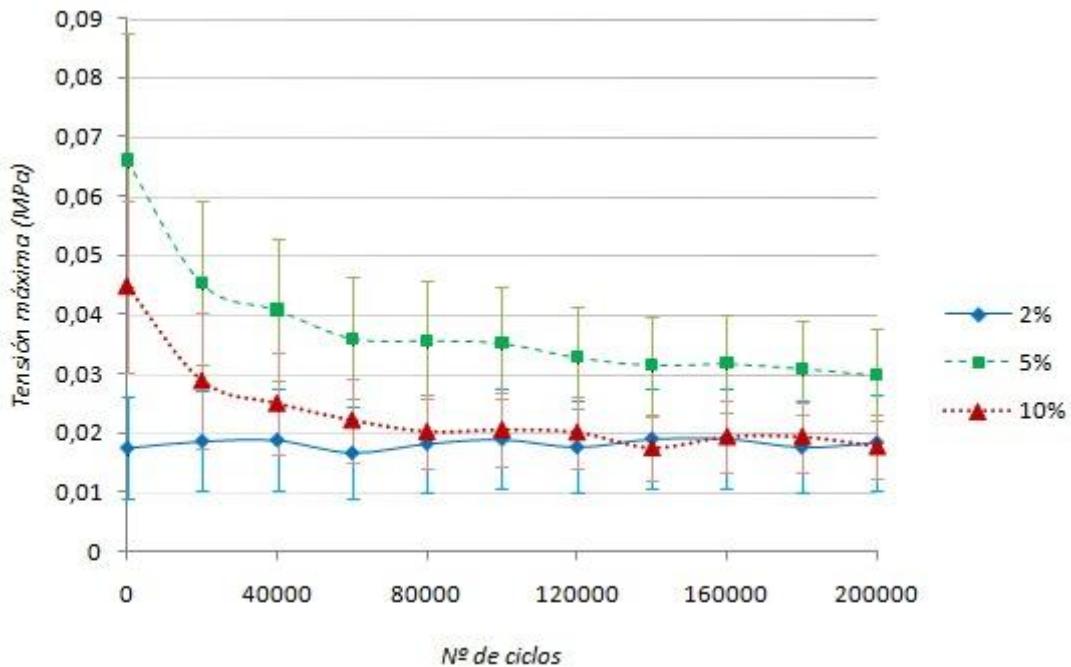


Figura 4.5: Gráfica de la tensión máxima para cada amplitud de deformación dinámica.

Nº de ciclos	Tensión máxima (MPa)		
	Deformación al 2%	Deformación al 5%	Deformación al 10%
0	0,0176 ± 0,0085	0,0661 ± 0,0215	0,0447 ± 0,0144
20000	0,0187 ± 0,0085	0,0453 ± 0,0138	0,0288 ± 0,0115
40000	0,0189 ± 0,0085	0,0409 ± 0,0120	0,0250 ± 0,0086
60000	0,0167 ± 0,0077	0,0361 ± 0,0103	0,0221 ± 0,0072
80000	0,0183 ± 0,0082	0,0357 ± 0,0099	0,0202 ± 0,0063
100000	0,0190 ± 0,0084	0,0352 ± 0,0095	0,0206 ± 0,0063
120000	0,0177 ± 0,0079	0,0329 ± 0,0086	0,0201 ± 0,0059
140000	0,0191 ± 0,0084	0,0316 ± 0,0082	0,0175 ± 0,0054
160000	0,0192 ± 0,0084	0,0318 ± 0,0083	0,0194 ± 0,0061
180000	0,0177 ± 0,0078	0,0309 ± 0,0078	0,0194 ± 0,0059
200000	0,0185 ± 0,0081	0,0298 ± 0,0077	0,0177 ± 0,0054

Tabla 3: Resultados de la tensión máxima para cada amplitud de deformación dinámica y número de ciclos.

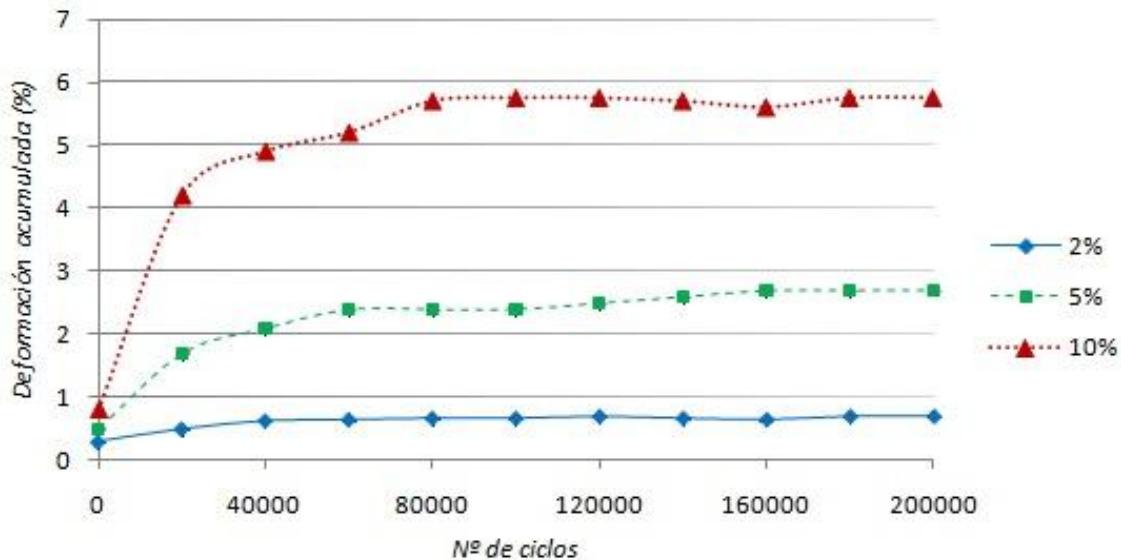


Figura 4.6: Gráfica de la deformación acumulada para cada amplitud de deformación dinámica.

