

PROYECTO FINAL DE CARRERA

DISEÑO DE UN SISTEMA DE SEMBRADO DINÁMICO EN ANDAMIAJES.

AUTOR

Víctor Torrecilla Chicote

DIRECTORES

Mauro Malvé - Víctor Alastraúré Vera

ESPECIALIDAD

Mecánica

CONVOCATORIA

Septiembre 2011



**Escuela
Universitaria
Ingeniería
Técnica
Industrial
ZARAGOZA**



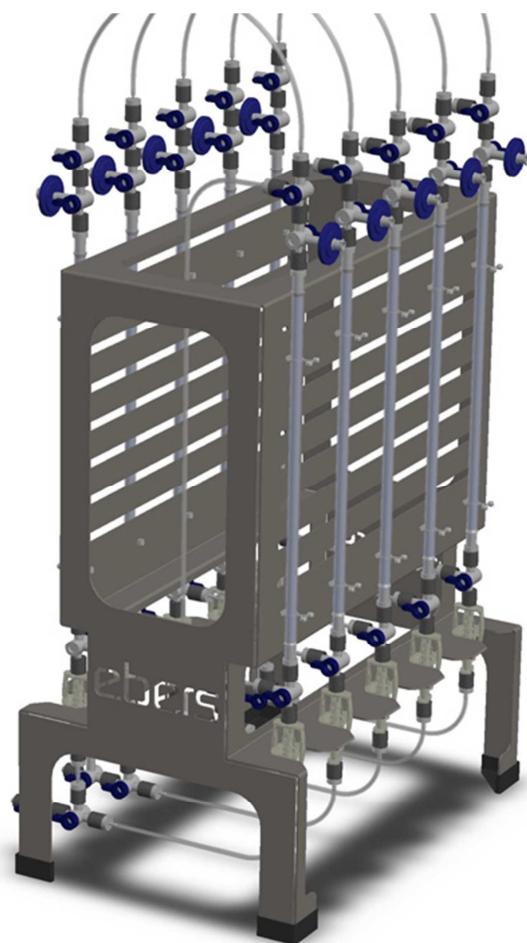
ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Objeto	5
CAPÍTULO 2. Introducción	9
2.1. Medicina Regenerativa e Ingeniería de tejidos	9
2.2. Expectativas de la Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos	12
2.3. ¿Es necesaria la Medicina Regenerativa?	13
2.4. Estado del arte	14
2.4.1. Técnicas de sembrado celular	14
2.4.2. Biorreactores	17
2.4.3. Bombas peristálticas	18
2.5. Mercado potencial	20
2.5.1. Posibles aplicaciones del producto	20
2.5.2. Características generales del mercado	21
2.5.3. Potencial y atractivo del mercado de la Ingeniería de Tejidos	24
CAPÍTULO 3. Diseño de un sistema de sembrado para andamiajes	29
3.1. Introducción y objetivos	29
3.2. Materiales y métodos	31
3.3. Estudio del desequilibrio durante el proceso de bombeo	40
3.3.1. Introducción al ensayo y objetivo	40
3.3.2. Realización del ensayo	41
3.3.3. Hipótesis de la causa de mal funcionamiento	42
3.4. Reajuste del motor de la bomba	43
3.5. Estudio de la estabilidad de bombeo en los perfiles de sembrado	45
3.5.1. Introducción y objetivo del ensayo	45
3.5.2. Realización del ensayo	45
3.3.3. Análisis de los resultados	49
3.3.4. Conclusiones	52
CAPÍTULO 4. Simulación computacional de paso de flujo por el scaffold	56
4.1. Introducción y objetivo	56
4.1.1. Introducción al TC	57
4.1.2. Historia de la TC	58
4.1.3. Principio de funcionamiento	58
4.1.4. Aplicaciones de la TC	60
4.2. Modelado por elementos finitos	61
4.2.1. Geometría	61
4.2.2. Discretización	62
4.2.3. Condiciones de contorno	64
4.4.4. Influencia de la discretización en los perfiles de velocidad	65
4.3. Estudio de la variación de presión en el scaffold y la cámara de sembrado	69
4.3.1. Caudal Q = 0'1 ml/min	69
4.3.2. Caudal Q = 1 ml/min	72
4.3.3. Caudal Q = 5 ml / min	75
4.3.4. Resultados. Valores de caídas de presión	78

4.4. Estudio de la influencia del tamaño del scaffold.....	80
4.4.1. Desarrollo de la simulación.....	80
4.4.2. Conclusión.....	84
CAPÍTULO 5. Conclusiones del proyecto	87
5.1. Conclusiones generales	87
5.1.1. Diseño de un sistema de sembrado para andamiajes.	87
5.1.2. Simulación de paso de flujo por el scaffold.	87
5.2. Líneas futuras	88
CAPÍTULO 6. Bibliografía.....	91

Capítulo 1:

OBJETO



CAPÍTULO 1. Objeto.

El presente proyecto, que lleva por título “DESARROLLO DE UN SISTEMA DE SEMBRADO DINÁMICO PARA ANDAMIAJES”, ha sido llevado a cabo en colaboración con EBERS Medical Technology SL, y se enmarca dentro del proyecto “Nuevos sistemas de Sembrado Dinámico de Andamiajes para el Cultivo Celular en Ingeniería de Tejidos (SEDIAN) de la convocatoria de Proyectos de Ayuda a la Industria de la Ciencia del CDTI llevado a cabo en colaboración entre EBERS y la UZ.

El objetivo principal del proyecto consiste en analizar el comportamiento del fluido en un proceso de sembrado dinámico de células en scaffolds para determinar las condiciones más adecuadas para el mismo.

Se analizarán parámetros tales como el caudal más adecuado para el sistema de bombeo, o las presiones y condiciones del flujo que se produzcan en el interior de la cámara y el scaffold.

El proyecto consta de dos partes:

- Parte experimental

En esta parte se llevan a cabo simulaciones de bombeo de aire mediante una bomba peristáltica para comprobar el correcto funcionamiento del sistema.

- Parte computacional

Se realizan simulaciones de paso de flujo a través de la cámara de sembrado mediante el software ANSYS. El objetivo de esto es obtener el ΔP en el scaffold para posteriormente poder calcular propiedades como la permeabilidad del mismo.

A continuación se detallan los grupos de tareas realizadas:

1. Adquisición de los conocimientos básicos de sembrado de células en andamiajes.

- Introducción a la ingeniería de tejidos.
- Búsqueda y análisis de artículos relacionados con el sembrado celular.

