



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Simulación por Elementos Finitos del proceso de
rotura de interfaces cohesivas de colágeno

Autor

Daniel Ortigosa de Carlos

Directores

José Manuel García Aznar

María José Gómez Benito

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2015



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./D^a. Daniel Ortigosa De Carlos,

con nº de DNI 73024104R en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster)

Grado, (Título del Trabajo)

Simulación por Elementos Finitos del proceso de rotura de interfaces

cohesivas de colágeno

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, a 23 de Junio de 2015

Fdo: Daniel Ortigosa De Carlos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a la directora de este trabajo, María José, por su amabilidad y ayuda en este trabajo, incluso durante el nacimiento de su hija.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi otro tutor, Manu, y al resto de profesores de esta escuela por haberme enseñado más que meros conceptos teóricos.

No quiero olvidarme de Cristina y Nieves, del laboratorio del I3A, que siempre han estado dispuestas a enseñarme todo lo que podían.

Por último, y no por ello menos importante, agradecer a todos los familiares y amigos que me han apoyado durante estos años y con los que he compartido momentos inolvidables: a mis padres, hermana, abuelas, tías y, especialmente, a Alejandra.

Sin duda si a alguien dedico este trabajo es a mi abuelo Julio, quien me enseñó que el trabajo y esfuerzo constante es siempre gratificante.

RESUMEN

Simulación por Elementos Finitos del proceso de rotura de interfaces cohesivas de colágeno

Entender el proceso mecánico de cicatrización de heridas puede ayudar a mejorar su tratamiento. Aunque todavía no se comprende completamente este proceso, se sabe que el éxito en la curación de las heridas depende fuertemente de la contracción mecánica que ejercen las células y que, concretamente, son los fibroblastos junto con los miofibroblastos los principales tipos celulares que desarrollan esta contracción.

Con el objetivo de entender las fuerzas que ejercen los fibroblastos, se realizó un primer experimento en laboratorio que pretendía recrear el ambiente celular de la cicatrización de heridas. Para ello, se insertan fibroblastos junto con un gel de colágeno en dispositivos microfluídicos. Estos pequeños dispositivos trabajan con niveles de 10^{-9} hasta 10^{-18} litros, destacando sobre otras técnicas experimentales por permitir un mayor control del proceso así como por su menor tiempo de procesamiento.

En estos experimentos, sin embargo, el colágeno se despegaba del dispositivo debido a las fuerzas de contracción generadas por los fibroblastos, impidiendo su análisis. Se observó que una excesiva concentración de células era el detonante de la pérdida de adhesión del colágeno al dispositivo. También se concluyó que este despegue era progresivo una vez se había iniciado el daño del mismo.

Por tanto, en el presente Trabajo Fin de Grado se ha simulado por Elementos Finitos (ABAQUS) este experimento con el objetivo de estimar, en última instancia, cuál es la concentración óptima de fibroblastos que impide el despegue del colágeno. Como primera aproximación se ha modelado el colágeno como un material hiperelástico según un modelo Neohookeano.

Además, para poder caracterizar la adhesión del colágeno al dispositivo microfluídico, se desarrolló otro experimento en laboratorio en el que no se incluían los fibroblastos pero se aplicaba un gradiente de presión entre los extremos del dispositivo microfluídico, lo cual permitía controlar mejor el proceso de rotura del gel. Este experimento se ha simulado también por Elementos Finitos (ABAQUS) en el presente trabajo, modelizando la adhesión entre colágeno y el dispositivo con elementos interfaz cohesivos.

Las propiedades de la adhesión determinadas en este experimento se incluyeron en el test de contracción celular, en el que sí estaban presentes los fibroblastos. El tamaño de los elementos de la malla se ha seleccionado a partir del tamaño aproximado de los fibroblastos para poder simular estas células como totalmente embebidas en la matriz de colágeno. Además, dada la disposición no uniforme de estas células en el dispositivo, se tuvo que seleccionar aleatoriamente los elementos de la malla en los que se encontrarían las células, implementando para ello un código en BlueJ (Java). Se comenzó imponiendo una concentración muy elevada y se ha ido disminuyendo progresivamente hasta determinar la concentración celular a partir de la cual la adhesión entre colágeno y dispositivo se mantiene.

Finalmente, se ha determinado que el rango de concentración de fibroblastos estimado en las simulaciones se encuentra en concordancia con los resultados experimentales; por encima de este rango, la fuerza de contracción es tan elevada que el colágeno se empieza a despegar de las paredes del dispositivo. Estos resultados permitieron validar el modelo propuesto, lo cual hizo posible también extrapolar este modelo a otro tipo celular, los osteoblastos, caracterizados por desarrollar unas fuerzas de contracción mucho más elevadas que los fibroblastos. Igualmente, el rango hallado en las simulaciones se aproximó al rango de los experimentos de laboratorio.

Índice general

Capítulo 1: Introducción.....	9
1.1. Antecedentes	11
1.2. Objetivo.....	11
1.3. Metodología general.....	11
 Capítulo 2: Determinación de las propiedades de la adhesión colágeno – PDMS.....	 13
2.1. Objetivo.....	13
2.2. Metodología	13
2.3. Descripción del experimento.....	13
2.3.1. Materiales empleados.....	14
2.3.2. Resultados experimentales	14
2.4. Análisis teórico	15
2.4.1. Propiedades de los materiales.....	17
2.4.2. Geometría	19
2.5. Simulación por Elementos Finitos	20
2.5.1. Mallado	20
2.5.2. Condiciones de contorno y cargas	21
2.6. Resultados	21
 Capítulo 3: Determinación de la concentración celular óptima	 24
3.1. Objetivo.....	24
3.2. Metodología	24
3.3. Descripción del experimento.....	24
3.3.1. Materiales empleados.....	25
3.3.2. Resultados experimentales	25
3.4. Análisis teórico	26
3.4.1. Propiedades de los materiales.....	26
3.4.2. Geometría	26
3.5. Simulación por Elementos Finitos	27
3.5.1. Mallado	27
3.5.2. Condiciones de contorno y cargas	27
3.6. Resultados	28
3.6.1. Concentración óptima de fibroblastos	28
3.6.2. Verificación de resultados: análisis estocástico.....	29
3.6.3. Concentración óptima de osteoblastos.....	31
 Capítulo 4: Conclusiones y trabajo futuro	 34
 Bibliografía.....	 35

Índice de figuras

Figura 1. (a) Dispositivo microfluídico real; (b) Representación de las partes principales de un dispositivo microfluídico; (c) Representación detallada de la parte central del dispositivo.....	10
Figura 2. Diagrama de flujo sobre la metodología general.....	12
Figura 3 . Disposición del primer experimento y descripción de las partes principales.....	14
Figura 4. (a) Configuración del colágeno al inicio del experimento (escala 100 μm); (b) Configuración deformada del colágeno al término del experimento (escala 100 μm).....	14
Figura 5. Sección de entrada del gel, unidades en micrómetros.....	16
Figura 6. (a) Variación del caudal en 4 minutos impuesto en los experimentos; (b) Variación de presión en función del tiempo a partir de la variación de caudal	17
Figura 7. (a) Curva teórica tensión - deformación de la interfaz; (b) Representación de las direcciones principales de la interfaz.....	18
Figura 8 . Simplificación de la geometría del microchip y condiciones de contorno	19
Figura 9. Dimensiones de la parte simplificada del microchip, en micrómetros	20
Figura 10. Disposición de la interfaz.....	20
Figura 11 - Mallado del microchip	21
Figura 12. (a) Deformada en ABAQUS; (b) Deformada en el experimento.....	22
Figura 13. Representación del mapa de desplazamientos al final del primer experimento	22
Figura 14. (a) Curva tensión - deformación de la interfaz en dirección tangencial 1; (b) Curva tensión (t) deformación (ϵ) de la interfaz en dirección tangencial 2	23
Figura 15. Representación del dispositivo microfluídico del segundo experimento	24
Figura 16. (a) Disposición del gel al inicio del experimento; (b) Disposición del gel al final del experimento.....	25
Figura 17. Dimensiones de la parte simplificada del segundo microchip, en micrómetros	26
Figura 18. Mallado según tamaño de los fibroblastos.....	27
Figura 19. Condiciones de contorno.....	27
Figura 20. (a) Distribución aleatoria de 75 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado.	28
Figura 26. (a) Distribución aleatoria de 25 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado.....	32
Figura 27. (a) Distribución aleatoria de 25 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado.	32
Figura 28. (a) Distribución aleatoria de 45 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado.....	33
Figura 29. (a) Distribución aleatoria de 75 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado.....	33

Capítulo 1

Introducción

En el desarrollo del presente trabajo se estudia el proceso de cicatrización de heridas, fuertemente influenciado por la mecánica. Durante este proceso de cicatrización, el fenómeno de la contracción es uno de los más importantes ya que influye en el tamaño final de la cicatriz y en el éxito o no de la curación.

Las heridas afectan a millones de personas en todo el mundo, no sólo cuando sufren un accidente traumático, sino también como resultado de incisiones en cirugía. En cualquier caso, la cicatrización de heridas se produce después de que ocurra daño en la piel.

La evolución del proceso de cicatrización depende de la severidad del daño que se haya producido en la piel. Si la herida es leve, se cicatriza generalmente a través de una serie de procesos bien organizados sin necesidad de un tratamiento especial, sin embargo, en aquellos casos en los que las heridas causan un daño excesivo es necesario aplicar diferentes técnicas para lograr su curación. El coste anual que generan este tipo de heridas crónicas asciende a los 25000 millones de dólares sólo en los Estados Unidos, afectando a un total de 6.5 millones de personas (Sen et al. 2009).

La cicatrización de heridas se suele dividir en tres etapas superpuestas en el tiempo que pueden durar varios meses o incluso años. Estas etapas se denominan inflamación, epitelización y remodelación (Singer and Clark 1999).

1. La **inflamación** comienza cuando aparece la lesión. En ese momento la matriz extracelular (ECM), definida como el conjunto de fibras que proporcionan resistencia a la piel, se sustituye por un coágulo de sangre proveniente de los vasos rotos y factores de crecimiento inflamatorios, como el derivado de las plaquetas (PDGF), para estimular la actividad celular. Posteriormente, los vasos se cierran para detener el sangrado (hemostasia) y un coágulo de fibrina reemplaza el coágulo de sangre. Las células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) limpian la herida y eliminan bacterias, tejido muerto y otras partículas extrañas, empleando unas 48 horas hasta dejarlo completamente limpio. Finalmente se liberan otros factores de crecimiento (TGF- β y VEGF) que guiarán la próxima etapa.
2. La **epitelización** o formación de nuevo tejido empieza unas horas después de que se produzca la herida, durando entre 2 y 10 días (Gurtner et al. 2008). El coágulo de fibrina es eliminado y reemplazado por tejido granular que, poco después, será sustituido por una nueva matriz extracelular constituida principalmente por colágeno. Algunos tipos celulares que están presentes en la piel, como los fibroblastos, se infiltran en el sitio de la herida, se activan y se diferencian a miofibroblastos debido a la deformación de la matriz extracelular. Ambas especies celulares secretan colágeno, inicialmente de tipo III, que se sustituye a lo largo del tiempo por colágeno más fuerte, de tipo I. En esta etapa se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los dañados, en el proceso llamado angiogénesis. Este proceso permite restablecer el flujo normal de sangre y nutrientes del tejido (Gray et al. 1995) y también el suministro de oxígeno necesario para la actividad celular.

En esta etapa se produce un fenómeno muy importante, que se estudiará en el presente trabajo, como es la contracción del tejido debido a las fuerzas que las células (fibroblastos y miofibroblastos) ejercen en respuesta al cambio en las propiedades del material en la zona dañada. Una vez concluido este proceso se forma la cicatriz inicial.

3. Al comienzo de la **remodelación**, las fibras de colágeno están orientadas aleatoriamente. Sin embargo, tras unos meses tienden a orientarse a lo largo de direcciones preferenciales, generalmente paralelas a las líneas de tensión de la piel. Aunque las propiedades del tejido evolucionan aumentando la resistencia a tracción, nunca se llega a recuperar por completo las propiedades resistentes del tejido sano.