Nº de ciclos	Deformación acumulada (%)		
	Deformación al 2%	Deformación al 5%	Deformación al 10%
0	0,3	0,5	0,8
20000	0,5	1,7	4,2
40000	0,63	2,1	4,9
60000	0,65	2,4	5,2
80000	0,67	2,4	5,7
100000	0,67	2,4	5,75
120000	0,7	2,5	5,75
140000	0,67	2,6	5,7
160000	0,65	2,7	5,6
180000	0,7	2,7	5,75
200000	0,7	2,7	5,75

Tabla 4: Resultados de la deformación acumulada para cada amplitud de deformación dinámica y número de ciclos.

La estabilidad del comportamiento del andamio de **PLLA** durante 200000 ciclos de deformación dinámica con una amplitud del 2% respecto al espesor inicial, permite afirmar que este rango de deformaciones altera mínimamente a la arquitectura del andamio y a su capacidad a aguantar las deformaciones periódicas. En cambio, la aplicación de amplitudes de deformación mayores tiende a colapsar la estructura tridimensional, exigiendo la redistribución de sus trabéculas para resistir de forma estable a las cargas impuestas.

#### 4.2.2. Permeabilidad.

Los resultados de las  $\Delta P$  medidas y de las  $k$  calculadas se reportan en la Tabla 5 y las Figuras 4.8 y 4.9. Mediante un análisis estadístico “One-Way ANOVA” aplicado a los datos de  $\Delta P$  y  $k$ , se reveló una diferencia significativa entre los resultados para las muestras deformadas y los del control, que corresponden al estado previo al ensayo. Por lo cual se descartan los posibles vínculos entre estas dos condiciones. Tal y como se puede apreciar en la Figura 4.8, la permeabilidad  $k$  va incrementando en acorde con la amplitud de la deformación dinámica que se impuso a la estructura tridimensional de **PLLA**. Esta tendencia apoya las hipótesis anteriormente formuladas. A mayor amplitud de deformación, las trabéculas delgadas no resisten a la carga impuesta y colapsan, lo cual implica la formación de espacios vacantes y, por consecuente, un aumento del número y tamaño de macro-poros dentro de la arquitectura tridimensional. La Figura 4.7 ilustra la repartición de las trabéculas de distintos tamaños dentro de un andamio de **PLLA** sin deformar. Se pueden distinguir claramente las trabéculas más delgadas de las más gruesas.

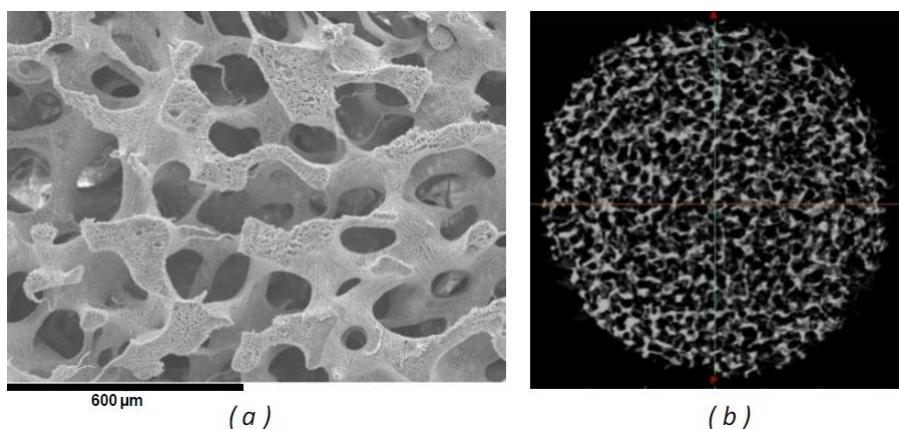


Figura 4.7: Imagen por Microscopía Electrónica de Barrido (a) y micro-tomografía (b) de un andamio estructural de PLLA.

Fuente: [17]

Además, un detalle relevante se observó durante el protocolo del ensayo de permeabilidad: transcurrido 24h después de la experimentación, las muestras se recuperaron totalmente de su deformación acumulada en el caso de una deformación del 2% con respecto al espesor inicial. Para las deformaciones del 5 y 10%, la deformación acumulada se redujo respectivamente hasta el 1 y el 3% del espesor inicial. Este fenómeno, junto con las observaciones anteriores, justifica el comportamiento estudiado para la permeabilidad.

Finalmente, el alto error típico asociado a la  $k$  para la amplitud de deformación del 10% puede interpretarse como una heterogeneidad elevada de la estructura tridimensional, consecuencia de la redistribución de sus trabéculas.

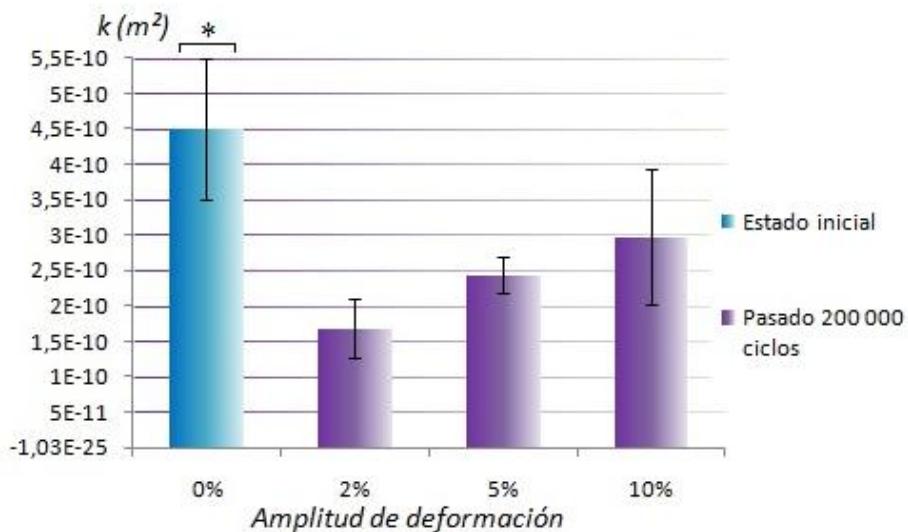


Figura 4.8: Permeabilidad del andamio de PLLA para cada amplitud de deformación dinámica aplicada durante 200 000 ciclos.