2. Diseño de un soporte para el conjunto de tubos y cámara de sembrado.

- Diseño de un soporte que nos permita fijar los tubos en posición vertical y realizar la correcta medición del volumen de fluido desplazado en los ensayos.

3. Ensayos de bombeo

- Bombeo con los cabezales MC314 y MC318 Watson Marlow.
- Análisis del volumen de fluido bombeado por ciclo.
- Análisis del caudal bombeado por revolución.
- Evaluación de los datos obtenidos.

4. Simulación de proceso de sembrado

- Modelado 3D del scaffold mediante TC.
- Diseño CAD de la cámara de perfusión.
- Discretización del modelo mediante ANSYS ICEM CFD.
- Simulación mediante ANSYS CFX.
- Análisis de los resultados obtenidos.

Capítulo 2:

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO 2. Introducción.

2.1. Medicina Regenerativa e Ingeniería de tejidos.

Este proyecto se enmarca dentro del campo de la Medicina Regenerativa y, más en concreto, en el de la Ingeniería de Tejidos.

La Ingeniería de Tejidos es una disciplina que se nutre de otras como la medicina, la biología, la química, la ingeniería, la física o la ciencia de los materiales. Consiste en la aplicación de técnicas de ingeniería y las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restaurar, mantener o mejorar la función tisular (1). Por consiguiente, el resultado final que persigue la aplicación de estas técnicas es la obtención de tejidos y órganos completos cultivados en el laboratorio, que permitan disponer de un reemplazo para aquellos órganos dañados o enfermos. Estas técnicas, que comenzaron a desarrollarse a mediados de los ochenta, han experimentado un gran avance en los últimos años, habiéndose realizado ya las primeras intervenciones con éxito en pacientes humanos (2).

En el futuro, la aplicación generalizada de las mismas supondrá un enorme impacto técnico, económico y social ya que, entre otros beneficios, supondrá la eliminación de la necesidad de realizar trasplantes de órganos provenientes de donantes, así como de todas las contraindicaciones que presentan. Sin embargo estas técnicas se encuentran a día de hoy a nivel de investigación, principalmente, constituyendo una de las áreas más activas y con más inversión en biomedicina.

A fin de conseguir el objetivo planteado, el esquema básico de actuación se basa en la obtención de células del propio paciente y en su cultivo mediante una metodología apropiada que permita la expansión y desarrollo de las mismas sobre los sustratos adecuados y con el aporte de nutrientes y aditivos suficientes para que, finalmente, sea posible obtener un tejido u órgano con las características apropiadas para ser implantado de nuevo en el paciente.

Para ello, los principales ingredientes que intervienen en el proceso, aparte de los procesos quirúrgicos de extracción de células y de implantación del tejido cultivado, son los siguientes:

- **Células:** el tipo de células que se utiliza en Ingeniería de Tejidos es muy variado y depende fundamentalmente del tipo de tejido que se desee obtener. En general, es frecuente utilizar células mesenquimales para el cultivo de hueso, condrocitos para el cultivo de cartílago y células endoteliales o musculares lisas para la generación de vasos sanguíneos. Asimismo, dichas células pueden proceder de fuentes diversas, según su tipo y aplicación.

- **Andamiajes:** los andamiajes o scaffolds, son los materiales sobre los que se cultivan las células y que sirven como plantilla a las mismas para generar el tejido deseado. Según el tipo de tejido que se desee obtener, la composición y geometría del andamiaje pueden variar considerablemente.

Además, según el origen del andamiaje, podemos clasificarlos en dos tipos:

- Tejidos descelularizados, obtenidos mediante la eliminación de las células de un tejido u órgano procedente del propio paciente o de un donante. Tienen la ventaja de que su estructura es natural y, por tanto, muy apropiada para que las células que se siembren sobre ellos crezcan apropiadamente.
- Andamiajes artificiales, construidos a partir de materiales sintéticos con características similares a los tejidos biológicos. La principal ventaja de estos andamiajes es que pueden fabricarse prácticamente a la carta, considerando la optimización de variables como la geometría, la microestructura o la composición físico-química. En general, los andamiajes creados artificialmente tratan de simular la matriz extracelular de los tejidos que se pretende cultivar. Para el cultivo de tejido cartilaginoso se utilizan geles, en el caso de vasos sanguíneos tubos cilíndricos de material colagenoso y estructuras cerámicas porosas para un hueso.
- **Biorreactores y cámaras de cultivo:** son los dispositivos encargados de generar las condiciones apropiadas para que las células se desarrollen y generen el tejido deseado con las condiciones apropiadas sobre el andamiaje. Para ello, las condiciones de cultivo han de simular lo mejor posible las condiciones que las células experimentan en condiciones fisiológicas normales. Como en los casos anteriores, las características del biorreactor dependen en gran medida del tipo de tejido que se vaya a cultivar.

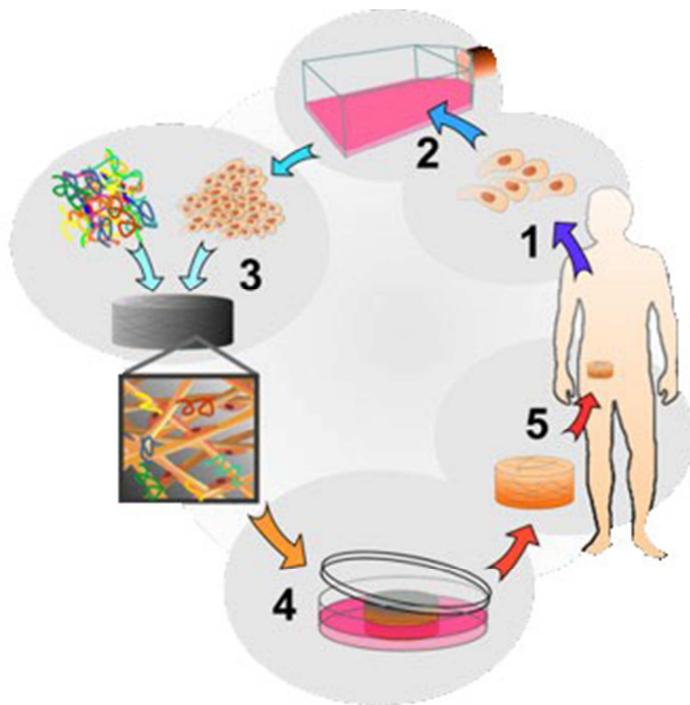


Figura 2.1. Representación esquemática de los procesos básicos de la Ingeniería de Tejidos.