El conocimiento de las propiedades de la piel durante todo el proceso de cicatrización ha sido una cuestión de estudio en las últimas décadas con el fin de proponer nuevas técnicas que favorezcan dicho proceso y prevenir la aparición de complicaciones.

Aunque tradicionalmente se han investigado las heridas con experimentos en seres vivos (Neuzi et al. 2012), las implicaciones éticas siempre están presentes. Se han utilizado también los cultivos celulares pero sus resultados son difíciles de extrapolar al comportamiento real de la herida, fundamentalmente debido a su naturaleza bidimensional. Existe, sin embargo, una tecnología que se centra en la reproducción del ambiente celular *in vitro* en pequeños dispositivos llamados dispositivos microfluídicos (Moreno-Arotzena et al. 2014).

En el presente trabajo se investigará el proceso de contracción de heridas con la ayuda de dichos dispositivos microfluídicos. Estos son pequeños laboratorios (lab-on-a-chip) que permiten la experimentación con bajas cantidades de material (10^{-9} a 10^{-18} litros), menores tiempos de respuesta y, dado que es posible realizar los experimentos con flujo laminar, se tiene un elevado control del proceso. Además, gracias a la recreación del ambiente en 3D, se tiene un cultivo celular *in vitro* cuyas condiciones se parecen aún más a las condiciones que se darían *in vivo* en placas de cultivo, algo insólito hasta el momento.

Aunque en los siguientes capítulos se verá en detalle, se muestran a continuación una serie de imágenes de uno de los dispositivos empleados (figura 1).

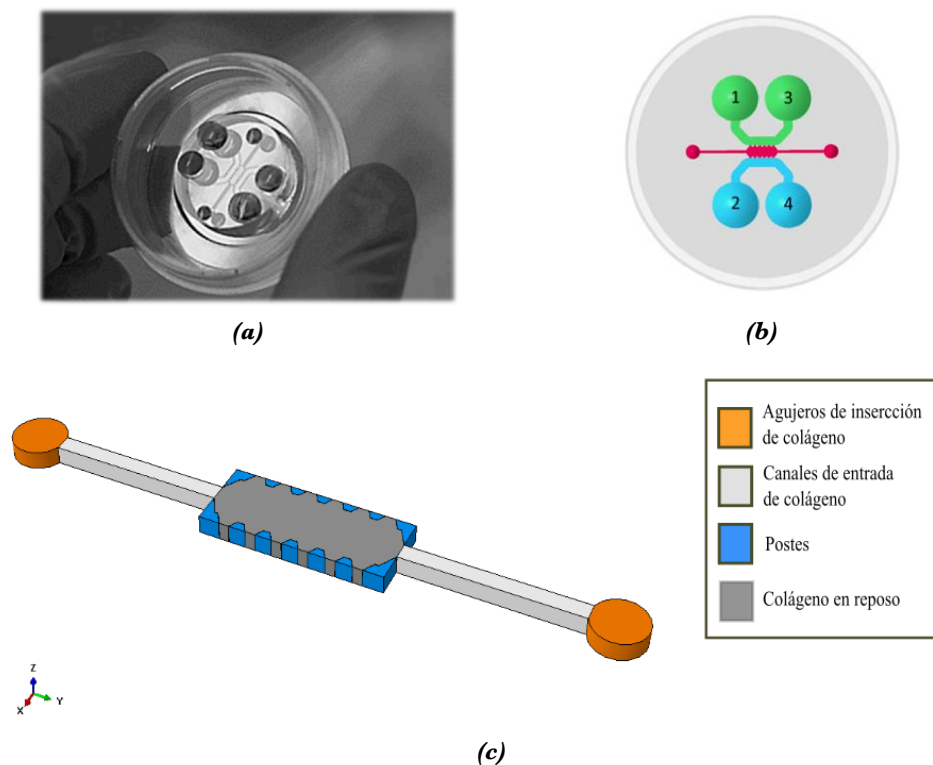


Figura 1. (a) Dispositivo microfluídico real, con unas dimensiones aproximadas de 160 micrómetros de diámetro y 300 micrómetros de espesor; (b) Representación de las partes principales de un dispositivo microfluídico. En verde los canales de entrada de agua por medio de dos orificios donde se inserta la bomba de entrada; en azul los canales de salida con dos orificios para insertar la bomba de salida (succión); en rosa los canales de entrada de colágeno, postes y parte central del dispositivo; (c) Representación detallada de la parte central del dispositivo.

Para poder simular este proceso de cicatrización, se debe conocer en primer lugar la composición de la piel. En un primer nivel, la piel está compuesta por la ECM y las células. El colágeno es el componente más abundante de la ECM y el encargado de darle la mayor parte de su resistencia (Apuntes de Histología, Facultad de Medicina, Zaragoza). Es un biopolímero natural que desempeña funciones mecánicas y fisiológicas en muchos de los sistemas del organismo. Se considera, también, como una de las proteínas más abundantes que existen en el cuerpo humano, pudiéndose diferenciar varios tipos en función de la zona del cuerpo considerada.

Es importante destacar la relación existente entre las propiedades microscópicas y macroscópicas del gel de colágeno. De esta manera, propiedades como el tamaño de malla del colágeno dependen de la concentración de este y de sus condiciones de polimerización.

Por tanto, para simular la contracción de la piel en el laboratorio de la forma más realista posible, se utilizan geles con fibras de colágeno embebidas en los que se incluyen también las células que hacen las fuerzas de contracción, como los fibroblastos. En el laboratorio se estimó que el módulo de cizalladura del gel de colágeno era de 15 Pa (Moreno-Arotzena et al. 2015).

1.1. Antecedentes

Se ha desarrollado en laboratorio un experimento para simular el proceso de contracción de heridas mediante la inserción de geles de colágeno en dispositivos microfluídicos con células embebidas. Sin embargo, se ha observado una falta de adhesión del colágeno al dispositivo debido a las fuerzas que ejercen las células.

1.2. Objetivo

El objetivo principal del presente trabajo es la determinación de la concentración celular óptima en dispositivos microfluídicos, que evitará que el colágeno se despreque de estos. Por tanto, será imprescindible el análisis y caracterización del proceso de rotura o despreque del colágeno.

El modelo de contracción desarrollado se aplicará a los dispositivos microfluídicos para mejorar el diseño de los experimentos y, con ello, poder entender mejor el proceso de contracción de heridas.

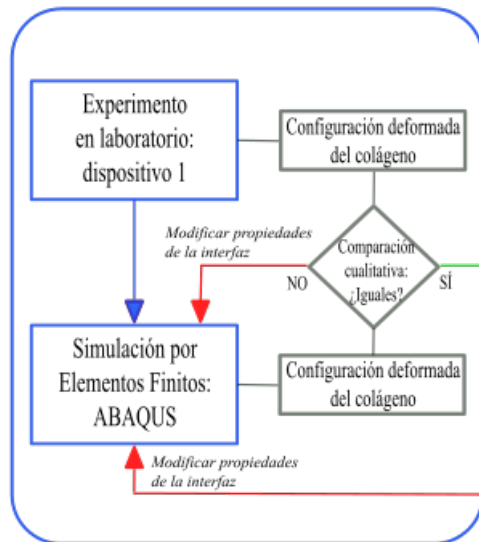
1.3. Metodología general

El trabajo se divide en dos partes bien diferenciadas. Primero, se determinarán las propiedades de la adhesión colágeno-postes del dispositivo. En segundo lugar, se determinará la concentración celular óptima que evita el despreque del colágeno. Para cada una de estas partes se realizará un experimento en laboratorio que permitirá validar los resultados que se obtengan teóricamente con el software comercial de Elementos Finitos ABAQUS.

Será imprescindible realizar en primer lugar el experimento que caracterice la unión para, después, aplicar las propiedades de esta a la interfaz (unión) del segundo experimento.

Debido a la elevada variabilidad en los resultados de los experimentos, se realizará una validación cualitativa entre la configuración deformada del colágeno de los resultados teóricos y la de los experimentos (figura 2).

CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESIÓN COLÁGENO - POSTES



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR ÓPTIMA



Figura 2. Diagrama de flujo sobre la metodología general

Capítulo 2

Determinación de las propiedades de la adhesión colágeno – PDMS

2.1. Objetivo

El siguiente es el primero de una serie de dos experimentos, con el cual se pretende caracterizar las propiedades de la adhesión del gel de colágeno a las paredes del dispositivo para poderlas introducir en el segundo experimento. Se busca un orden de magnitud, no un valor exacto, ya que hay numerosas variables desconocidas en el proceso que podrían influir en el cálculo más preciso.

2.2. Metodología

Para determinar las características de esta adhesión se empezará estableciendo unas propiedades muy altas, esto es, se hace la unión muy rígida. A continuación, se irán disminuyendo estos valores progresivamente hasta conseguir imitar la deformación del colágeno de los experimentos en el programa de Elementos Finitos ABAQUS. Será imprescindible analizar el comportamiento que está teniendo el colágeno en laboratorio para saber si hay que hacer la adhesión más o menos rígida en dirección normal o tangencial.

2.3. Descripción del experimento

Para poder cuantificar la adhesión del gel de colágeno a los postes del dispositivo, se decidió crear un gradiente de presión en la parte central del dispositivo y ver hasta qué rango podía aguantar el gel sin desprenderse. Para inducir este gradiente se dispone de dos bombas, una de entrada y otra de salida, que hacen circular agua transversalmente a la parte central. Estas bombas disponen únicamente de un conducto principal de salida. Sin embargo, como se quiere que el caudal se distribuya uniformemente en el dispositivo, se subdivide este conducto en dos conductos más pequeños. Estos dos canales se conectan a los agujeros 1 y 2 de la figura 3. El mismo método se aplica a la bomba de salida, pero con los agujeros 3 y 4 de la figura 3.

En primer lugar, se introduce el gel de colágeno por los agujeros 5 y 6 (figura 3) por medio de una jeringuilla. El gel avanza por los canales hasta quedarse en reposo en la parte central del dispositivo (zona roja en la figura 3). Una vez terminado este proceso, se deja reposar el gel unas 24 horas, hasta que polimeriza. Es en ese momento cuando las bombas empiezan a actuar. El flujo de agua discurre primero por el canal verde (figura 3) hasta que llega a contactar con el gel de colágeno; seguidamente, la segunda bomba que está succionando lleva la mezcla por el canal azul (figura 3) hasta los agujeros de salida. Durante todo el proceso se impone continuidad de caudal, lo cual permitirá tomar el gradiente de presión como constante.

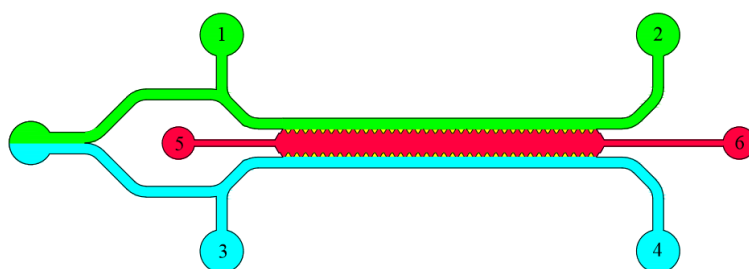


Figura 3. Disposición del primer experimento y descripción de las partes principales

2.3.1. Materiales empleados

El material empleado en la fabricación de los dispositivos microfluídicos es el polidimetilsiloxano (PDMS), material perteneciente al grupo de las siliconas. Este material se caracteriza por no impedir el crecimiento y desarrollo de las células. Aunque en este primer experimento no hay presentes ningún tipo de células, es importante mantener las condiciones iguales para el segundo experimento en el que intervendrán los fibroblastos.

En cuanto al material empleado para simular el colágeno, se ha seleccionado el colágeno tipo I ya que esta tipología está presente en la piel humana. Concretamente, se ha seleccionado el colágeno tipo I de cola de rata pues es el único disponible en el mercado. Tiene especial importancia que los geles tengan un pH de 7.4, ya que un aumento de este factor provocaría un aumento en la rigidez del gel (Yamamura et al. 2007).