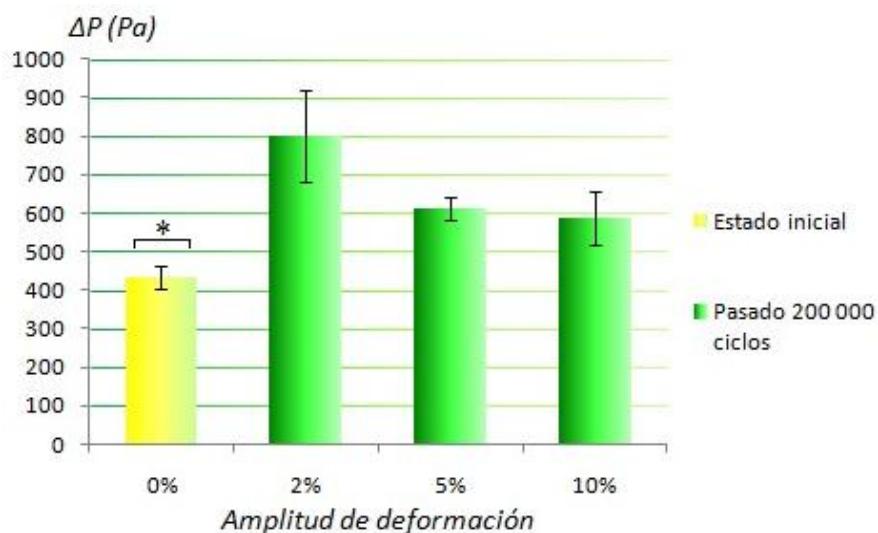


Figura 4.9: Presión diferencial para cada amplitud de deformación dinámica aplicada al andamio de PLLA durante 200 000 ciclos.

Amplitud de deformación	$\Delta P (Pa)$	$k (m^2)$
0% (control)	$434,41 \pm 31,22$	$( 4,51 \pm 0,99 ) \cdot 10^{-10}$
2%	$801,63 \pm 118,05$	$( 1,68 \pm 0,42 ) \cdot 10^{-10}$
5%	$610,32 \pm 29,75$	$( 2,44 \pm 0,26 ) \cdot 10^{-10}$
10%	$587,58 \pm 72,68$	$( 2,98 \pm 0,95 ) \cdot 10^{-10}$

Tabla 5: Resultados de  $\Delta P$  y de  $k$  para los andamios de PLLA sometidos a deformaciones dinámicas durante 200 000 ciclos.

### 4.3. Conclusiones.

El protocolo experimental diseñado y elaborado para estudiar el comportamiento del andamio de **PLLA** frente a deformaciones dinámicas permitió evaluar la influencia de la amplitud de la deformación impuesta a la estructura polimérica inmersa sobre su permeabilidad. Se establece que una amplitud de deformación del 2% respecto al espesor inicial del andamio es la más tolerada por su estructura, la cual conserva una conducta estable y no acumula deformación a lo largo del experimento. Mientras que frente a deformaciones de mayor amplitud, la estructura tridimensional de **PLLA** se ve alterada por el cúmulo de las cargas compresivas y su arquitectura se readapta mediante la deformación de las trabéculas, volviéndose más heterogénea. La permeabilidad del andamio en su condición final permanece dentro del rango de valores tolerables para su uso como injerto en regeneración de cartílago articular.

La tendencia de la estructura tridimensional de **PLLA** a modificar su conformación es un comportamiento crítico y no despreciable para el cultivo celular dinámico *in vitro* y la implantación *in vivo* del andamio, teniendo en cuenta las condiciones fisiológicas de compresión a las que estará expuesto para tal uso.

# Capítulo 5

## Conclusiones y trabajos futuros.

### 5.1. Conclusiones.

A lo largo de este trabajo, se han desarrollado diferentes metodologías para evaluar experimentalmente el comportamiento del andamio estructural de **PLLA** en entorno dinámico. La realización de las mismas ha permitido determinar las siguientes conclusiones, que se delinean agrupadas por las siguientes temáticas:

#### Comportamiento de la permeabilidad bajo gradientes de deformación:

- Conforme se comprime el andamio, su permeabilidad y su porosidad disminuyen hasta llegar a un supuesto colapso.
- Los macro-poros de la estructura tridimensional colapsan bajo las deformaciones aplicadas, lo que contribuye a la homogeneización de la arquitectura del andamio.
- La heterogeneidad de la estructura en su estado inicial, y la diferencia significativa entre su permeabilidad y la de los estados deformados, debe tomarse en cuenta a la hora de diseñar el andamio de **PLLA** en vista de optimizar su comportamiento para su posterior uso tanto *in vitro* como *in vivo*.

#### Comportamiento de la permeabilidad durante un proceso de degradación bajo flujo:

- El protocolo experimental resultó ser inapropiado e insuficiente para las condiciones en las que se deseó degradar los andamios de **PLLA**.
- La falta de esterilidad de la muestras y de los componentes del circuito fluídico para el ensayo de degradación han sido un factor relevante en el origen y la proliferación de la contaminación fúngica en los andamios de **PLLA**.

#### **Comportamiento del andamio bajo deformaciones dinámicas:**

- Una amplitud de deformación del 2% respecto al espesor inicial del andamio afecta mínimamente sus propiedades estructurales.
- A mayor amplitud de deformación, la estructura tridimensional se ve alterada por el cúmulo de cargas compresivas y su arquitectura se readapta mediante la deformación de las trabéculas, volviéndose más heterogénea.
- La tendencia de la estructura tridimensional de **PLLA** a modificar su conformación es un comportamiento crítico y no despreciable para el cultivo celular dinámico *in vitro* y la implantación *in vivo* del andamio.

## **5.2. Trabajos futuros.**

A continuación se citan algunas líneas de trabajo futuro que se podrían abordar, para permitir ahondar más en la caracterización del andamio de **PLLA** y en la valoración de su funcionalidad para sus futuras aplicaciones:

- Elaborar un modelo computacional del comportamiento del andamio de **PLLA** bajo deformación, basado en la simulación de las propiedades mecánicas y estructurales del andamio, partiendo de los resultados obtenidos experimentalmente en este trabajo.
- Estudiar el comportamiento y la evolución de las propiedades mecánicas (modulo de Young, modulo agregado) y estructurales (porosidad, tamaño de poros) del andamio bajo deformaciones dinámicas.
- Estudiar y perfeccionar una metodología para caracterizar las propiedades mecánicas de la estructura tridimensional de **PLLA** bajo degradación dinámica con flujo.
- Elaborar una metodología para estudiar la estimulación de células, mediante el cultivo celular dinámico dentro del andamio.