Los principales pasos que se llevan a cabo en el proceso de cultivo de una porción de tejido según los procesos de la ingeniería de tejidos se muestran en la Figura 2.1. Brevemente, dichos pasos son:

Paso 1. Consistente en la obtención de una muestra celular a partir, por ejemplo, de una biopsia de los tejidos del propio paciente. En ese caso, se obtendría células autólogas, aunque también es posible realizar este tipo de metodologías partiendo de células alogénicas, provenientes de otros sujetos.

Paso 2. A continuación, se procede a cultivar las células extraídas a fin de multiplicar su número, de manera que se obtenga una población celular lo suficientemente grande.

Paso 3. Una vez obtenida una población celular suficiente, se procede a realizar uno de los pasos clave en el proceso de la Ingeniería Tisular: el sembrado celular. Este proceso consiste en la deposición celular, junto con otros aditivos, sobre el andamiaje. Este proceso plantea numerosas dificultades técnicas que varían en función de multitud de factores como el tipo celular y el tipo de andamiaje que se utilice.

Paso 4. Una vez realizado el sembrado, el siguiente paso consiste en el cultivo de las células sembradas sobre el andamiaje. Durante este proceso, las células se desarrollan y multiplican sobre todo el volumen del andamiaje, modificándolo mediante la secreción de matriz extracelular y, en definitiva, generando el tejido que va a ser implantado en el ser humano.

Paso 5. Finalmente, el proceso termina con la implantación en el paciente del tejido u órgano generado en el laboratorio. Como es lógico, para poder llevar a cabo este procedimiento con éxito, es necesario que el tejido obtenido tenga unas características similares a las del tejido del paciente, lo cual viene determinado por la calidad de todos los procesos realizados anteriormente.

2.2. Expectativas de la Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos

La aplicación generalizada de las técnicas de **Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos** está llamada a revolucionar los tratamientos médicos actuales, ya que supondría la utilización de nuevas metodologías terapéuticas, muy diferentes de las actuales. Dichas metodologías pueden clasificarse en tres grupos:

- La estimulación de órganos que con las técnicas actuales resultan irreparables, de modo que se produzca la autorregeneración de los mismos.
- El uso de sustitutos biológicos cultivados en el laboratorio para acelerar la recuperación del órgano o tejido dañado.
- El trasplante directo de tejidos y órganos regenerados en el laboratorio para reemplazar órganos dañados.

En conjunto, estos tratamientos permitirán obtener al menos **dos avances significativos** respecto a las terapias actuales. En primer lugar, estas técnicas brindan el potencial para **regenerar en el cuerpo humano tejidos con daños graves**, actualmente irreparables, de manera que recuperen su funcionalidad original. En cuanto al segundo avance, la Medicina Regenerativa permitirá **producir tejidos en el laboratorio que podrán ser utilizados para reemplazar aquellos cuya regeneración in-situ sea imposible**, lo que se conoce como Ingeniería de Tejidos.

La Medicina Regenerativa constituye, por tanto, la vanguardia de la investigación en salud en el siglo XXI, ya que brinda el potencial de llevar a cabo tratamientos para enfermedades hasta ahora incurables. A modo de ejemplo, algunas de las patologías cuyo tratamiento promete revolucionar esta disciplina son la diabetes, las enfermedades cardíacas, el fallo renal, la osteoporosis y las lesiones medulares, aunque, en realidad cualquier enfermedad causada por el mal funcionamiento, el daño o el fallo de un tejido podría ser virtualmente tratada a través del uso de terapias basadas en la Medicina Regenerativa. Sin embargo, lo que realmente le confiere su enorme potencial innovador es el cambio de filosofía que supone: al contrario que las técnicas actuales, **la Medicina Regenerativa es una cura y no un tratamiento**, ya que tiene el potencial para sanar completamente aquellos órganos y tejidos dañados.

2.3. ¿Es necesaria la Medicina Regenerativa?

Más allá de sus evidentes ventajas desde el punto de vista terapéutico, la generalización del uso de la Medicina Regenerativa es crucial para **reducir el creciente coste de los Sistemas Sanitarios**. A modo de ejemplo, el Sistema de Salud de los Estados Unidos supone un coste anual superior a los 1,5 billones de dólares, lo que corresponde a un 13% del producto interior bruto. Por otra parte, los datos del censo del año 2000 revelaron que aproximadamente 35 millones de estadounidenses eran mayores de 65 años, lo que permite estimar que este segmento supera los 56 millones de habitantes en la actualidad. Alrededor de 2040, con la mejora de los tratamientos actuales y el incremento de la esperanza de vida, se espera que este número se incremente hasta los 70 millones, cifra que requerirá destinar alrededor del 25% del PIB a cubrir los gastos del Sistema Sanitario. Aunque con algunas variaciones en función de las particularidades de cada país, la evolución del gasto en Salud seguirá tendencias similares en el resto de países desarrollados.

Además, se da la circunstancia de que muchas de las patologías que afectan a los pacientes de edad avanzada están asociadas a enfermedades producidas por el fallo de tejidos órganos. En la mayoría de los casos, los tratamientos que se dispensan en esos casos son continuados y paliativos, es decir, que se suministran indefinidamente y su efecto se limita a mitigar los efectos de la enfermedad, pero nunca se alcanza la sanación completa. Precisamente, dichas patologías son el objetivo preferencial de las terapias de Medicina Regenerativa, que jugará un papel vital en el tratamiento de enfermedades asociadas a la edad.

El potencial de la Medicina Regenerativa para mejorar la calidad de la asistencia sanitaria y, al mismo tiempo, reducir los costes de los tratamientos es enorme. Actualmente el coste directo de los trasplantes de órganos asciende a unos 350.000 millones de dólares en todo el mundo, incluyendo el coste de tratamientos para mantener vivos a los pacientes (el 8% del gasto total en salud). Un ejemplo de algunas enfermedades que podrían ser tratadas con técnicas de Medicina Regenerativa, y el coste que suponen con las técnicas actuales puede verse en la Tabla 2.1. Las cifras dan una idea de la magnitud económico-social que supondrá la aplicación de estas técnicas; con un mercado global ya establecido de 350.000 millones, se estima que la **Medicina Regenerativa tiene un potencial de crecimiento superior a los 500.000 millones de dólares** (1).

Tratamiento / Patología	Pacientes por año	Coste anual (M\$)
Implante de válvulas cardíacas	250.000	27.000
Enfermedad cardíaca	950.000	351.000
Diabetes	17.000.000	132.000

Tabla 2.1. Número de pacientes anuales y coste (en millones de dólares) que supone su tratamiento con las técnicas actuales en Estados Unidos.