2.3.2. Resultados experimentales

Se realizaron diferentes pruebas experimentales en los laboratorios del Instituto Universitario de Investigación de Ingeniería de Aragón (I3A) por Cristina del Amo, en los que se imponía un rango de caudal cada vez más elevado hasta que se determinó, aproximadamente, cuál era el rango máximo que podía aguantar el gel sin despegarse del dispositivo. Todas estas pruebas han sido captadas en vídeo para poder analizar detalladamente cómo se comporta el colágeno. Aunque la variabilidad es alta, se ha observado que la unión resiste un incremento lineal de caudal de 50 a 1000 microlitros por minuto en 4 minutos. En la figura 4 se muestra la posición del colágeno, marcada en blanco para una mayor claridad, en los instantes inicial y final del experimento.

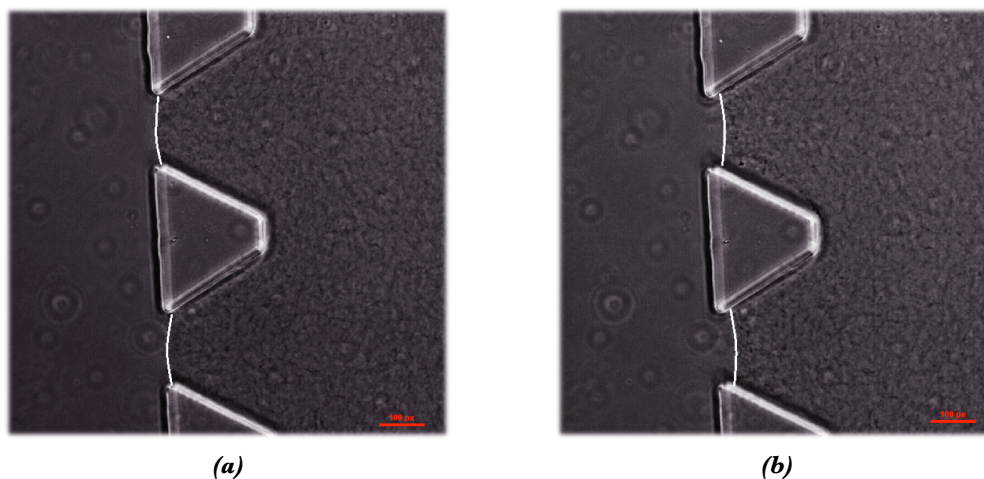


Figura 4. (a) Configuración del colágeno al inicio del experimento (escala 100 μm); (b) Configuración deformada del colágeno al término del experimento (escala 100 μm)

Esta variabilidad puede ser debida a la posible presencia de burbujas de aire en los canales de entrada y salida. Dado que el canal de entrada de la bomba se divide en dos canales (ver figura 3), si en uno de esos dos canales se forma una burbuja de aire, el caudal deja de ser simétrico y, por tanto, se alteran los resultados del experimento. La pérdida de simetría durante la polimerización del gel es también un factor que aporta variabilidad al experimento.

2.4. Análisis teórico

Para simular las condiciones del experimento es necesario conocer el gradiente de presiones presente en el dispositivo. Se asumen una serie de hipótesis para determinar dicho gradiente a partir de la variación de caudal que se introduce en el dispositivo.

En primer lugar, dado que el caudal es constante entre entrada y salida, el gradiente de presión también lo será. Esta hipótesis se sustenta por la ley de Darcy, la cual relaciona el caudal (Q) con la variación del volumen (V) en un diferencial de tiempo (t), de la siguiente forma:

$$Q = \frac{\partial V}{\partial t} = k' \cdot i \cdot A \quad (1)$$

donde

$$\begin{aligned} k' &\equiv \text{coeficiente de permeabilidad (L/T)} \\ i &\equiv \text{gradiente hidráulico (adimensional)} \\ A &\equiv \text{sección transversal (L}^2\text{)} \end{aligned}$$

La permeabilidad es la propiedad que tienen los materiales porosos de permitir el flujo de agua a través de sus vacíos. El gradiente hidráulico, por su parte, se puede definir en términos físicos de la siguiente manera:

$$i = \frac{\Delta h}{L} \quad (2)$$

con

$$\begin{aligned} \Delta h &\equiv \text{carga disipada en la filtración (L)} \\ L &\equiv \text{distancia en la que se disipa la carga (L)} \end{aligned}$$

También es posible determinar el valor del coeficiente de permeabilidad:

$$k' = \frac{k}{\mu} \cdot \gamma_{fluido} \quad (3)$$

donde

$$\begin{aligned} k &\equiv \text{permeabilidad específica del medio poroso (L}^2\text{)} \\ \gamma_{fluido} &\equiv \text{peso específico del fluido circulante (} \frac{M}{L^3} \text{)} \\ \mu &\equiv \text{viscosidad dinámica del agua (} \frac{M}{LT} \text{)} \end{aligned}$$

El peso específico se puede tomar como constante si no varía la temperatura del líquido. Por su parte, la permeabilidad específica es constante para un material dado con porosidad dada y, además, es independiente de las propiedades físicas del líquido que filtra por el material. Se puede definir, según la porosidad (n) y el radio de los poros (R), como:

$$k = \frac{n \cdot R^2}{8} \quad (4)$$

Para la permeabilidad específica del colágeno del experimento, magnitud propia para cada material, se estimó en laboratorio que el valor era de $1 \cdot 10^{-12} m^2$ (Moreno-Arotzena et al. 2015).

Si se sustituye la expresión (1), el gradiente hidráulico se puede expresar como sigue:

$$i = \frac{Q}{k' \cdot A} = \frac{v}{k'} \quad (5)$$

En esta última expresión se introduce la expresión (3) quedando:

$$i = \frac{Q}{\frac{k}{\mu} \cdot \gamma_{fluido} \cdot A} = \frac{Q \cdot \mu}{k \cdot \gamma_{fluido} \cdot A} \quad (6)$$

Si ahora se multiplica por el peso específico del fluido circulante, se obtiene el gradiente de presiones:

$$i_p = \gamma_{fluido} \cdot i = \frac{dP}{dL} \text{ en } \frac{M}{L^2 T^2} \quad (7)$$

Por último, se sustituye la relación que se obtuvo en (6) en la expresión (7) y se obtiene:

$$i_p = \gamma_{fluido} \cdot \frac{Q \cdot \mu}{k \cdot \gamma_{fluido} \cdot A} \rightarrow \boxed{i_p = \frac{Q \cdot \mu}{k \cdot A}} \quad (8)$$

El valor de la viscosidad dinámica del agua depende de la temperatura a la que se desarrollan los experimentos. En estos, para tratar de simular la temperatura del cuerpo humano, se toman $37^\circ C$.

$$\mu (T = 37^\circ C) = 0.000692 \frac{kg}{m \cdot s}$$

En cuanto al área de la sección transversal, se calcula a partir de la zona de entrada de gel presente en el dispositivo:

$$A = 150 \cdot 3700 \mu m^2$$

siendo $150 \mu m$ la altura del canal (espesor) y $3700 \mu m$ el espacio total entre los postes de uno de los lados del dispositivo (hay 37 postes en cada lado y entre cada uno de ellos una separación de $100 \mu m$), marcado en rojo en la figura 5.

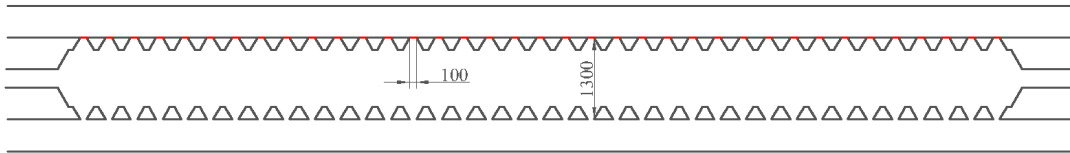


Figura 5. Sección de entrada del gel, unidades en micrómetros

Si se sustituyen los valores numéricos vistos hasta el momento en la expresión (8), se llega a:

$$i_p = Q \cdot 2.082 \cdot 10^{-8} \frac{kg}{\mu m^2 \cdot s^2} \quad (9)$$

Finalmente, se multiplica el resultado anterior (9) por la distancia (L) que separa las dos hileras de postes (acotado en la figura 5):

$$L = 1300 \mu m$$

$$i_p = Q \cdot 2.707 \cdot 10^{-5} \frac{kg}{\mu m \cdot s^2} \quad (10)$$

Partiendo de los experimentos realizados en los que se variaba el caudal de $50 \mu\text{l}/\text{min}$ a $1000 \mu\text{l}/\text{min}$ y con la relación anterior (10), se puede calcular la variación de caudal (figura 6.a) y la variación del gradiente de presión (figura 6.b):

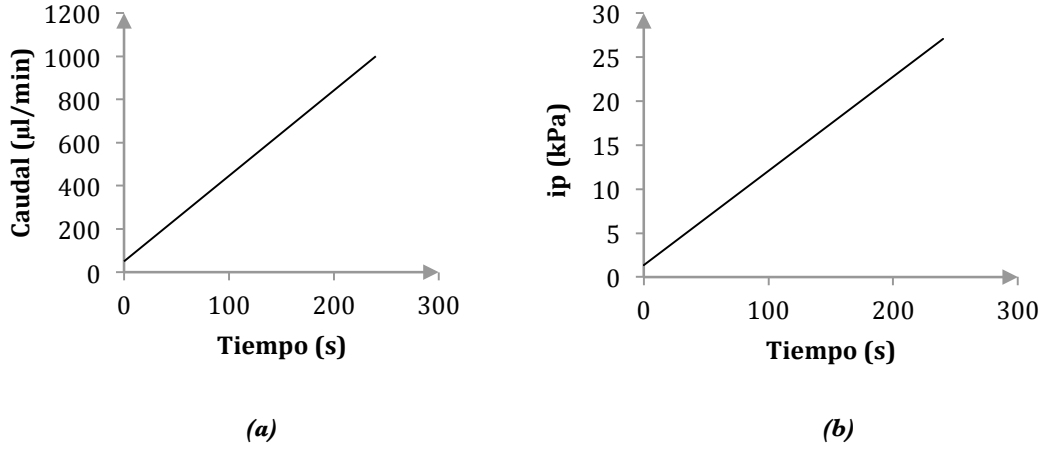


Figura 6. (a) Variación del caudal en 4 minutos impuesto en los experimentos; (b) Variación de presión en función del tiempo a partir de la variación de caudal

Por tanto, la presión varía entre 1.35 kPa y 27.07 kPa para el rango de caudal indicado anteriormente.

2.4.1. Propiedades de los materiales

Se especificarán en este apartado las propiedades tanto del gel de colágeno como del PDMS. Además, se incluye aquí la explicación de la unión colágeno – poste.

■ Propiedades del colágeno

Como primera aproximación, se modelará el colágeno como un material hiperelástico según un modelo Neohookeano. El módulo de cizalladura (G), determinado experimentalmente, es de 15 Pa (Moreno-Arotzena et al. 2015). Por tanto, las propiedades son:

$$C_1 = 7.5 \cdot 10^{-6} \frac{\mu\text{N}}{\mu\text{m}^2}$$

$$D_1 = 1.625 \cdot 10^{-5} \frac{\mu\text{N}}{\mu\text{m}^2}$$

Se ha supuesto un coeficiente de Poisson (ν) de 0.3, tal y como se estimó en los trabajos experimentales.

■ Propiedades de los postes

El material de los postes se considera elástico lineal con un módulo elástico muy grande en relación con el del colágeno para que dicho poste no se deforme. Como primera aproximación se toma:

$$E = 100 \frac{\mu\text{N}}{\mu\text{m}^2}$$

$$\nu = 0.3$$

■ Propiedades de la interfaz

Se ha observado en los experimentos que la unión colágeno – postes no es una adhesión perfecta, sino que su despegue es gradual y, cuando se llega a un caudal límite, se produce la rotura total de la unión. Por tanto, se simulará este fenómeno mediante elementos del tipo interfaz.

Teóricamente, la rotura de la interfaz se caracteriza por poseer una curva tensión – deformación como la de la figura 7.a. En ella se tiene una primera zona lineal (curva azul de la figura 7.a) donde se cumple la ley de Hooke. Por tanto, la pendiente de esta primera curva representará la rigidez de la unión (K). Sin embargo, en cuanto se alcanza una tensión (t^0) y desplazamiento límite (δ^0) comienza a romperse (curva verde de la figura 7.a) hasta que la tensión vuelve a hacerse cero, momento en el cual la unión se ha roto por completo. Estos puntos de tensión y desplazamiento de iniciación del daño y desplazamiento hasta la rotura (δ_R) son algunos de los parámetros que han sido determinados en el presente trabajo.