# Bibliografía.

- [1] Sociedad Española de Reumatología, *La artrosis*, Folletos de la SER. 2009.
- [2] U. Meyer y H.P. Wiesmann, *Bone and cartilage engineering*. 2006, Springer: Berlin.
- [3] K.A. Athanasiou, G.G. Niederauer y C.M. Agrawal, *Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers*. Biomaterials, 1996. 17(2):93-102
- [4] G. Yihong, Z. Qingliang, G. Changyou y S. Jiacong, *In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of (polyl-lactic) acid scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method*. Acta Biomaterialia, 2007. 3(4): 531-540.
- [5] A. Morato, I. Narváez y C. Toribio, Ciencias de la Salud - *El futuro de los biomateriales tendencias tecnológicas a medio y largo plazo*, Observatorio de Pros-pectiva Tecnológica Industrial y Federación Española de Empresas de Tecnología Sanitaria. 2004, Cyan Proyectos y Producciones Editoriales S.A.: Madrid.
- [6] B. Valdez, M. Schorr, E. Valdez. y M. Carrillo, *Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano*. Ciencia y desarrollo en internet, 2005.
- [7] Gustavo A. Abraham & al., *La ciencia y la ingeniería de los biomateriales, un desafío interdisciplinario*. La Ciencia Hoy, 1998. 49(9).
- [8] J.R. Steadman, W.G. Rodkey, S.B. Singleton y K.K. Briggs, *Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results*. Operative Techniques in Orthopaedics, 1977. 7(4): 300-304.
- [9] V.C. Mow, M.H. Holmes y W.M. Lai, *Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review*. Journal of Biomechanics, 1984. 17(5): 377-39.
- [10] M.B. Abhijit y B.R. James, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. British Medical Bulleting, 2008: 77-95.
- [11] M. Marcacci, M. Berruto, D. Brocchetta, A. Delcogliano, D. Ghinelli, A. Gobbi, E. Kon, L. Pederzini, D. Rosa, G.L. Sacchetti, G. Stefani y S. Zanasi, *Articular cartilage engineering with hyalograft(R) C: 3-Year clinical results*. Clinical Orthopaedics & Related Research, 2005. 435: 96-105.
- [12] R. Dorotka, U. Bindreiter, K. Macfelda, U. Windberger y S. Nehrer, *Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair*. Osteoarthritis and Cartilage, 2005. 13(8): 655-664.
- [13] M. Chiquet, A.S. Renedo, F. Huber y M. Flück, *How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?*. Matrix Biol, 2003. 22: 73–80.
- [14] G. Falke y A. Atala, *Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular*. Arch.argent.pediatr 2000. 98(2): 103.
- [15] J.K. Suh y H.W. Mathew, *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review*. 2000 24: 2589-2598.
- [16] L. Budyanto, Y.Q. Goh y C.P. Ooi, *Fabrication of porous poly(L-lactide) (PLLA) scaffolds for tissue engineering using liquid–liquid phase separation and freeze extraction*. J Mater Sci: Mater Med, 2009. 20: 105–111.
- [17] V.A. Acosta Santamaría, *Caracterización mecánica y simulación de los principales factores involucrados en la Ingeniería Tisular del cartílago articular*. 2011, Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

- [18] B. A. Harley, J.H. Leung, E.C. Silva y L.J. Gibson, *Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds*. Acta Biomaterialia, 2007. 3(4): 463-474.
- [19] Ming-Hua Ho, Pei-Yun Kuo, Hsyue-Jen Hsieh, Tzu-Yang Hsien, Lein-Tuan Hou, Juin-Yih Lai, Da-Ming Wang, *Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods*. Biomaterials, 2004. 25(1): 129-138.
- [20] T.M. Freyman, I.V. Yannas y L.J. Gibson, *Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering*. Progr. Mater. Sci. , 2001. 46: 273-282.
- [21] A. Al-Munajjed, M. Hien, R. Kujat, J.P. Gleeson y J. Hammer, *Influence of pore size on tensile strength, permeability and porosity of hyaluronan-collagen scaffolds*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. 19(8): 2859-2864.
- [22] F.J. O'Brien, B.A. Harley, M.A. Waller, I. Yannas, L.J. Gibson y P. Prendergast, *The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering*. Technology and Health Care, 2007. 15(1): 3-17.
- [23] R.D. Brígido, J.M. Estellés, J.A. Sanz, J.M. García-Aznar y M. S. Sánchez, *Polymer scaffolds with interconnected spherical pores and controlled architecture for tissue engineering: Fabrication, mechanical properties, and finite element modeling*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2007. 81B(2): 448-455.
- [24] D.Lacroix, A. Chateau, M.P. Ginebra y J.A. Planell, *Micro-finite element models of bone tissue-engineering scaffolds*. Biomaterials, 2006. 27(30): 5326-5334.
- [25] M.V. Chor y L. Wei, *A permeability measurement system for tissue engineering scaffolds*. Meas sci Tecnol 2007. 18: 208-216
- [26] J.A. Sanz, C. Kasper, M. van Griensven, J.M. Garcia-Aznar, I. Ochoa y M. Doblare, *Mechanical and flow characterization of Sponceram® carriers: Evaluation by homogenization theory and experimental validation*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2008. 87B(1): 42-48.
- [27] I. Ochoa, J.A. Sanz, J.M. Garcia-Aznar, M. Doblare, D.M. Yunos y A.R. Boccaccini, *Permeability evaluation of 45S5 Bioglass-based scaffolds for bone tissue engineering*. Journal of Biomechanics, 2009. 42(3): 257-60.
- [28] J.M. Mansour y V.C. Mow, *The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures*. Journal of Bone and Joint Surgery, 1976. 58(4): 509-516.
- [29] W. Li, J.A. Cooper, R.L. Mauck y R.S. Tuan, *Fabrication and characterization of six electrospun poly([alpha]-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications*. Acta Biomaterialia, 2006. 2(4): 377-385.
- [30] D.W. Hutmacher, *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. 21(24): 2529-2543.
- [31] Y.Y. Kang, Y. Yadong, H. Guangfu, L. Zhongbing, X. Xiaoming and G. Xiujuan Zhao, *A study on the in vitro degradation properties of poly(L-lactic acid)/beta-tricalcium phosphate (PLLA/beta-TCP) scaffold under dynamic loading*. Medical engineering & physics, 2009. 31(5): 589-94.
- [32] G. Wei y P.X. Ma, *Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2004. 25(19): 4749-4757.
- [33] Lee C., Grad S., Wimmer M., Alini M., *The influence of mechanical stimuli on cartilage tissue engineering*. Topics in Tissue Engineering, vol.2. 2005.
- [34] J.D. Kisiday, M. Jin, M.A. DiMicco, B. Kurz, A.J. Grodzinsky, *Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds*. Journal of Biomechanics, 2004. 37: 595-604.
- [35] Y. Yang, Y. Zhao, G. Tang, H. Li, X. Yuan, Y. Fan, *In vitro degradation of porous poly(L-lactide-co-glycolide)/beta-tricalcium phosphate (PLGA/beta-TCP) scaffold under dynamic and static conditions*. Polymer Degradation and Stability, 2008. 93: 1838-1845.
- [36] K. G. Holt, S.F. Jeng, R. Ratcliffe, J. Hamill, *Energy cost and stability during walking at the preferred stride frequency*. Journal of Motor Behaviour, 1995. 27(2): 164-178.
- [37] *BioDynamic Test Instrument Reference Manual*, 2008-2011. BOSE Corporation.
- [38] *Poly-lactic acid*. Wikipedia, 2012.