2.4. Estado del arte

2.4.1. Técnicas de sembrado celular

Como ya se ha comentado anteriormente, el sembrado de andamiajes para ingeniería de tejidos consiste en la diseminación de células en el volumen de dicho andamiaje (ver Figura 2.1) y constituye el primer paso necesario para llevar a cabo un cultivo celular en tres dimensiones. De hecho, el proceso de sembrado es de gran importancia, ya que es un factor determinante en la correcta formación del tejido cultivado (3). Estudios experimentales muestran que realizar el sembrado celular con altas densidades conlleva la mejor formación de tejido sobre andamiajes 3D en varios tipos de tejido, incluyendo la formación de matriz extracelular cartilaginosa (4), mejor mineralización de hueso (5) y mejoras en las estructuras del tejido cardíaco (6).

Por lo tanto, los resultados experimentales observados en gran cantidad de tejidos muestran que el cultivo de tejidos para aplicaciones clínicas requiere que las células se siembren con tanta eficiencia como sea posible. Sin embargo, no basta con conseguir que una gran cantidad de células se adhiera al andamiaje, ya que los datos experimentales han demostrado que la distribución inicial que adquieren las células durante el sembrado es determinante en la formación posterior de tejido (4), (5), (7), (8), lo que indica que el sembrado celular uniforme es la base para el crecimiento tisular uniforme. Sin embargo, el sembrado uniforme de andamiajes 3D es una tarea difícil y tediosa, incluso en el caso de andamiajes de pequeño tamaño, y conseguir una distribución de células uniforme en el volumen del andamiaje constituye, a día de hoy, un desafío.

Actualmente se utilizan varias metodologías de sembrado para depositar células sobre andamiajes porosos. Todas ellas tratan de conseguir que las células suspendidas en un fluido en una concentración muy elevada se depositen y adhieran al andamiaje. En una primera división, las técnicas que se utilizan para conseguir este objetivo pueden clasificarse en estáticas y dinámicas.

1. Técnicas de sembrado estáticas.

Las técnicas de sembrado estáticas hacen referencia a aquellas metodologías de sembrado en las que el fluido con alta concentración celular se aplica de manera manual o “estática”, en el sentido de que no se imprime movimiento alguno al fluido aparte de la deposición inicial sobre el andamiaje, o bien se basan en la simple inmersión del mismo en el fluido que contiene las células.

Las técnicas de sembrado estáticas son, con mucho, las que se utilizan con más frecuencia, a pesar de que varios estudios experimentales han mostrado que tienen una baja eficiencia (5), (7), (8), (9), (10) y que producen distribuciones de sembrado nada homogéneas y, en gran medida, dependientes de la pericia del operario encargado del procedimiento.

Dentro de este tipo de técnicas existen al menos los siguientes tipos:

- Sembrado por gravedad, consistente en dejar que las células se depositen sobre el andamiaje por efecto únicamente gravitatorio.
- Sembrado por inyección, consistente en que el medio con alta concentración de células se inyecta en el interior del andamiaje, de modo que se facilita la llegada de las células a la zona interna del andamiaje.
- Sembrado por aspiración, al contrario que en el sembrado por inyección, las células no se depositan en el interior del andamiaje directamente. En este caso, el fluido con alta concentración celular se introduce desde la zona externa mediante aspiración.

2. Técnicas de sembrado dinámicas

Los sistemas dinámicos de sembrado están basados en la aplicación de movimiento al fluido sobre o a través de los andamiajes, de manera que la suspensión de células se vea forzada a pasar una y otra vez sobre los andamiajes, depositándose en ellos las células que contiene.

Estos procedimientos presentan eficiencias de sembrado significativamente más altas que los estáticos y, además, las distribuciones celulares que se obtienen suelen ser mucho más homogéneas.

Existen distintos esquemas experimentales para realizar el sembrado dinámico de andamiajes.

Los más extendidos son los siguientes:

- Sembrado por agitación. Fue una de las primeras técnicas de sembrado dinámico que se desarrolló. Consiste en sumergir los andamiajes en el fluido con alta concentración celular, de modo que estos queden suspendidos en el fluido. Seguidamente, se imprime movimiento a través de un agitador, que fuerza al fluido a pasar continuamente alrededor y, ligeramente, a través de los andamiajes (Figura 2.2).

Sin embargo, si bien en la superficie de los andamiajes se produce una renovación de medio muy efectiva, la capacidad de esta técnica de hacer pasar las células a través de los andamiajes es limitada, y las corrientes que se generan en el interior del andamiaje son muy escasas, por lo que dependiendo de la tipología del andamiaje, la eficiencia de este sistema de sembrado puede ser muy baja (6), (7) y poco uniforme (12), (13), siendo la densidad celular mucho más alta en la superficie del andamiaje (3).

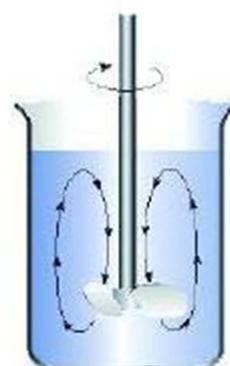


Figura 2.2. Representación esquemática del sistema de sembrado por agitación.

- Sembrado por perfusión directa: este método de sembrado consiste en forzar el paso del medio que contiene las células a través de los poros de los andamiajes (Figura 2.3). Está basado en el principio de transporte por convección, ya que el fluido con alta concentración celular se hace pasar repetidamente a través de los poros a velocidades lo suficientemente bajas como para permitir que las células se adhieran a las paredes del scaffold hasta producir una distribución celular muy uniforme (8), especialmente en comparación con los sistemas de sembrado manuales y por agitación (9).