Además, hay que destacar que la iniciación del daño es producida únicamente por tracción, nunca bajo compresión. En la interfaz, se define siempre la dirección normal 3 en la dirección del espesor del elemento (figura 7.b). Por su parte, las direcciones 1 y 2 son direcciones tangenciales.

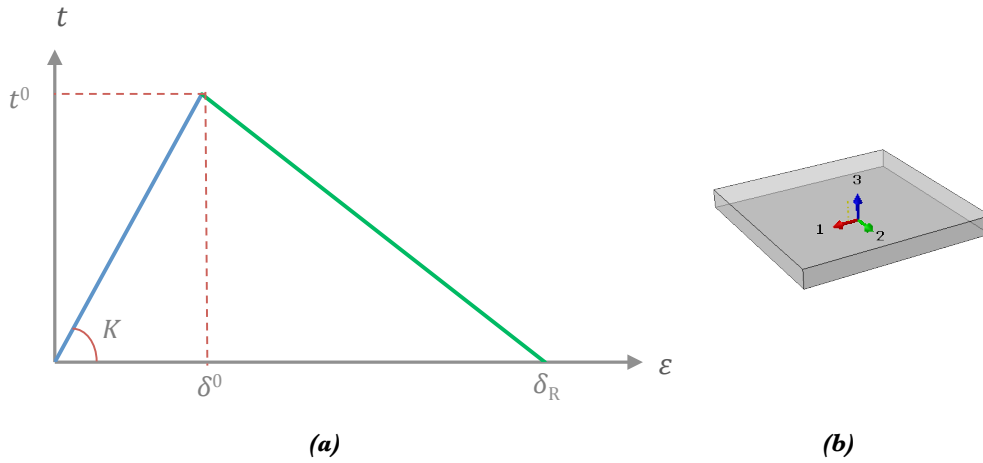


Figura 7. (a) Curva teórica tensión – deformación de la interfaz; **(b)** Representación de las direcciones principales de la interfaz

Las tensiones nominales (t_1, t_2, t_3) presentes en la interfaz son la fuerza dividida por el área inicial en cada punto de integración, mientras que las deformaciones nominales ($\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3$) son las separaciones o desplazamientos ($\delta_1, \delta_2, \delta_3$) divididos por el espesor (T_o) en cada punto de integración. Al hacer este espesor de valor de 1, se consigue que los desplazamientos sean iguales a las deformaciones, tal y como se demuestra en la siguiente expresión:

$$\varepsilon_1 = \frac{\delta_1}{T_o}, \varepsilon_2 = \frac{\delta_2}{T_o}, \varepsilon_3 = \frac{\delta_3}{T_o} \quad (11)$$

El vector tensión (t) se puede definir también, en la parte lineal y teniendo en cuenta que no existe acoplamiento, como:

$$t = \begin{Bmatrix} t_1 \\ t_2 \\ t_3 \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{11} & 0 & 0 \\ 0 & K_{22} & 0 \\ 0 & 0 & K_{33} \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \varepsilon_3 \end{Bmatrix} = K\varepsilon \quad (12)$$

donde K es la matriz de rigidez.

En este modelo, la iniciación del daño se produce cuando se alcanza, en cualquiera de las tres componentes principales, la tensión de iniciación (t_1^0, t_2^0, t_3^0) fijada a priori, es decir:

$$\max \left\{ \frac{t_1}{t_1^0}, \frac{t_2}{t_2^0}, \frac{t_3}{t_3^0} \right\} = 1 \quad (13)$$

Una vez se ha iniciado el daño en una dirección, aunque en el resto de componentes no se haya llegado a ese valor límite, también comienza el daño en las mismas. A continuación, la tensión comienza a disminuir conforme sigue aumentando la separación hasta llegar al desplazamiento de rotura, siguiendo un decremento lineal tal y como se indicó en la figura 7.a.

2.4.2. Geometría

En primer lugar, conviene destacar la simplificación efectuada en la geometría. Partiendo de la geometría total del chip con los 36 postes se decidió, por ahorrar tiempo de procesamiento y dado que sólo se busca un orden de magnitud de las propiedades, tomar tan sólo la parte central del dispositivo, considerando este lo suficientemente largo (figura 8).

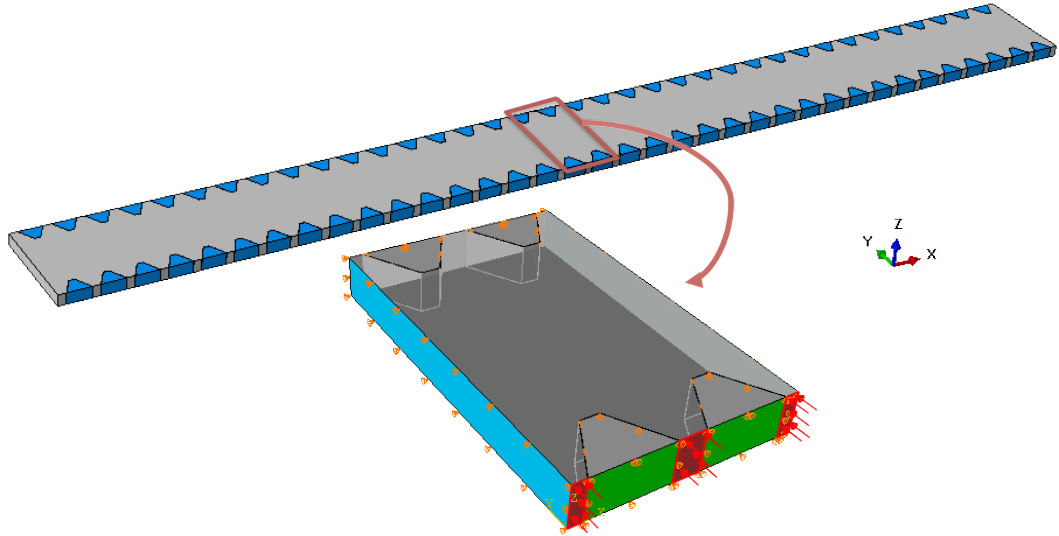


Figura 8. Simplificación de la geometría del microchip y condiciones de contorno

Teniendo en cuenta esta simplificación, las dimensiones exactas que se van a modelar son las que se indican en la figura 9. El dispositivo, tanto los postes como el colágeno, tienen una altura de $150 \mu m$. Cabe destacar que todos los postes tienen las mismas dimensiones.

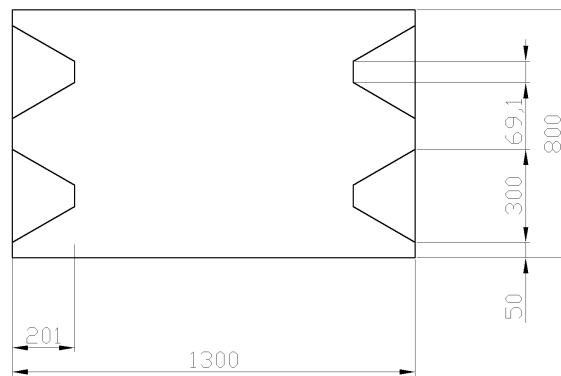


Figura 9. Dimensiones de la parte simplificada del microchip, en micrómetros

Se ha considerado que la interfaz tiene un espesor de 1 micrómetro, inapreciable a simple vista (figura 10).

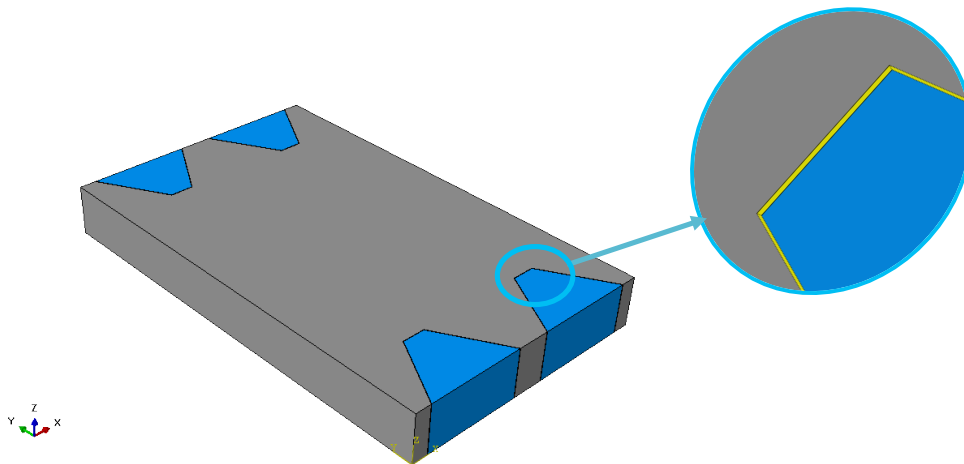


Figura 10. Disposición de la interfaz

2.5. Simulación por Elementos Finitos

Se emplea para todas las simulaciones el software comercial de Elementos Finitos ABAQUS.

2.5.1. Mallado

Tras realizar un análisis de sensibilidad de la malla se concluyó que mallando más fino simplemente la zona que va a estar sometida a una mayor deformación (espacio entre postes), se podía ahorrar tiempo de procesamiento sin perjudicar los resultados (figura 11). El tamaño de elemento para esta parte central fue de 20 micrómetros mientras que el resto fue mallado con un tamaño de 40 micrómetros, haciendo un total de 5184 elementos (4548 para el colágeno, 312 para los postes y 324 para la interfaz).

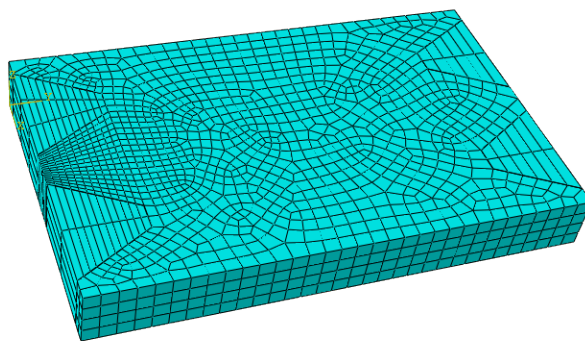


Figura 11. Mallado del microchip

Los elementos empleados para el mallado del colágeno y los postes fueron hexaedros (C3D8) mientras que para la interfaz se usaron elementos cohesivos hexaédricos (COH3D8).

2.5.2. Condiciones de contorno y cargas

La simplificación que se estableció en la figura 9 es válida siempre y cuando se impida el desplazamiento perpendicular de ambas caras (marcadas en azul en la figura 9).

Además, se ha considerado para facilitar las simulaciones que la presión a la salida del chip es nula, por lo que toda la presión se ha impuesto en la entrada (se han marcado en rojo en la figura 9 las caras por las que se aplica la presión uniformemente). Como se vio en el apartado anterior, se introducirá una presión que aumente desde 1.35 kPa hasta 27.07 kPa en 240 segundos.

Cuando se aplica la presión por uno de los lados, los postes están fijos, por lo que se ha impedido su desplazamiento en Y (marcado en verde en la figura 9).

Por último, dado que el microchip no se puede desplazar en Z en la parte inferior y, por el otro lado, se encuentra una lámina de PDMS, se ha impedido el desplazamiento en Z en ambas caras (marcadas en gris en la figura 9). Los postes, dado que ya se han supuesto más rígidos, no es necesario impedirlos en esta dirección.

2.6. Resultados

Teniendo siempre presente que el objetivo es conseguir que la deformada en el modelo de Elementos Finitos sea parecida a la propia de los experimentos, se han ido modificando las propiedades de la interfaz hasta determinar los valores que se muestran en las tablas 1 y 2; estos son los parámetros que se explicaron en la figura 7.a.