## **Parte II**

### **Anexos**



## Anexo A

### Proceso de síntesis de los andamios de PLLA.

El *Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular* de la Universidad Politécnica de Valencia (CBIT) optó por realizar la síntesis de andamios biodegradables sintéticos basados en el ácido poli-L-láctico (**PLLA**). La fórmula química de este polímero se representa en la Figura A.1. Estos andamios estaban concebidos para ser empleados, en última instancia, en la regeneración del tejido osteocondral articular. Para la obtención de los andamios se combinaron los métodos de *Extracción de Solvente en Frío* o "*Freeze Extraction*" (**FE**) y de *Eliminación de Partículas por Disolución* o "*Particle Leaching*" (**PL**), lo que permite obtener una estructura con doble porosidad. Un macro-poro que permite alojar a las células y la matriz extracelular sintetizada, y un micro-poro que favorece el transporte de oxígeno, nutrientes y otras sustancias en el proceso de regeneración del tejido. Esta micro-porosidad permite además regular la velocidad de degradación del material manteniendo la porosidad y tamaño de macro-poro constante.

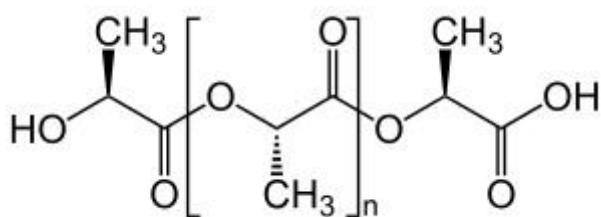


Figura A.1: Diagrama de una molécula de ácido poli-L-láctico (PLLA).  
Imagen adaptada [38].

El proceso de fabricación mediante **FE** consiste en reducir suficientemente la temperatura para provocar una separación de fase líquido-líquido, donde el solvente y el polímero cristalizan formando una fase pobre y otra rica en polímero. Cabe destacar que para este estudio en particular, puesto que la mezcla polímero/solvente se enfriá por contacto directo con nitrógeno líquido, en realidad se obtiene una separación sólido-líquido.

A continuación, se elimina la fase pobre en polímero utilizando un disolvente a baja temperatura para que no interactúe con la fase rica en polímero, dejando una estructura micro-porosa. Hay que procurar que durante la extracción en frío, el polímero se mantenga por debajo de su temperatura de transición vítrea, para que la extracción del solvente del polímero se produzca sin colapso de la estructura micro-porosa (provocada por la separación de los cristales del solvente en el proceso de congelación).

La macro-estructura porosa se consigue mediante la adición de partículas de porógeno a la mezcla de partida polímero/solvente. El porógeno es eliminado por el método **PL** haciendo uso de un solvente en el que, una vez más, no se permita la disolución del polímero. De este modo, el espacio originalmente ocupado por el porógeno se convierte en poros de diámetro similar al de las partículas insertadas.

En el caso concreto de la fabricación de los andamios para este proyecto, se usó un **PLLA** de grado médico (PURASORB PL 18) con una viscosidad de 1,8 dl/g. que fue adquirido a Purac Biomaterials (Holanda). Las esferas de poli-etil-metacrilato de Elvacite (2043 acrylic resin) con un diámetro de 120 a 180  $\mu\text{m}$  son utilizadas como porógeno, y dioxano 1-4 (98% de pureza - Sigma Aldrich) fue utilizado como solvente del **PLLA** y es el responsable de la generación del micro-poro. Las proporciones de **PLLA/porógeno** fueron de 1:1 y la concentración de **PLLA** en la solución de dioxano de 15%.

El polímero congelado (con nitrógeno líquido) es sumergido en el etanol (Scharlau - 99,9%) pre-refrigerado para eliminar los cristales de dioxano a -20°C. El etanol se cambia reiteradamente hasta que el dioxano se extraiga totalmente. Posteriormente, el porógeno es disuelto por inmersión en etanol a 40°C bajo agitación y después de varios cambios del etanol. Las muestras fueron cortadas en cilindros de  $\pm 6$  mm de diámetro y espesor de  $\pm 3$  mm. Finalmente, los andamios son secados al vacío a 70°C y esterilizados.

La razón para seleccionar el dioxano como solvente de los polímeros biodegradables es que tiene un punto de ebullición relativamente bajo (101,1°C), con una temperatura de fusión bastante elevada (11,8°C), lo que permite una fácil eliminación por un proceso de **FE**. El dioxano es un éter cíclico con la fórmula C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> con un esqueleto de 4 átomos de carbono y 2 átomos de oxígeno en posiciones opuestas dentro de un hexágono (ver Figura A.2). En condiciones normales se trata de un líquido volátil e incoloro. Es completamente miscible con el agua, etanol y éter.