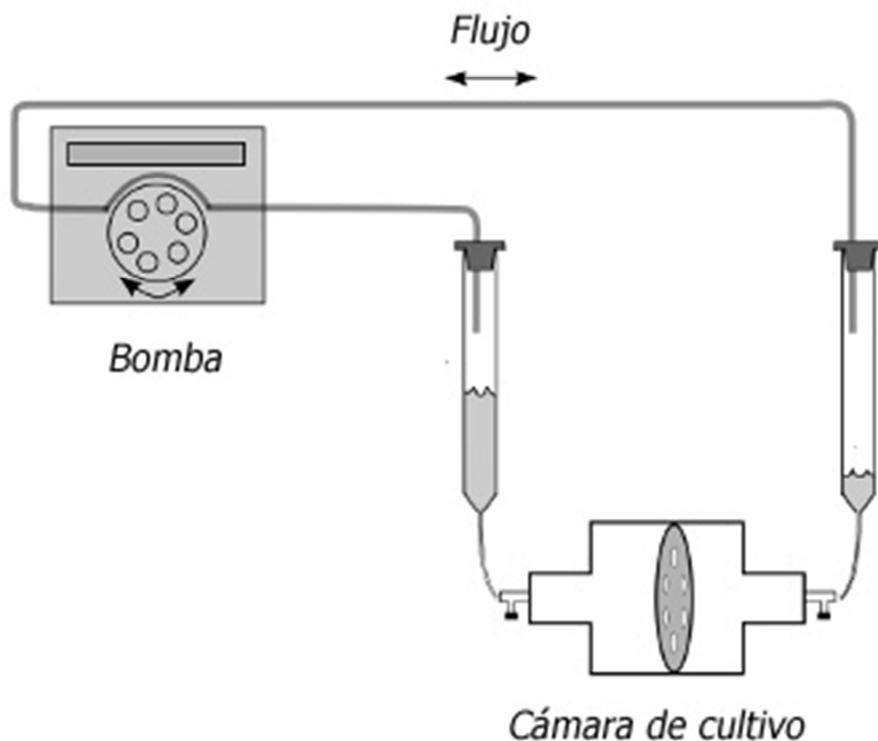


Figura 2.3. Representación esquemática del sistema de sembrado por perfusión.

Además de su efectividad, este sistema de sembrado por perfusión directa puede aplicarse a una gran variedad de tipos de andamiajes que, a su vez, puede integrarse en un sistema de perfusión que permita realizar el cultivo del tejido tras el proceso de sembrado, como ya se ha realizado para andamiajes vasculares, de cartílago y de tejido cardíaco (16).

2.4.2. Biorreactores

Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados en acero inoxidable.

Un biorreactor puede ser también un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular. Estos dispositivos se encuentran en desarrollo para su uso en ingeniería de tejidos.

En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etcétera) al organismo o sustancia química que se cultiva. En función de los flujos de entrada y salida, la operación de un biorreactor puede ser de tres modos distintos:

- Lote (batch)
- Lote alimentado (fed-batch)
- Continuo o quimiostato

Las **funciones del biorreactor** son las siguientes:

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- Mantener constante y homogénea la temperatura.
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado.

2.4.3. Bombas peristálticas

La bomba peristáltica es una bomba de desplazamiento positivo, es decir, tiene una parte de succión y otra de expulsión, por lo que es utilizada para bombeo de una gran variedad de fluidos.

El fluido es transportado por medio de un tubo flexible colocado dentro de una cubierta circular de la bomba; un rotor con un número de rodillos unidos a la circunferencia externa comprimen dicho tubo. Cuando se produce el giro del rotor, el tubo es aplastado continuamente por los rodillos, forzando así al fluido a desplazarse a través del mismo. Entre un paso y otro del rodillo impulsor el tubo recupera su diámetro original generando un vacío que induce el fluido a la bomba. Este proceso es llamado peristalsis y es usado en muchos sistemas biológicos como el aparato digestivo.

El mecanismo más común cuenta con dos o tres rodillos que giran en un compartimento circular comprimiendo de forma progresiva una manguera especial flexible.

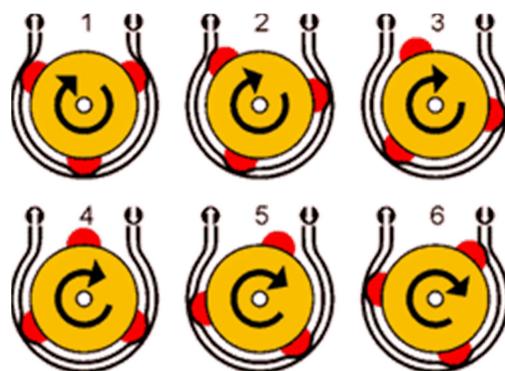


Figura 2.4. Esquema de una bomba peristáltica de tres rodillos.

En esta figura se observa que en ningún momento de las fases 1 a 6, los rodillos dejan de presionar el tubo en al menos un punto. Esto es importante ya que si en algún momento los rodillos dejan de ejercer presión sobre el conducto, el fluido podría retroceder.

El sentido de rotación del motor determina la dirección del flujo, por lo tanto, la bomba peristáltica es un dispositivo de bombeo reversible.

Las bombas peristálticas son ideales para dosificar de manera controlada fluidos o pastas, los cuales son aplicados en un determinado momento o de manera continuada en ciertos procesos.

Ventajas.

Debido a que la única parte de la bomba que entra en contacto con el fluido que es bombeado, es el interior del tubo, las superficies internas de la bomba son fáciles de esterilizar y limpiar. Además, puesto que no hay partes móviles en contacto con el líquido, las bombas peristálticas son baratas de fabricar. Su carencia de válvulas,

de sellos y de arandelas, y el uso de mangueras o tubos, hace que tengan un mantenimiento relativamente de bajo costo comparado a otros tipos de bombas.

Dispositivo de seguridad para las bombas peristálticas.

Debido a que la bomba peristáltica es de desplazamiento positivo, al bombearse contra una válvula cerrada o al cerrarla con la bomba en funcionamiento, o bien, cuando existan pérdidas de carga excesivas en la descarga, se puede romper la manguera interna de la bomba debido a la sobrepresión.

Para evitar esto, es importante que todas las instalaciones que cuenten con bombas peristálticas, tengan un dispositivo de parada o desvío de caudal (bypass), que alerte cuando la bomba supere la presión límite.

Este dispositivo puede ser:

- Presostato (regulador de presión)
- Válvula de seguridad
- Limitador de par

Clasificación de las bombas peristálticas

Las bombas peristálticas se fabrican según las necesidades específicas de su aplicación, en diferentes combinaciones de tubos flexibles, rodillos y demás elementos.

- Bombas peristálticas de alta presión:
Pueden operar con hasta 16 bar, usualmente usan zapatas. Cuentan con cubiertas con lubricante para evitar la abrasión del exterior del tubo de la bomba y ayudar a la disipación del calor.
- Bombas peristálticas de baja presión:
Generalmente tienen cubiertas secas y usan rodillos, además de tuberías no reforzadas. Este tipo de bomba, algunas veces es llamada “bomba de tubo” o “bomba de tubería”.

2.5. Mercado potencial

2.5.1. Posibles aplicaciones del producto

En caso de que los estudios que van a realizarse proporcionen los resultados esperados, EBERS dispondrá de los medios necesarios para transformar dichos resultados en un producto comercial, concretamente un sistema completo de sembrado de células sobre andamiajes por perfusión.