Tensión de iniciación del daño (t^0) en $\frac{\mu N}{\mu m^2}$			Rigidez normalizada		
t_1^0	t_2^0	t_3^0	E/K_{11}	G/K_{22}	G/K_{33}
$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	0.1	0.1	0.1

Tabla 1. Tensión de iniciación del daño y rigidez de la interfaz

Desplazamiento de iniciación del daño (δ^0) en μm			Desplazamiento hasta la rotura (δ_R) en μm		
δ_1^0	δ_2^0	δ_3^0	δ_{R1}	δ_{R2}	δ_{R3}
$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	10	10	10

Tabla 2. Desplazamiento hasta iniciación del daño y hasta rotura de la interfaz

Estos valores permiten obtener la deformada que se muestra en la figura 12.a, muy parecida a la deformada del experimento (figura 12.b).

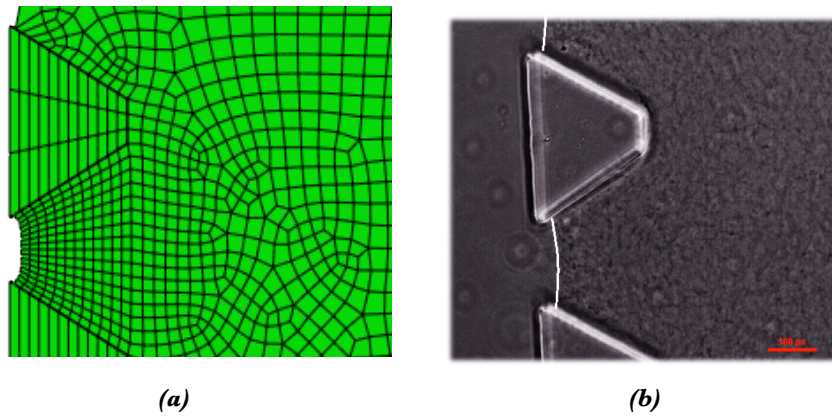


Figura 12.(a) Deformada en ABAQUS; (b) Deformada en el experimento (100 μm)

Se puede observar como el gel se desplaza unos 20 micrómetros (figura 13) en los puntos en los que se aplica la presión.

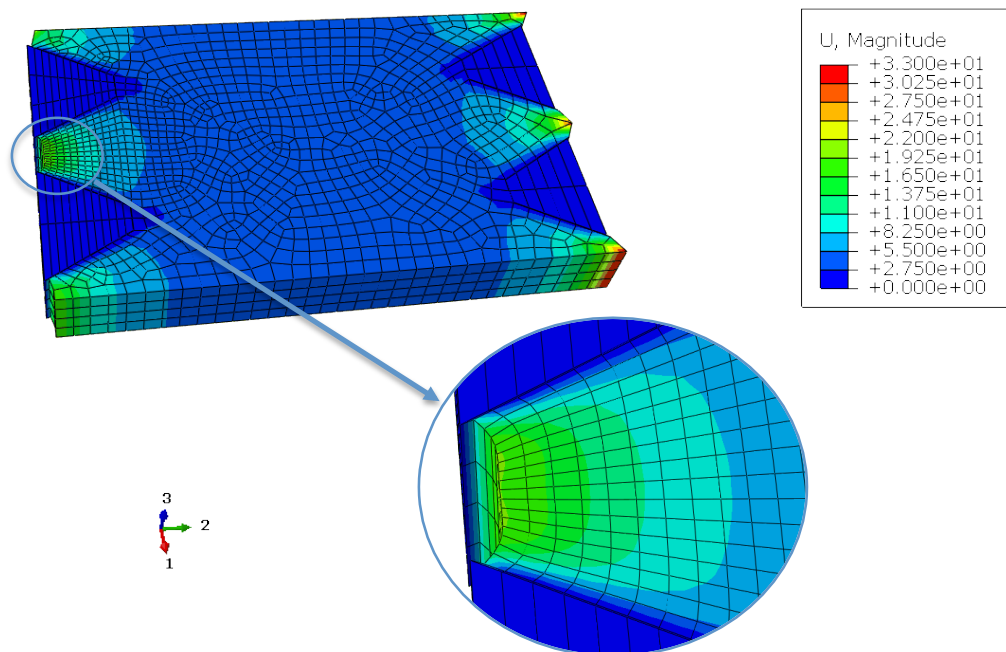


Figura 13. Representación del mapa de desplazamientos al final del primer experimento, en micrómetros

Si se selecciona el elemento de la interfaz que está sometido a un mayor desplazamiento, esto es, el que está en contacto con la carga de presión (ver figura 13), tendremos el caso más desfavorable. Se dibuja en este elemento la curva tensión – deformación (figura 14). En esta curva se puede observar que, dado que el modo de tensión de cizalladura es dominante y la tensión de iniciación del daño se estableció igual para todas las direcciones, la rotura comienza en la dirección tangencial 1. En el instante en que comienza la rotura en esa dirección se desencadena el daño en la otra dirección tangencial. No obstante, la tensión en esa dirección tangencial 2 (figura 13.b) cae rápidamente ya que el problema actúa predominantemente en la dirección 1. No ocurre lo mismo con la dirección normal (3) ya que está sometida a compresión y en el modelo se ha supuesto rotura únicamente a tracción.

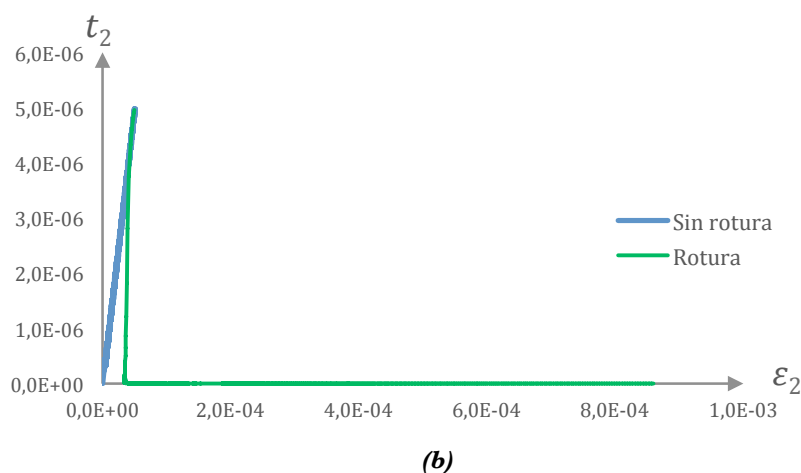
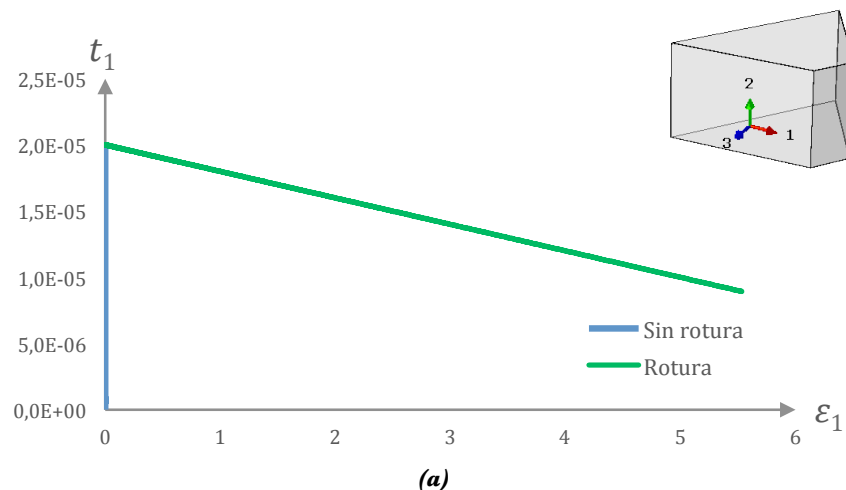


Figura 14. (a) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) de la interfaz en dirección tangencial 1; (b) Curva tensión (t) deformación (ϵ) de la interfaz en dirección tangencial 2

Capítulo 3

Determinación de la concentración celular óptima

3.1. Objetivo

El principal objetivo de esta segunda parte del trabajo consiste en determinar la concentración celular óptima que impide el despegue del colágeno. En las simulaciones se incluirán, para definir la adhesión, las propiedades que fueron determinadas en el capítulo anterior.

3.2. Metodología

Para la resolución de esta etapa del trabajo, se empezará imponiendo una concentración elevada de células que provoque el despegue del colágeno y, después, se irá disminuyendo el número de células hasta determinar cuál es el caso límite. Evidentemente, cualquier cambio que se efectúe en las propiedades de la interfaz deberá ser validado de nuevo en el primer experimento.

3.3. Descripción del experimento

Los dispositivos empleados en estos experimentos son muy similares a los del experimento anterior, salvo que el número de postes se reduce a 6 y las dimensiones de estos aumentan ligeramente. Ahora, el espesor aumenta hasta los 300 micrómetros con el fin de dejar más espacio para la movilidad de las células.

En la figura 15 se pueden ver las partes principales del dispositivo: por los agujeros 5 y 6 se inserta el colágeno con las células embebidas, se trasladan por los canales (marcados en rojo) hasta llegar a la parte central del dispositivo. Al igual que en el experimento anterior, se deja polimerizar el gel unas 24 horas hasta proceder a su análisis. En ese tiempo, los puertos 1, 2, 3 y 4 tienen la función de añadir suero de cultivo para alimentar las células. En otros experimentos estos puertos también sirven para añadir factores que estimulen la contracción, pero no es objeto de análisis en el presente proyecto.

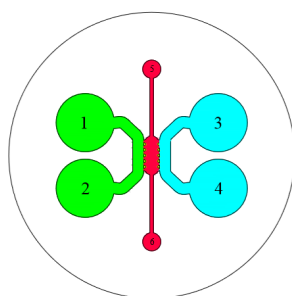


Figura 15. Representación del dispositivo microfluídico del segundo experimento. Se han señalado las partes principales.

3.3.1. Materiales empleados

En este experimento el material base para las paredes del dispositivo sigue siendo el PDMS. Sin embargo, se tendrán células embebidas en la matriz de colágeno. Concretamente, serán los fibroblastos el tipo celular escogido. Estos tienen un tamaño aproximado de 50 micrómetros (estimado en laboratorio).

3.3.2. Resultados experimentales

En el laboratorio se realizaron diferentes pruebas experimentales para caracterizar el proceso de rotura o despegue del colágeno. En todos ellos se observó que el gel se despegaba en primer lugar por la parte inclinada de los postes. En la figura 16 se muestra un ensayo con una concentración de $0.45 \div 0.5 \cdot 10^6$ células/mililitro lo que supone unas 450 células en el dispositivo. En este experimento queda claro que habrá que disminuir la concentración de células para evitar la falta de adhesión (figura 16.b). Evidentemente, ahora el despegue no es simétrico pues las células se distribuyen aleatoriamente por el dispositivo.