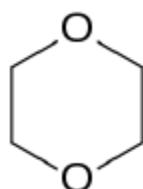


Figura A.2: Diagrama de una molécula de dioxano 1-4.

## Anexo B

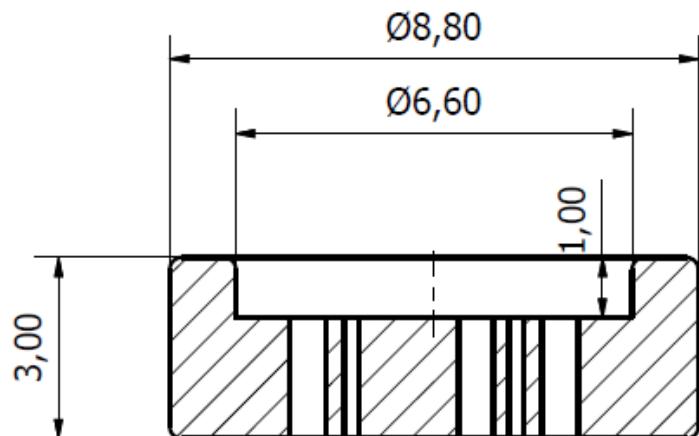
### Diseño de discos porosos para los ensayos de permeabilidad.

A continuación se presentan los planos de diseño y fabricación de los discos porosos utilizados en los ensayos de permeabilidad realizados para la caracterización de los andamios estructurales de **PLLA** de este trabajo. El diseño CAD y los planos se realizaron mediante el programa Autodesk® Inventor Profesional, y las piezas se fabricaron con técnicas de prototipado rápido (Figura B.1).

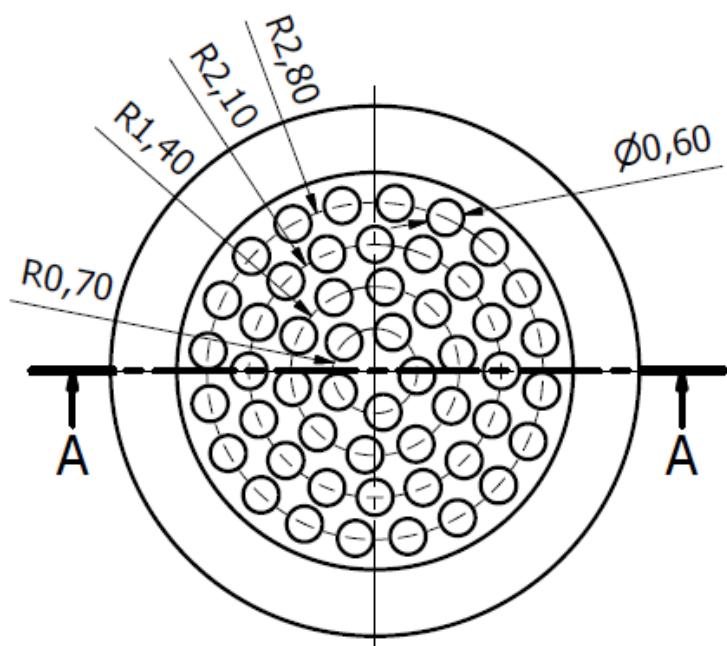
Se realizaron con el doble objetivo de sujetar el andamio de **PLLA** dentro de una cámara P3D-6, y poder aplicarle un gradiente de deformación simultáneamente. El tamaño y la repartición de sus poros se diseñaron de tal forma que la pieza tenga la mayor permeabilidad posible, manteniendo una solidez adecuada.



Figura B.1: Representación tridimensional de un disco poroso (izquierda) y discos porosos fabricados por prototipado rápido (derecha).



A-A



Diseño de Alex Duizabo Ingalaturre	FECHA 10/04/2012
Ensayo de permeabilidad	
Disco permeable	Escala 8:1

## Anexo C

### Presentación de los sistemas BOSE-ElectroForce® BioDynamic.

Los biorreactores BioDynamic 5210 y 5710 fabricados por BOSE-ElectroForce®, que se encuentran a disposición del *Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón* (I3A) de la Universidad de Zaragoza, son sistemas que permiten realizar ensayos mecánicos y cultivos celulares dinámicos para el uso en *Ingeniería de Tejidos*.

Las aplicaciones de estos equipos van desde la caracterización de múltiples muestras de gran variedad, sean tejidos biológicos o biomateriales, hasta el estímulo mecánico de cultivos celulares dentro de andamiajes. Su capacidad de movimiento uniaxial permite administrar cargas de tensión o de compresión y flujos pulsátiles de estímulo programables con una alta precisión. El rango de movimiento del armazón de carga es de 12,7 mm con una precisión de 0,001 mm, y el rango de medida de cada célula de carga es de 225 N con una resolución de 0,01 N. El sistema 5210 (Figura C.1) consta de múltiples cámaras versátiles que se adaptan a distintos tejidos (vasos sanguíneos, hueso, cartílago, etc.). El diseño de los equipos permite su instalación parcial o total dentro de una incubadora de cultivos celulares.

El sistema mono-espécimen BioDynamic 5710 (Figura C.2) está equipado con un micrómetro de láser para medir la variación del diámetro externo de muestras tubulares como por ejemplo vasos sanguíneos, con un rango de medida de 0,3 a 30 mm y una frecuencia de escaneo de 400 Hz. Otro accesorio armado a los equipos BioDynamic es el extensómetro digital (*Digital Video Extensometer*, DVE) para el cálculo de deformaciones primarias, secundarias y de cizalladura (basado en las fórmulas de Green-Lagrange) con resoluciones altas.

Para el correcto uso y mantenimiento de los equipos BioDynamic, se siguió una formación profundizada a través de video-conferencias online desde el *Centro de Aprendizaje* BOSE-ElectroForce® (Learning Center), y tutorías personales con el representante técnico comercial de BOSE-ElectroForce®, Francia.