Una parte importante de este sistema se trata de la cámara de sembrado, cuya finalidad será el permitir obtener una distribución de células homogénea en todo el volumen del andamiaje con una elevada eficiencia, para lo que serán de vital importancia los resultados obtenidos de las investigaciones que se llevarán a cabo durante el desarrollo de este proyecto. Además, se tendrán en cuenta otros factores en el diseño de la cámara definitiva. Uno de los más importantes será la de adaptar dicha cámara de cultivo de manera que pueda utilizarse en combinación con el biorreactor TEB1000, que EBERS comercializa en la actualidad, así como con otros sistemas de cultivo ya existentes en el mercado.

De esta manera, la empresa dispondrá de productos complementarios que le proporcionarán una considerable ventaja comercial respecto a sus competidores.

Las cámaras de cultivo y biorreactores que se comercializan en la actualidad son muy pocas ya que el sembrado estático es, todavía, el más utilizado con mucha diferencia. Las cámaras que se utilizan para sembrado dinámico han sido generalmente diseñadas para otras aplicaciones (cultivo) y, por tanto, no proporcionan resultados óptimos. Además, suelen estar específicamente diseñadas para un tipo de sistema, lo que las convierte en sistemas rígidos, poco configurables y, en definitiva, de usabilidad reducida. Por lo tanto, el producto final supondría un considerable avance respecto a los que se distribuyen actualmente en el mercado.

2.5.2. Características generales del mercado

EBERS dirige sus productos al mercado de la investigación en Ingeniería de Tejidos. Sus clientes son, por lo tanto, grupos de investigación públicos (hospitales, universidades, institutos, etc.) y privados (compañías farmacéuticas, biotecnológicas, etc.) centrados en la Ingeniería de Tejidos. Se trata de un mercado con un gran potencial de crecimiento, al que todavía pocas empresas destinan sus productos. Sin embargo, este mercado dispone de un enorme potencial de crecimiento, dada la enorme cantidad de beneficios que promete a la aplicación generalizada de las técnicas que investigan.

A continuación, se comentan los rasgos más relevantes de los principales mercados a los que EBERS dirige sus productos:

- **Mercado español**

Al igual que el resto de países de la Unión Europea, la inversión en investigación en Ingeniería de Tejidos ha aumentado considerablemente en los últimos años. Aunque muy lejos de los países más desarrollados, existen en España numerosos grupos de investigación que realizan labores de investigación en Medicina Regenerativa, de los cuales más de cincuenta se dedican específicamente a la Ingeniería de Tejidos. Dada su proliferación, incluso han comenzado a aparecer redes que agrupan dichos grupos como, por ejemplo, la Red TerCel, de terapia celular, que agrupa a una treintena de ellos.

Del mismo modo, algunas comunidades autónomas han creado centros específicamente orientados a esta disciplina, como el Centro de medicina Regenerativa de Barcelona (CMBR) y el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), lo que garantiza la apuesta del sector público español por la Medicina Regenerativa.

El sector privado, sin embargo, no ha experimentado un crecimiento significativo y todavía son escasas las compañías que operan en este campo. Entre ellas destaca HistoCell, empresa vasca cuya principal área de actividad es el desarrollo de productos de ingeniería tisular.

- **Mercado europeo**

La UE ha proporcionado un gran impulso a la Medicina Regenerativa en los últimos años, aunque el desarrollo de esta disciplina ha sido distinto en los diferentes estados de la Unión. Alemania, probablemente el país más avanzado, ha invertido una gran cantidad de fondos y ha establecido una red de grandes centros de investigación en Medicina Regenerativa. Asimismo, los gobiernos de Inglaterra y Holanda han creado nuevos centros y redes de investigación en Ingeniería de Tejidos dotadas de cuantiosos fondos para realizar investigación en este campo.

Además, merece la pena destacar que ya en 2001 existían 436 empresas relacionadas con la Ingeniería de Tejidos en la UE, el 40% de las cuales estaban radicadas en la propia Alemania y el Reino Unido. En cuanto a su actividad, las británicas se han especializado en la aplicación de las tecnologías existentes, mientras que las alemanas se centran en la especialización en tecnologías y aplicaciones (24).

- **Mercado estadounidense**

Los Estados Unidos encabezan la lista de países en cuanto a investigación en Medicina Regenerativa. Existen multitud de centros de investigación relacionados con esta disciplina, se estima que alrededor de 5.000, regulados por las distintas Agencias Públicas. El gasto que estas agencias dedican a la investigación en este campo es, por tanto, difícil de calcular, aunque se estima que sólo el National Institute of Health (NIH) invirtió más de 600 millones de dólares en 2007 a lo que hay que sumar las contribuciones de la National Science Foundation (NSF), el Department of Defense (DOD) o el National Institute of Standards and Technology (NIST), de las que no se disponen cifras de inversión. A esto hay que sumar las iniciativas propias de los estados que han creado centros de Medicina Regenerativa (California, Connecticut, Illinois, Maryland, New Jersey, New York y Wisconsin).

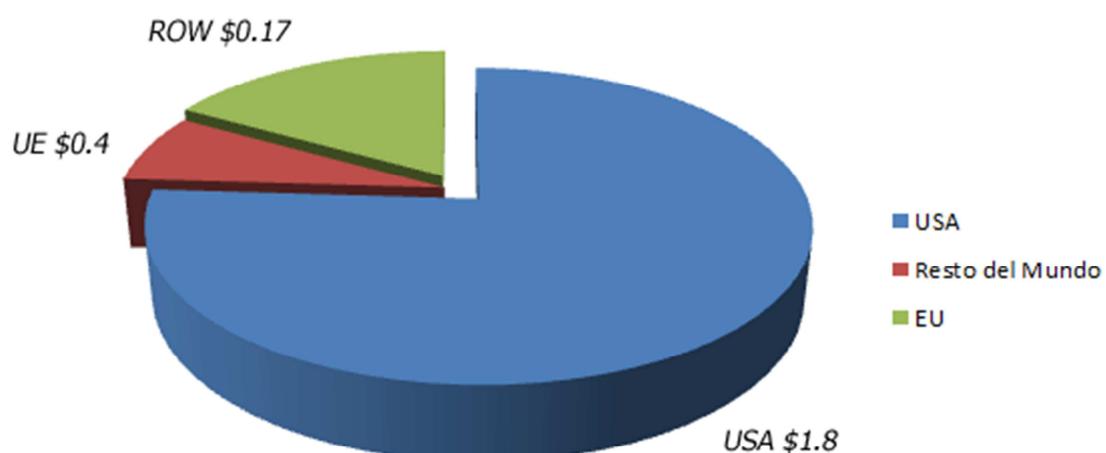


Figura 2.5. Distribución geográfica de la inversión industrial en Ingeniería de Tejidos. Datos en miles de millones de dólares.