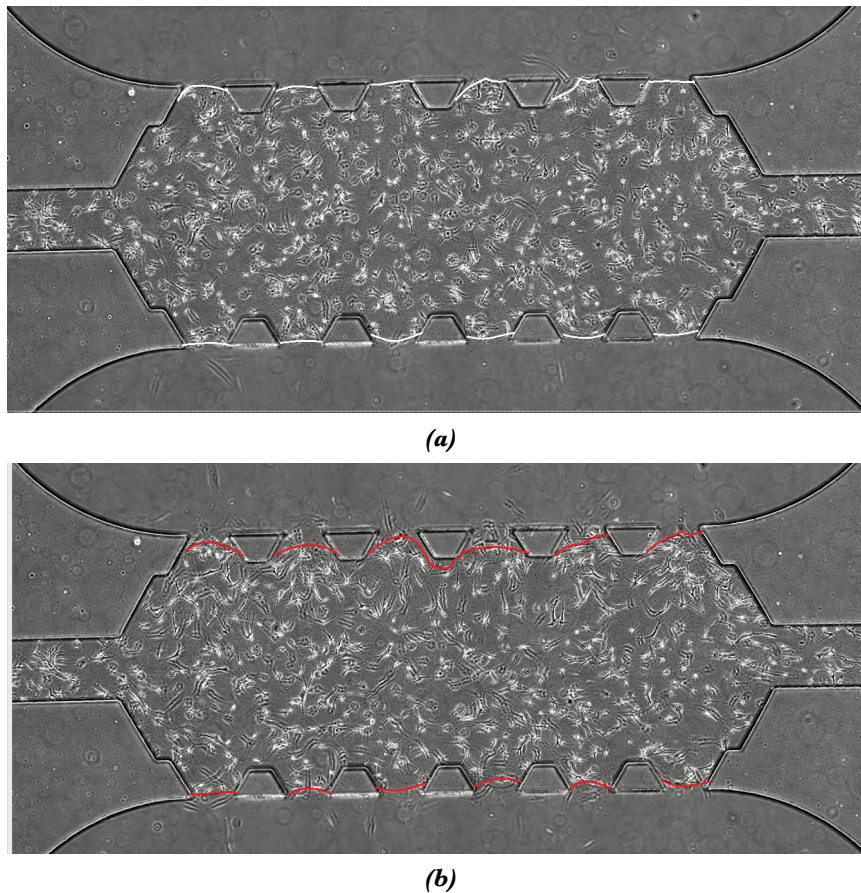


Figura 16. (a) Disposición del gel al inicio del experimento; (b) Disposición del gel al final del experimento

3.4. Análisis teórico

La deformación que sufren las células al contraerse se ha considerado uniforme en todas las direcciones por lo que las células se deformarán de forma volumétrica. Dada la analogía entre este problema y el problema termoelástico, se ha utilizado la analogía termoelástica para su simulación. Por tanto, se someterá a las células a un decremento de temperatura (ΔT).

$$\frac{\Delta V}{V} = \alpha \cdot \Delta T = \varepsilon_x + \varepsilon_y + \varepsilon_z \quad (14)$$

donde

$$\begin{aligned} \frac{\Delta V}{V} &\equiv \text{deformación volumétrica (adimensional)} \\ \alpha &\equiv \text{coeficiente de dilatación térmica (}^{\circ}\text{C}^{-1}\text{)} \end{aligned}$$

Fijando el incremento de temperatura a la unidad, queda como variable el coeficiente de dilatación térmica. Aunque este es desconocido, sí se sabe que la fuerza que ejerce un fibroblasto al contraerse es de $3.02 \cdot 10^{-3} \mu\text{N}$ (Zhonggang Feng 2014), por lo que la deformación volumétrica que sufre la célula es, aproximadamente, del 4%.

3.4.1. Propiedades de los materiales

En estas simulaciones se mantienen las propiedades que se determinaron en el anterior experimento, tanto para la interfaz como para el colágeno y los postes. El coeficiente de Poisson del colágeno nuevamente se fija en 0.3 tal y como se estimó en los ensayos de laboratorio.

En cuanto a las propiedades de los fibroblastos se ha impuesto un módulo de cizalladura (G) de 150 Pa.

3.4.2. Geometría

En este caso, puesto que hay células también en el canal de entrada del dispositivo y esta podría ser una zona conflictiva, se modelarán también las partes que hacen referencia al comienzo de este. Todos los postes de la zona central tienen las mismas dimensiones, como se puede ver en la figura 17. El dispositivo, tanto los postes como el colágeno, tienen una altura de $300 \mu\text{m}$.

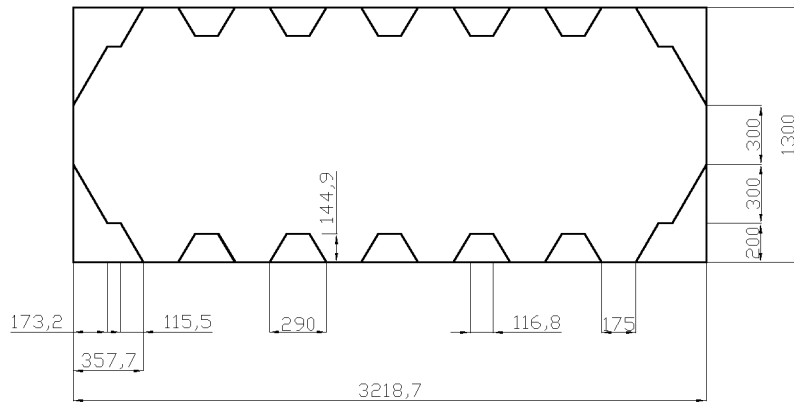


Figura 17. Dimensiones de la parte simplificada del segundo microchip, en micrómetros

3.5. Simulación por Elementos Finitos

Al igual que en el anterior experimento, se empleará el programa comercial de Elementos Finitos ABAQUS para realizar todas las simulaciones.

3.5.1. Mallado

Dado que el tamaño de los fibroblastos se encuentra entorno a los 50 micrómetros y estos se encuentran embebidos en el gel de colágeno, se realizó una malla de elementos de tamaño 50 micrómetros y así se pudo asemejar la deformación volumétrica a la que están sometidos los fibroblastos en la realidad.

Además, hay que tener presente la distribución no uniforme de las células en el dispositivo, por lo que se plantea el problema de tener que seleccionar aleatoriamente los elementos de la malla. Para ello se desarrolló un código en BlueJ (Java) en el cual, según la concentración de células que introduzca el usuario, se obtiene un grupo aleatorio de elementos que representan las células. En la figura 18 se puede ver un experimento, concretamente con 440 células, en el que se representan en color verde los elementos que tienen células.

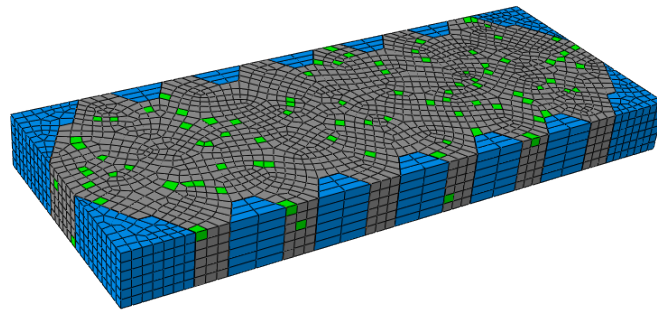


Figura 18. Mallado según tamaño de los fibroblastos

3.5.2. Condiciones de contorno y cargas

Al igual que en el experimento anterior, se impide el desplazamiento del colágeno en Z en ambas caras por estar apoyado en una de sus caras y tener el PDMS sobre él en la otra. Del mismo modo, los postes en su parte externa tienen el desplazamiento impedido en X (caras marcadas en azul en la figura 19).

Se considera también impedido el desplazamiento de los postes en dirección Y (caras marcadas en verde en la figura 19) dejando libre, en esa misma dirección, la parte entre los postes, ya que representaría el canal de entrada.

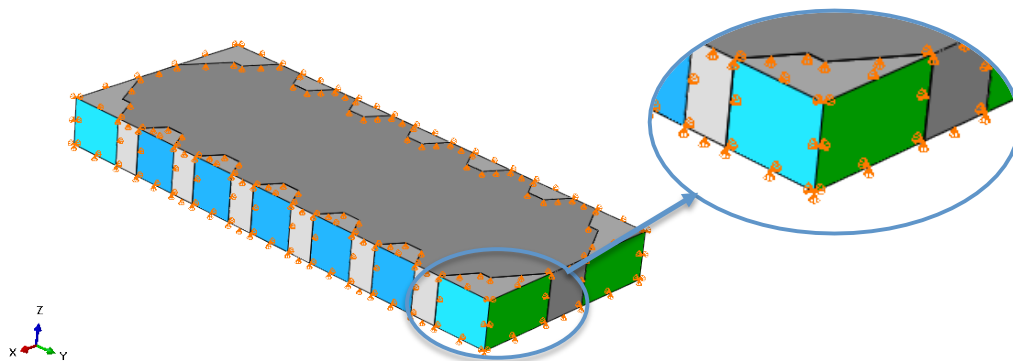


Figura 19. Condiciones de contorno

Respecto a las cargas, simplemente está presente la deformación volumétrica de las células que representa la contracción de las mismas.

3.6. Resultados

3.6.1. Concentración óptima de fibroblastos

Tras numerosas simulaciones se concluyó que el colágeno aguanta adherido al dispositivo hasta que se introducen, aproximadamente, un máximo de 75 células. A partir de esa concentración, tal y como se puede observar en la figura 20, la interfaz se empieza a romper. Bien es cierto que este problema no es determinístico, sino que el valor de la concentración límite está condicionado por la alta variabilidad en la disposición de las células, por lo que sería necesario hacer un análisis estocástico.

Siempre se estudia, independientemente de la distribución de las células, la zona que es más desfavorable, esto es, donde podría romper antes la interfaz. Por tanto, estas zonas más desfavorables serán aquellas que tengan un mayor número de células cerca de los postes.

En todos los casos si el daño se inicia en una dirección, se desencadena inmediatamente el daño en las otras dos direcciones. La dirección normal es la dirección 3 mientras que las direcciones 1 y 2 son direcciones tangenciales (figura 7.b).

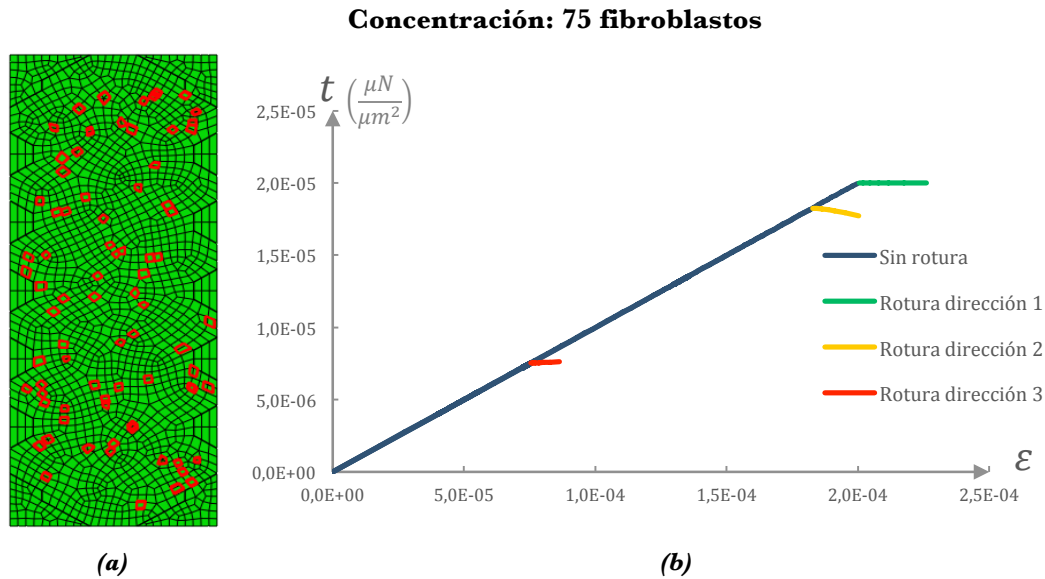


Figura 20. (a) Distribución aleatoria de 75 células; **(b)** Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 1.

Aumentando la concentración celular hasta 150 fibroblastos se observa que el daño ya está iniciado y está empezando a caer la tensión rápidamente (figura 21).

Concentración: 150 fibroblastos

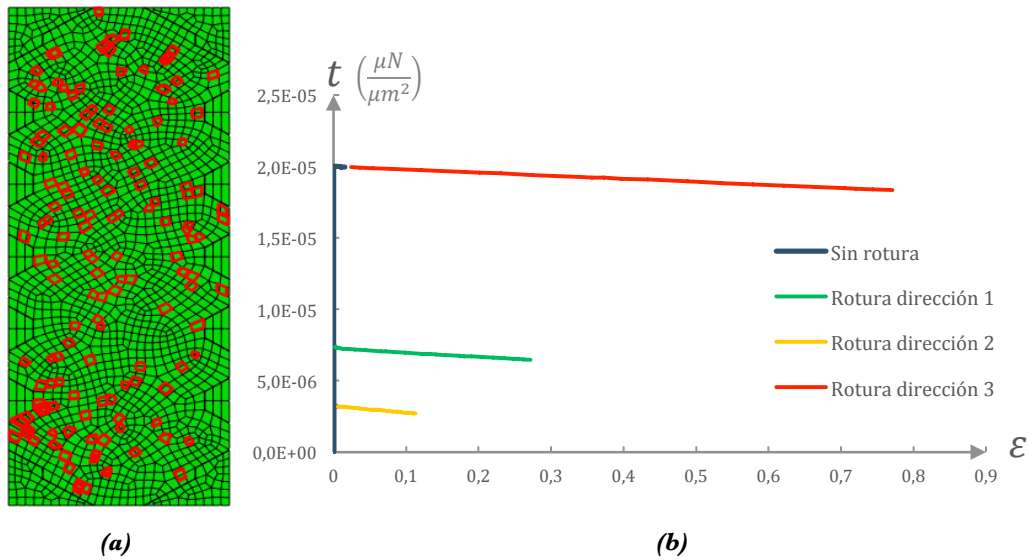


Figura 21. (a) Distribución aleatoria de 150 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 3.