Figura C.1: *Sistema Biodynamic 5210 multi-espécimen (izquierda), y sistema generador de pulso fluídico (derecha).*



Figura C.2: *Sistema Biodynamic 5170 mono-espécimen con micrómetro de láser.*



## TRAINING CERTIFICATE

I herewith Jacques Laudinet, Regional Manager of the Bose-ElectroForce System Group for France-Spain-Portugal, certifies that :

-Mr Alejandro Duizabo Ingalaturre, Biomedical Engineering Master Student, University of Zaragoza

Has received the complete training on the WinTest7 software and on the associated utilization of the Bose Biodynamic test systems installed at :

*-Biomedical Research Networking center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Aragón Institute of Engineering Research (I3A), Group of Structural Mechanics and Materials Modelling (GEMM)  
Campus Rio Ebro, C/ Mariano Esquillor s/n, Edificio I+D+I  
50018, Zaragoza, Spain*

This training and associated practices have been successfully performed on:

- December 15<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> 2011.

BOSE SAS

12, RUE DE TEMARA - 78100 SAINT-GERMAIN-EN-LAYE France  
Téléphone : 33 (0)1 30 61 63 63 - FAX COMMERCIAL : 33 (0) 1 30 61 63 88  
S.A.S. AU CAPITAL DE 2 640 965 € - RC VERSAILLES B 311 068 266 - APE 514 F



## **Anexo D**

### **Resumen de las prácticas del Trabajo Fin de Máster.**

“Para el cumplimiento de la parte práctica del presente Trabajo Fin de Máster, he elegido asistir, como observador, a las intervenciones quirúrgicas que se realizaron en el área de Quirófanos del Hospital Royo Villanova en Zaragoza, durante el periodo del 9 al 13 de Julio del 2012.

Bajo la tutela del Doctor José Antonio Fatás Cabeza, Jefe de Servicio en Cirugía general y del aparato digestivo del Hospital Royo Villanova, estuve presente en cada intervención quirúrgica realizada durante mi estancia, junto con el equipo de cirujanos y enfermeras del área de Quirófanos. Pude observar con atención el procedimiento de las operaciones, fueran con métodos convencionales o de mínima invasión, desde el ingreso de los pacientes en los bloques quirúrgicos hasta su salida.

Asistí a intervenciones laparoscópicas, principalmente de aparato digestivo, realizadas sobre casos de obesidad mórbida, cánceres de colon y estómago, apendicitis agudas, además de intervenciones traumatológicas de colocación de prótesis de rodilla, cadera, placas de fijación de fracturas óseas, ligamentoplastia, y operación de juanete. En presencia de los representantes de casas comerciales de prótesis, como Zimmer® y Stryker®, y de instrumentación quirúrgica y endoscópica, aproveche la oportunidad para compartir y profundizar mis conocimientos con ellos.

Esta experiencia me permitió reflexionar y desarrollar mis ideas sobre la mejora de las técnicas quirúrgicas laparoscópicas y traumatológicas, y de su instrumentación. Aunque esta parte práctica no tuvo relación directa con el tema del TFM, me facilitó vincular correctamente los trabajos en la investigación en *Ingeniería de los Tejidos* con su posterior e hipotética aplicación *in vivo* en futuros pacientes.”

Don José Antonio Fatás Cabeza, Jefe de Servicio de Cirugía de Aparato Digestivo del Hospital Royo Villanova en Zaragoza,

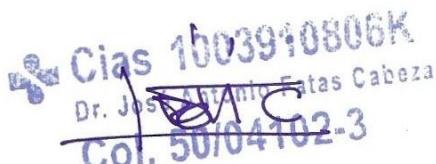
CERTIFICA:

Que Don Alejandro Duizabo Ingalaturre, con D.N.I núm. 73428249J, alumno del Máster Universitario en Ingeniería Biomédica en la Universidad de Zaragoza, ha estado presente durante la semana del 9 al 13 de Julio del 2012 en el área de Quirófanos del Hospital Royo Villanova en Zaragoza, y ha asistido a las intervenciones quirúrgicas que se han realizado durante este periodo para el correcto cumplimiento práctico de su Trabajo de Fin de Máster.

La actividad del alumno ha sido la observación detallada de intervenciones quirúrgicas laparoscópicas y traumatológicas, y la reflexión sobre la mejora de éstas técnicas y de su instrumentación.

El alumno ha estado en contacto directo con los cirujanos, enfermeras y representantes de casas comerciales durante su estancia.

Su actitud y su aprovechamiento ha sido óptimo.

  
Cias 1603910806K  
Dr. José Antonio Fatás Cabeza  
Col. 50/04102-3

Fdo.: J A Fatás Cabeza  
Jefe de Servicio  
Cirugía General y del Aparato Digestivo

Zaragoza a 13 de Julio de 2012

## **Anexo E**

### **Trabajos complementarios.**

A lo largo del desarrollo del presente Trabajo Fin de Máster, participe y colabore voluntariamente en los siguientes trabajos secundarios:

#### **Pruebas de cultivo celular dinámico con un biorreactor de flujo:**

EBERS®, empresa “spin-off” de la Universidad de Zaragoza, desarrolló la fabricación de un biorreactor de flujo (TEB1000) para realizar cultivos celulares dinámicos. Se hicieron pruebas de cultivo celular en andamios cerámicos (Sponceram®) para evaluar el correcto funcionamiento del dispositivo, y realizar por la misma ocasión un video tutorial del protocolo de montaje de los componentes del sistema. Se puede visualizar este tutorial en las siguientes páginas web:  
<http://www.ebersmedical.com/>  
[http://www.youtube.com/watch?v=KWQyhL86cDs&feature=player\\_embedded](http://www.youtube.com/watch?v=KWQyhL86cDs&feature=player_embedded).

#### **Ensayos de fatiga de biomateriales:**

Se colaboró en la realización del Proyecto Fin de Carrera “*Caracterización Mecánica de hidrogeles de Pluronic® para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos*” del alumno Alexis Allueva Arjol, diseñando y elaborando un protocolo experimental para estudiar la evolución de las propiedades mecánicas de hidrogeles de Pluronic® de dos concentraciones distintas, bajo un ambiente dinámico de deformación. Se realizaron los ensayos en condiciones de cultivo celular dinámico, usando el biorreactor BOSE-ElectroForce® BioDynamic 5210.