En cuanto al tejido empresarial, aproximadamente el 55% de las empresas de Ingeniería de Tejidos están radicadas en Estados Unidos. Además, dichas empresas encabezan la inversión en Medicina Regenerativa, suponiendo aproximadamente el 75% del total, véase Figura 8. Por ello, Estados Unidos supone el mercado de expansión natural para los productos de EBERS.

- **Mercado asiático**

El mercado asiático dispone de mayor potencial de crecimiento que ninguno de los anteriores. Sin embargo, su situación actual es de retraso, especialmente en comparación con el estadounidense y el europeo.

La excepción a este hecho es Japón, que tiene un plan para invertir 831 millones de dólares en un plan de salud, cuyo objetivo principal será la investigación en Medicina Regenerativa y Terapia Celular (25). En una situación algo más primaria se encuentra China que, por su parte, ha comprometido ya 1.000 millones de dólares con objeto de establecer las bases de la investigación en Ingeniería de Tejidos (26). Singapur figura como otro de los posibles campos de expansión natural para los productos de EBERS; recientemente ha sido creado en este país el complejo Biopolis, dedicado a la investigación en ciencias de la vida, que ya ha sido origen de algunos avances notables en Ingeniería de Tejidos.

En los próximos años se espera que otras potencias asiáticas, como India, se vayan introduciendo en el campo de la medicina regenerativa progresivamente.

SEGMENTACIÓN DEL MERCADO

Se ha segmentado el mercado atendiendo a un doble criterio (Figura 2.5):

- Geográfico, distinguiendo entre el mercado europeo, asiático y norteamericano.
- Destino del producto: investigación o aplicación clínica.



Figura 2.6. Segmentación del mercado

El criterio de segmentación geográfico es esencial, ya que condiciona la estrategia de distribución a seguir. Dada la gran extensión y dispersión del mercado conjunto al que nos dirigimos, hemos decidido utilizar distintos canales de distribución en función del segmento. Tal y como se explicará en detalle más adelante, la distribución en el mercado europeo la lleva a cabo directamente EBERS, mientras que en Asia y Norteamérica se realizará a través de partners locales, con una estructura comercial ya establecida y mejor conocimiento de su mercado.

En segundo lugar, la distinción entre los segmentos de investigación y aplicación clínica dentro de cada área geográfica es también fundamental a la hora de establecer una estrategia de marketing adecuada:

- El cliente tipo del segmento de **investigación** es un grupo de investigación universitario, para el que el precio es una variable decisiva de compra, dados los recursos limitados con los que suele contar. Es por ello que los clientes de este segmento también aprecian de forma especial la versatilidad del producto, puesto que les permite ahorrar numerosos costes a medio plazo. Por otra parte, la escalabilidad del proceso de regeneración de tejido no suele ser una cuestión crítica en este segmento, puesto que el biorreactor se va a utilizar en investigación básica. Igualmente, en la mayor parte de los casos no se valora especialmente que el equipo supere las cualificaciones GMP, dado que no se van a utilizar en ensayos clínicos con humanos.
- El cliente tipo del segmento de **aplicación clínica** es una empresa biotecnológica del sector de la Medicina Regenerativa o bien grupos de investigación hospitalarios o clínicos que estén dispuestos a hacer ensayos o a comercializar productos de ingeniería de tejidos para su uso en humanos. Los clientes de este segmento están dispuestos a aceptar precios más elevados por el equipo, si bien demandan características técnicas específicas. Por ejemplo, la escalabilidad de la producción tisular es una cuestión primordial, lo que implica que el biorreactor ya no puede tener una configuración tan flexible como en el caso anterior, sino que ha de estar especialmente adaptado para la aplicación que el cliente desea. Además, el cliente de este segmento demanda que el equipo esté conforme a toda la normativa GMP.

En vista de esta segmentación, es necesario notar que el segmento de mercado a que EBERS es el de la investigación desde un primer momento. En el futuro, en función de los resultados obtenidos, EBERS planteará la expansión de su mercado al de la aplicación clínica, que requiere del cumplimiento de requisitos mucho más exigentes.

2.5.3. Potencial y atractivo del mercado de la Ingeniería de Tejidos.

Como ha quedado de manifiesto, el mercado de la Ingeniería de Tejidos es muy joven y en él se está llevando a cabo una intensa actividad investigadora, unida necesariamente a la potente inversión, tanto pública como privada. Los biorreactores EBERS, concebidos para la investigación de Ingeniería de Tejidos, se adaptan perfectamente a este atractivo de mercado.

Según datos del año 2007, la inversión pública mundial en investigación en Ingeniería de Tejidos rondó los 2.400 millones de dólares, mientras que el sector privado aporto 1.000 millones. Además, el número de trabajadores en empresas del sector no ha dejado de aumentar desde 2003 y alcanza actualmente los 6.100, mientras que el número de pacientes tratados con estas técnicas se ha incrementado notablemente y ya asciende a 1.2 millones, cifras propias del sector en plena expansión (figura 10). Sin embargo, aún son pocos los productos que han

llegado al mercado, por lo que el gasto en I+D continuará aumentando en los próximos años.

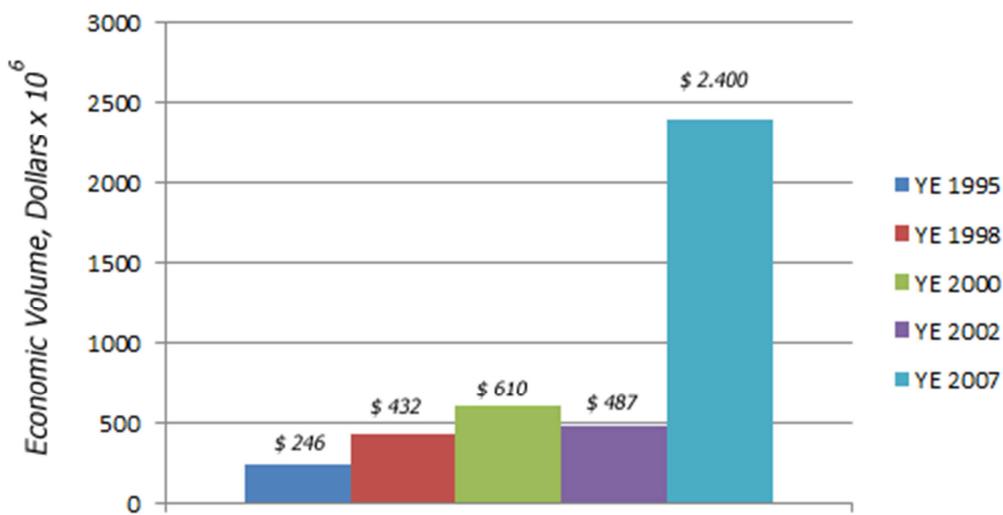


Figura 2.7. Crecimiento del valor económico de la Ingeniería de Tejidos desde 1995.