Finalmente se estudia un caso con 440 células (figura 22) en el que se puede apreciar como el daño está muy avanzado.

Concentración: 440 fibroblastos

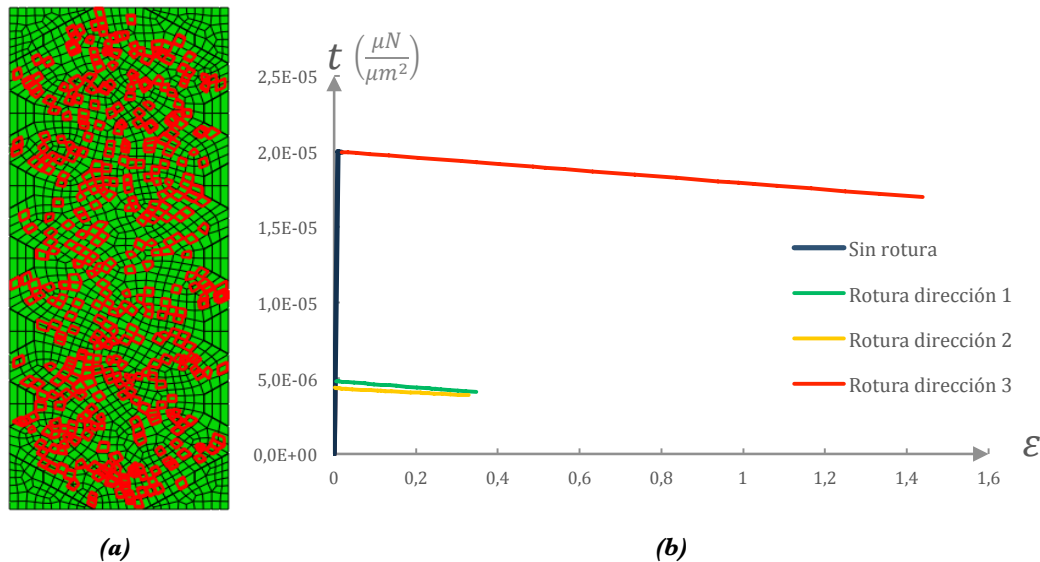


Figura 22. (a) Distribución aleatoria de 440 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 3.

3.6.2. Verificación de resultados: análisis estocástico

Se ha realizado un breve análisis estocástico variando la posición de las células para la concentración de 75 fibroblastos y, así, corroborar que esta sea la concentración límite aproximada. En las figuras 23, 24 y 25 se ha representado el elemento de la unión más desfavorable, esto es, el que tiene más células cerca de uno de los postes. En todos los casos estudiados se observa que con esta concentración siempre se está iniciando el daño en la unión,

sin llegar a altas deformaciones. Evidentemente, el hecho de que la distribución de las células sea aleatoria es lo que hace que los resultados no sean iguales entre sí; por ejemplo, si se juntan tres o más células muy próximas a uno de los postes, es muy probable que acaben arrancando el gel. Si, por el contrario, las células se concentran mayoritariamente en la parte central del dispositivo, la interfaz aguanta perfectamente la contracción de las células.

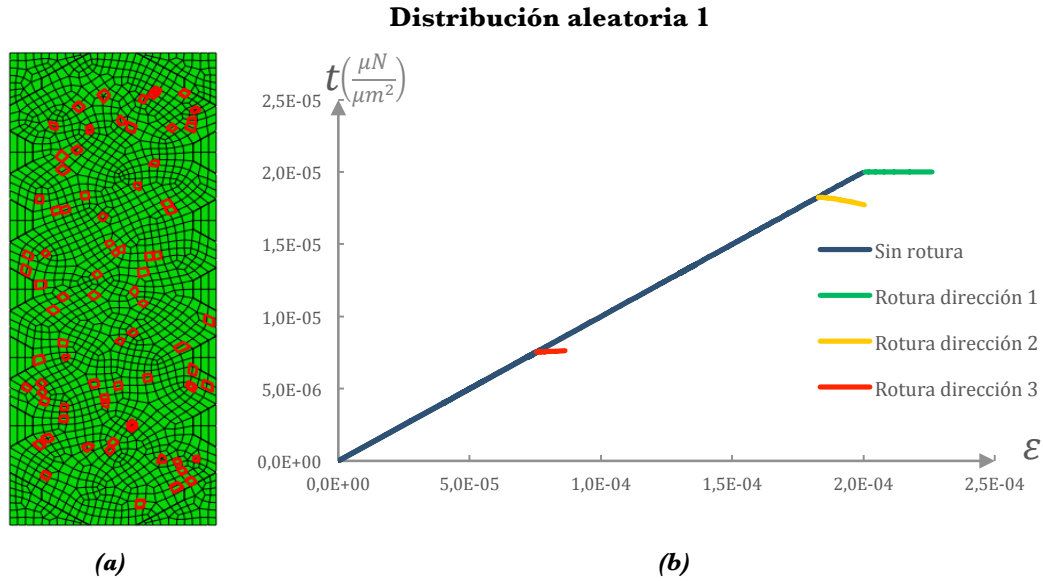


Figura 23. (a) Distribución aleatoria de 75 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 1

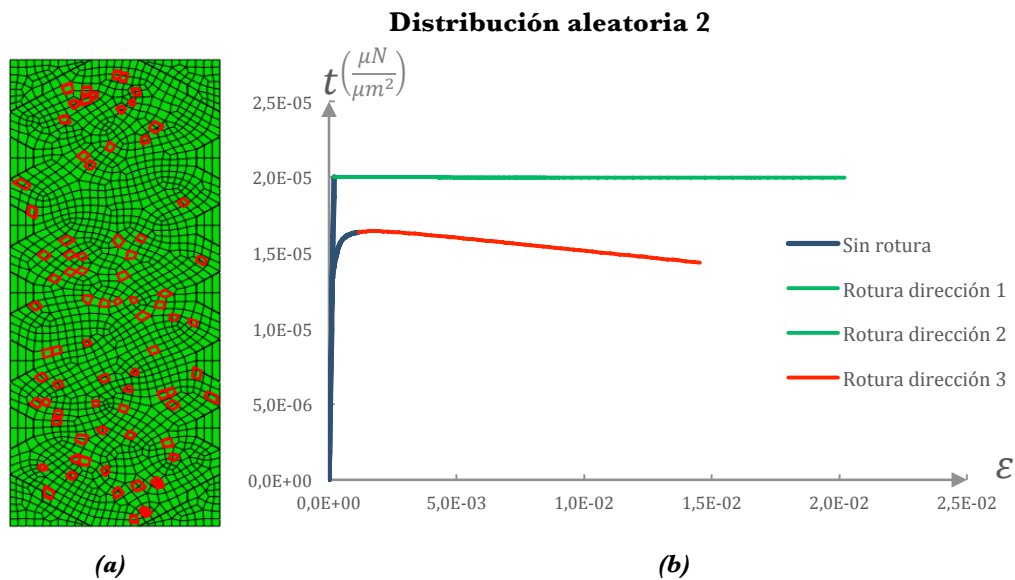


Figura 24. (a) Distribución aleatoria de 75 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza simultáneamente en la dirección 1 y 2.

Distribución aleatoria 3

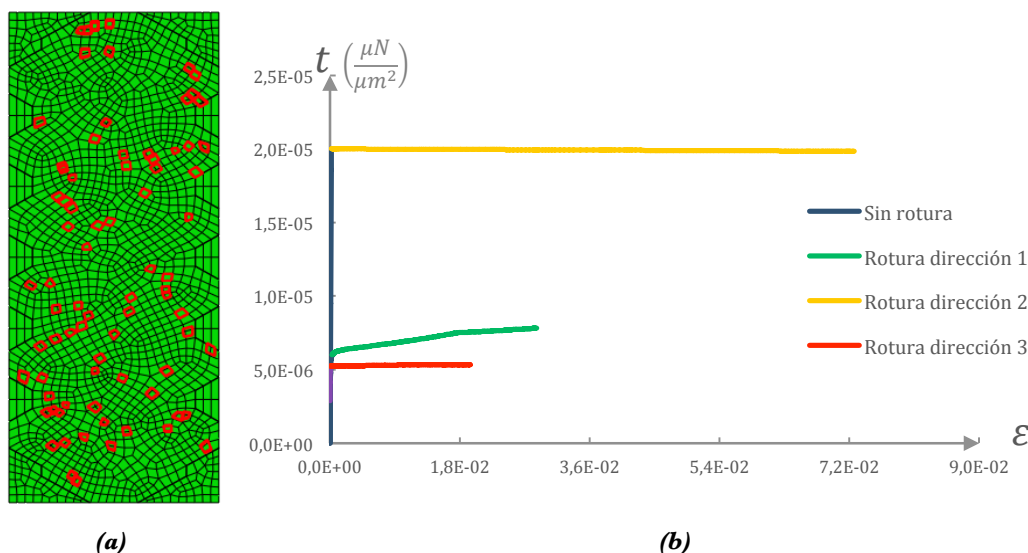


Figura 25. (a) Distribución aleatoria de 75 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 2.

A partir de estos resultados se debería continuar con un análisis estocástico más detallado, haciendo más iteraciones con distintas concentraciones y distribuciones aleatorias, e incorporando variables estadísticas.

En cualquier caso, estos resultados se aplicaron a los experimentos obteniendo un rango que se aproxima a la concentración estimada en el presente trabajo.

3.6.3. Concentración óptima de osteoblastos

Dado que en laboratorio también se está trabajando con osteoblastos, se plantea extrapolar el método desarrollado para los fibroblastos. Los osteoblastos son un tipo celular presente en los huesos que se caracterizan por desarrollar unas fuerzas de tracción mayores con respecto a los fibroblastos. De hecho, la fuerza que ejercen los osteoblastos se corresponde con una deformación volumétrica del 40%, tal y como se ha estimado experimentalmente.

Con las propiedades de la adhesión determinadas en el primer experimento y, tras diferentes análisis, se concluye que la concentración límite se sitúa en torno a 25 osteoblastos; a partir de esa concentración, la fuerza que ejercen las células es demasiado elevada en comparación con la resistencia de la interfaz. No obstante, dada la elevada contracción que ejercen los osteoblastos puede darse el caso de que, para esta concentración, una de las células se encuentre muy próxima a un poste y rompa completamente la interfaz (figura 27).

Por tanto, igual que para el caso de los fibroblastos, habría que hacer un análisis estocástico para confirmar el rango estimado.