Siguiendo el mismo protocolo definido para los hidrogeles de Pluronic®, se realizaron ensayos experimentales para caracterizar mecánicamente unos hidrogeles híbridos de PEA/PHEA (Poli-etil acrilato/Poli-hidroxietil acrilato) bajo deformaciones dinámicas. Los resultados fueron destinados a la elaboración del PFC de Carlos Pelegay Salas, “*Caracterización de biomateriales compuestos para su uso en Ingeniería de Tejidos*”.

### Publicación de un artículo de revista científica:

Se colaboró en la elaboración del artículo “*Computational methodology to determine fluid related parameters of non-regular three-dimensional scaffolds*”, publicado por *Acosta Santamaría V.A, Malvè M., Duizabo A., Mena Tobar A., Gallego Ferrer G, García Aznar J.M., Doblare M., y Ochoa Garrido I.*, que ha sido aceptado en la revista *Annals of Biomedical*.

### Ensayos de permeabilidad de andamios de $\beta$ -TCP:

Para la elaboración de la tesis doctoral de Sonja Kress, titulada ”*Osteogenic differentiation of Human Mesenchymal stem cells by the design of a micro-environment*”, se realizaron una serie de ensayos de permeabilidad sobre andamios cerámicos Sponceram 30-90 (Zellwerk GmbH) y Osseolive (Curasan), destinados a la investigación en ingeniería tisular de hueso. Se empleó el permeámetro patentado por el grupo *GEMM*.

### Degradación de bloques de PLLA:

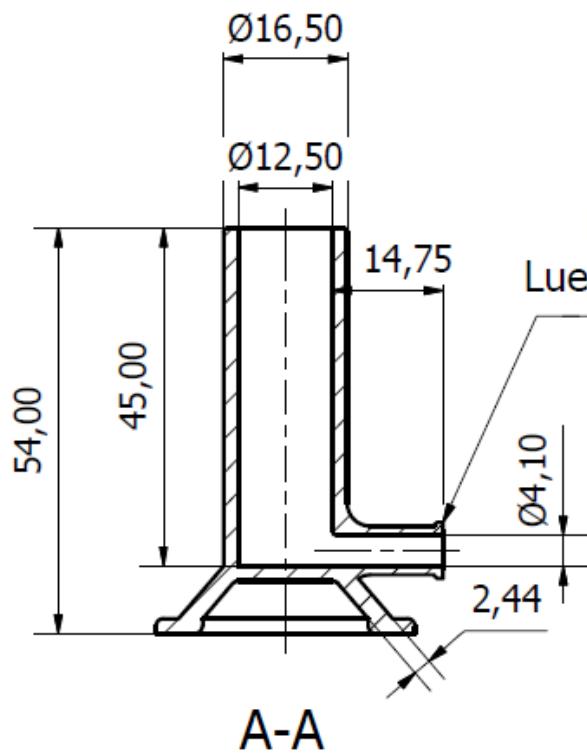
En colaboración con el grupo CBIT de la Universidad Politécnica de Valencia, se implementó un protocolo experimental para estudiar y caracterizar la degradación de bloques de ácido poli-L-láctico (**PLLA**). Las muestras se mantuvieron inmersas en PBS y en SBF durante tiempos de seguimiento de 6, 12, 24 y 36 semanas y a temperatura de 37°C. Se evaluaron la pérdida de masa, los cambios de volumen, y las propiedades mecánicas (módulo de Young  $E_s$ , y módulo agregado  $H_a$ ) mediante ensayos de compresión uniaxial (confinada y no confinada).

### Diseño de un “gradient maker”:

Un gradient maker es un instrumento usado en bioquímica para producir un gradiente lineal de concentración al mezclar dos soluciones acuosas. Dado el alto precio comercial del dispositivo, y su necesidad en los laboratorios, se realizó un diseño CAD de un gradient maker para ser fabricado mediante técnicas de prototipado rápido con el fin de minimizar los costes (Figura E.1). A continuación, se presentan los planos del diseño y fabricación de los componentes del instrumento.

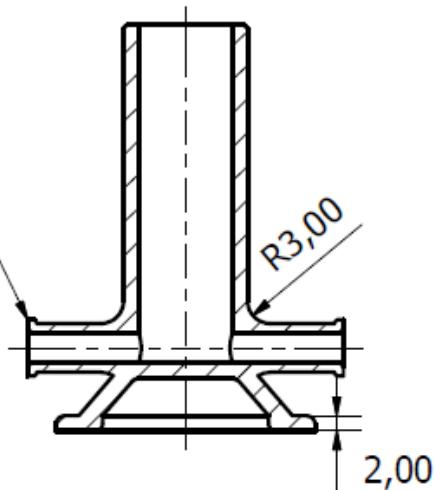


Figura E.1: *Diseño tridimensional de los componentes del gradient maker (izquierda), y piezas fabricadas por prototipado rápido, ensambladas (derecha).*

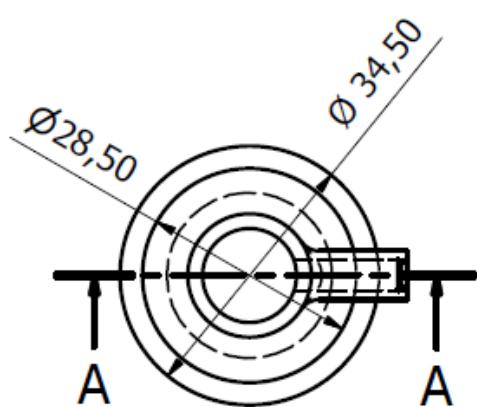


A-A

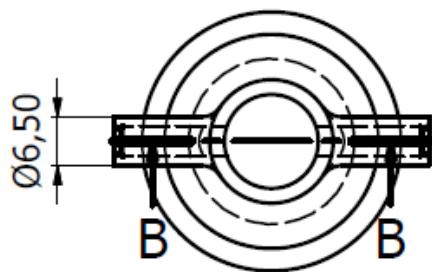
Rosca  
Luer hembra



B-B



Tubo 1



Tubo 2

Diseño de Alex Duizabo Ingalaturre	FECHA 13/09/2012
Gradient Maker	
Tubo 1 / Tubo 2	Escala 1:1