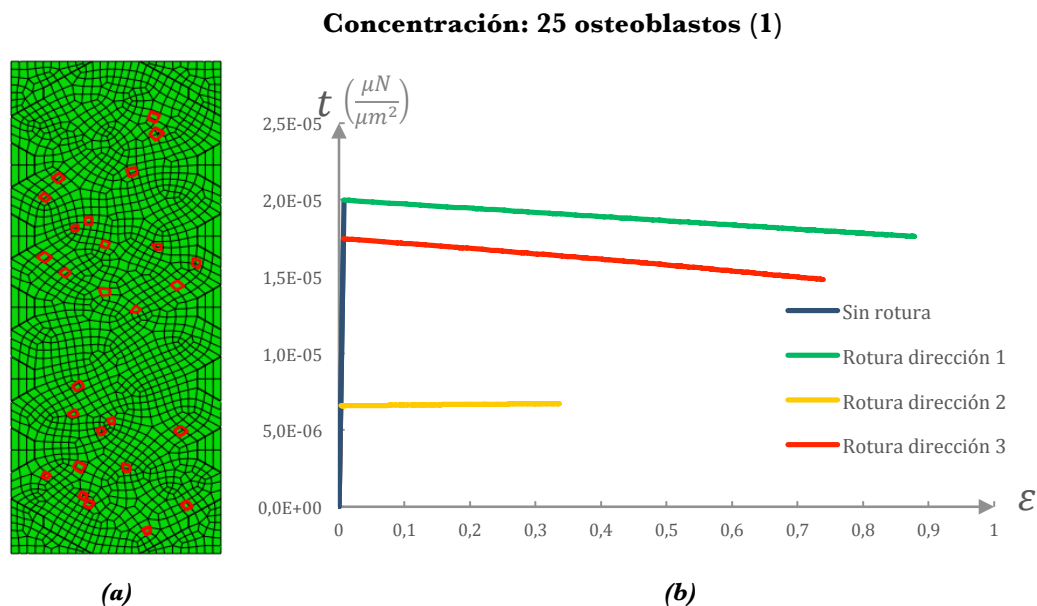


Figura 26. *(a)* Distribución aleatoria de 25 células; *(b)* Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 1.

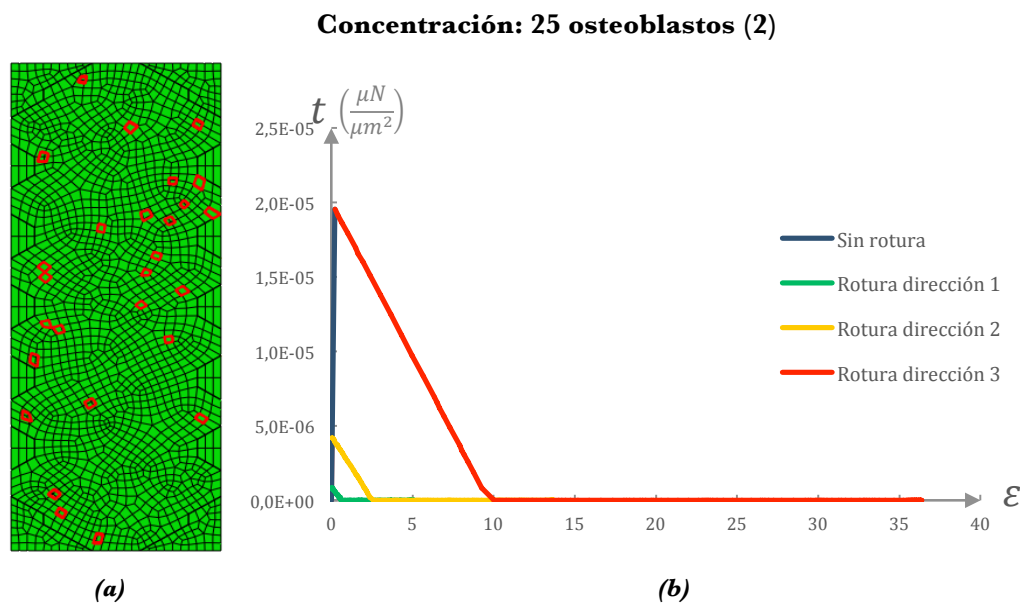


Figura 27. *(a)* Distribución aleatoria de 25 células; *(b)* Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 3.

Se han estudiado dos casos más, con 45 y 75 osteoblastos (figuras 28 y 29, respectivamente) en los que se ve claramente como la interfaz rompe por completo. Esto es debido a la presencia de una célula muy próxima a un poste.

Concentración: 45 osteoblastos

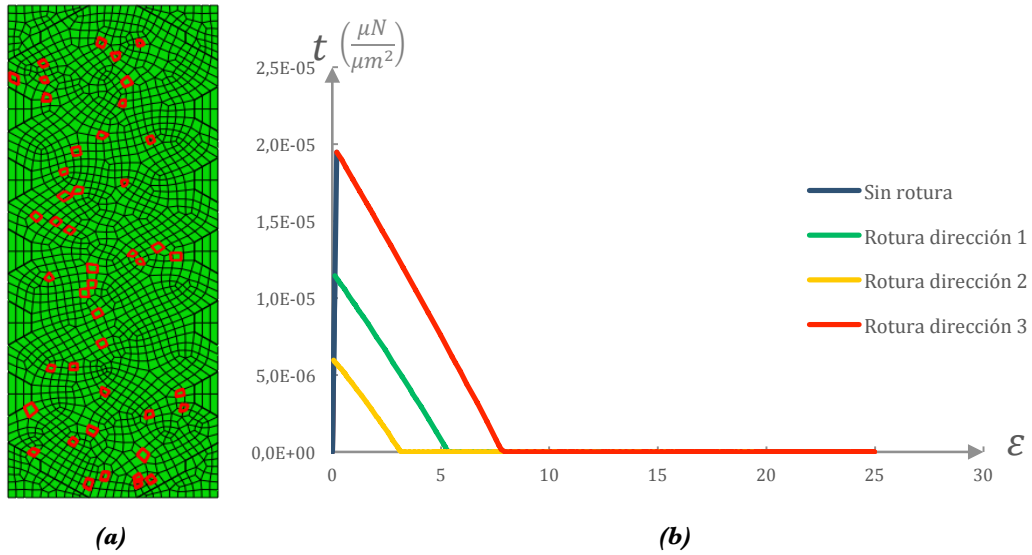


Figura 28. (a) Distribución aleatoria de 45 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 3.

Concentración: 75 osteoblastos

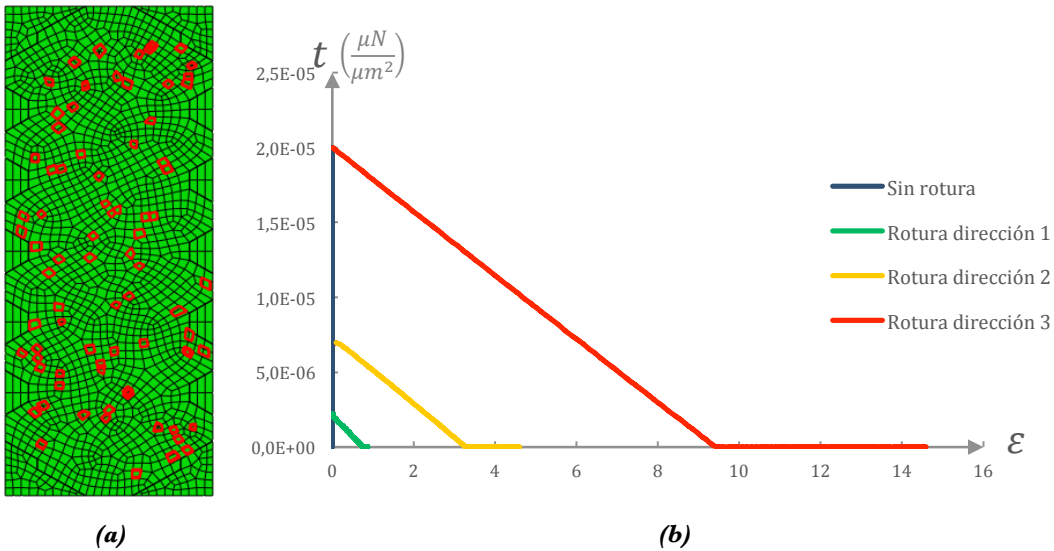


Figura 29. (a) Distribución aleatoria de 75 células; (b) Curva tensión (t) – deformación (ϵ) en las tres direcciones para el elemento más solicitado. La rotura comienza en la dirección 3.

Capítulo 4

Conclusiones y trabajo futuro

Se ha observado que la adhesión del gel de colágeno al dispositivo microfluídico de PDMS responde a un modelo de tipo interfaz cohesiva. Además, se han determinado cuantitativamente las propiedades de dicha unión.

En cuanto al colágeno, teniendo en cuenta las deformaciones a las que estaba sometido se modeló inicialmente como un material hiperelástico según un modelo Neohookeano. No obstante, en un futuro se podría mejorar el modelo implementando un material poroelástico en grandes deformaciones.

Con el modelo de contracción propuesto se ha conseguido verificar que el rango de concentración de fibroblastos estimado es similar al que se obtiene en los experimentos de laboratorio, lo cual ha permitido contrastar el modelo experimental con el computacional. A partir de este nivel de concentración, la excesiva fuerza de las células provoca el despegue del gel de colágeno del dispositivo. Se ha tenido en cuenta la distribución aleatoria de las células en el dispositivo mediante la implementación de un código de programación y, también, se ha realizado un breve análisis estocástico que puede servir, en un futuro, como punto de partida para verificar que los resultados son correctos dentro de la variabilidad que suponen los problemas biológicos.

Una vez se validó el modelo, se extrapoló a otro tipo celular, los osteoblastos, caracterizados por ejercer una mayor contracción que los fibroblastos. Igualmente, el rango de concentración estimado se reprodujo en los ensayos de laboratorio. No obstante, en estas simulaciones se acentúa aún más la incertidumbre planteada para el caso de los fibroblastos; si una de las células se sitúa al lado de un poste, rompe inmediatamente la interfaz independientemente de la concentración global de células.

Se debe tener en cuenta que en el primer experimento, en el que se variaba el caudal, la tensión predominante en la interfaz era en dirección tangencial mientras que en el experimento de células, estas ejercen fuerzas en todas las direcciones sometiendo a la interfaz a tensiones predominantemente de tracción. Por tanto, las propiedades determinadas para la interfaz se podrían ver ligeramente alteradas.

Por último, dado que se están desarrollando unos nuevos dispositivos microfluídicos en laboratorio con otros tipos celulares, sería interesante en un futuro aplicar en ellos los conocimientos adquiridos en este proyecto sobre la caracterización del proceso de rotura del de colágeno.

Bibliografía

- Apuntes de Histología, Facultad de Medicina, Zaragoza. "Introducción al tejido conectivo.", accessed 05/27, 2015, http://wzar.unizar.es/acad/histologia/textos/TemasHistologia_I/1_3_TejidosConectivosSoporte.pdf.
- Gray, H., LH Bannister, MM Berry, and PL Williams. 1995. "Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Medicine and Surgery. Churchill-Livingstone." *New York*: 1710.
- Gurtner, Geoffrey C., Sabine Werner, Yann Barrandon, and Michael T. Longaker. 2008. "Wound Repair and Regeneration." *Nature* 453 (7193): 314-321.
- Moreno-Arotzena, O., G. Mendoza, M. Córdor, T. Rüberg, and JM García-Aznar. 2014. "Inducing Chemotactic and Haptotactic Cues in Microfluidic Devices for Three-Dimensional in Vitro Assays." *Biomicrofluidics* 8 (6): 064122.
- Moreno-Arotzena, Oihana, Johann G. Meier, Cristina del Amo, and José Manuel García-Aznar. 2015. "Characterization of Fibrin and Collagen Gels for Engineering Wound Healing Models." *Materials* 8 (4): 1636-1651.
- Neuzi, Pavel, Stefan Giselbrecht, Kerstin LÃ¶nge, Tony Jun Huang, and Andreas Manz. 2012. "Revisiting Lab-on-a-Chip Technology for Drug Discovery." *Nat Rev Drug Discov* 11 (8): 620-632.
- Sen, Chandan K., Gayle M. Gordillo, Sashwati Roy, Robert Kirsner, Lynn Lambert, Thomas K. Hunt, Finn Gottrup, Geoffrey C. Gurtner, and Michael T. Longaker. 2009. "Human Skin Wounds: A Major and Snowballing Threat to Public Health and the Economy." *Wound Repair and Regeneration* 17 (6): 763-771.
- Singer, Adam J. and Richard A. F. Clark. 1999. "Cutaneous Wound Healing." *N Engl J Med* 341 (10): 738-746.
- Yamamura, Nahoko, Ryo Sudo, Mariko Ikeda, and Kazuo Tanishita. 2007. "Effects of the Mechanical Properties of Collagen Gel on the in Vitro Formation of Microvessel Networks by Endothelial Cells." *Tissue Engineering* 13 (7): 1443-1453.
- Zhonggang Feng. 2014. "Traction force exerted by individual fibroblasts or cardiomyocytes in collagen gels." Detroit, Michigan, .