De hecho, la identificación de las principales líneas de investigación que han de seguirse es clave para obtener los resultados deseados. Recientemente, el *Multi-Agency Tissue Engineering Science Interagency Working Group (MATES-IWG)*, encargado de coordinar la investigación entre las distintas agencias estadounidenses que trabajan en Ingeniería de Tejidos (27), ha emitido un informe en que se detallan las ocho líneas de investigación más importantes en Ingeniería de Tejidos. Entre ellas, “el desarrollo de nuevos biorreactores que faciliten el crecimiento y el desarrollo de tejidos y órganos completos” figura como una de las más importantes. Igualmente, se especifica la importancia de desarrollar nuevas herramientas y biorreactores que controlen el desarrollo celular, así como el entorno químico y mecánico para que los tejidos se desarrollen correctamente en un entorno tridimensional.

Además del incremento del gasto en investigación básica, otra consecuencia de la crisis del periodo 2000-2003 fue la expansión de la investigación en Ingeniería de Tejidos y la creación de empresas de este sector fuera de los Estados Unidos. Ello ha contribuido a diversificar el mercado y a abrir nuevas oportunidades de negocio.

Capítulo 3:

DISEÑO DE UN SISTEMA DE SEMBRADO PARA ANDAMIAJES



CAPÍTULO 3. Diseño de un sistema de sembrado para andamiajes

3.1. Introducción y objetivos

En este capítulo se van a realizar simulaciones experimentales de bombeo de flujo en el biorreactor mediante una bomba peristáltica que permita realizar sembrado por perfusión directa (23). El objetivo principal de estos ensayos de bombeo realizados es comprobar experimentalmente el correcto funcionamiento del sistema.

El circuito de sembrado que se utiliza, consta de una bomba peristáltica que bombea aire alternativamente en una y otra dirección. Debido al funcionamiento de la bomba peristáltica, el medio con las células en disolución no puede ser bombeado directamente ya que el aplastamiento al que se someten los tubos mataría las células, por lo tanto se realiza el bombeo con aire. Ese aire bombeado es el que impulsa el fluido que contiene a las células, situado en unos tubos de mayor diámetro y que actúan como reservorios, haciéndolo pasar por la cámara de sembrado donde se encuentra el scaffold.

En el siguiente esquema, se muestra en rojo la zona donde se encuentra el fluido con las células en disolución, y en verde la zona donde sólo hay aire.

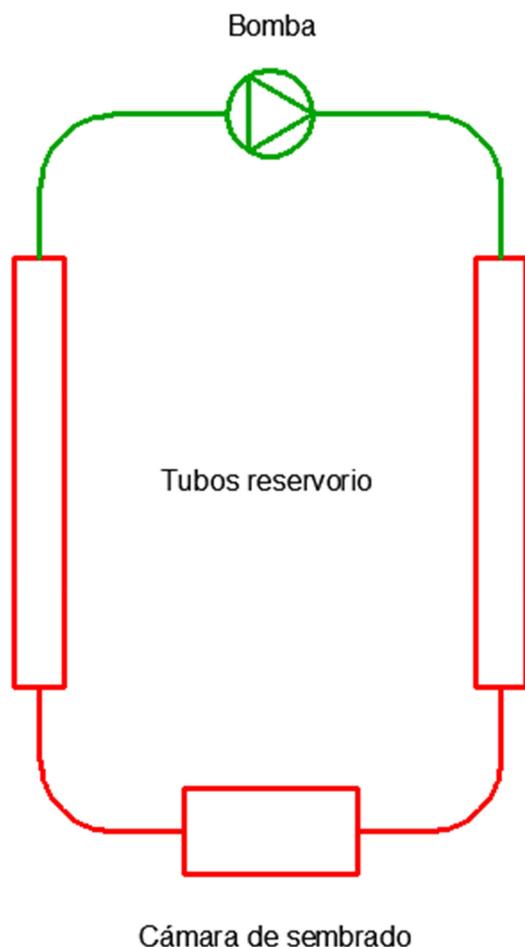


Figura 3.1. Esquema del circuito de sembrado

Al finalizar cada ensayo de bombeo, se analizan los valores de caudal utilizado y el volumen de fluido desplazado en cada dirección, comprobando si existen desequilibrios en el sistema y, en el caso de que así sea, se determina la causa de los mismos para corregirlo.

3.2. Materiales y métodos

Una vez instalado y operativo el biorreactor donde se llevará a cabo el sembrado de células, se realizarán los ensayos de bombeo en condiciones lo más similares posibles a las condiciones de trabajo.

El parámetro que ejerce mayor influencia en los ensayos es la **velocidad del fluido a su paso por la cámara**, ya que de ella depende la probabilidad de que las células se queden adheridas al scaffold tras pasar a través del mismo. Tras analizar otros ensayos similares realizados con anterioridad en el campo de la Ingeniería de Tejidos (21), (23), se tomó 5mm/s como la velocidad adecuada para el fluido en la cámara de sembrado.

La cámara utilizada para los ensayos tiene un diámetro de 4mm por lo que el caudal que necesitamos se calcula con la siguiente fórmula:

$$Q = S \times v = \frac{\pi \times D^2}{4} \times v$$

Donde S es la sección de la cámara a la entrada cuyo diámetro se expresa en mm, y v la velocidad del fluido en esa sección, expresado en mm/s.

Tras sustituir los valores y realizar el cambio de unidades necesario para obtener el caudal en ml/min, obtenemos lo siguiente:

$$Q = 62,83 \text{ mm}^3/\text{s} = 3,769 \text{ ml}/\text{min}$$

- FLUIDO DEL ENSAYO

El fluido utilizado para las pruebas fue 7ml de agua. Para las pruebas de bombeo a realizar, no es necesario disponer de la disolución de células ya que lo único que nos interesa es medir los parámetros obtenidos en mediante el bombeo de aire con la bomba peristáltica.

Elegimos el agua como fluido a hacer pasar por la cámara de sembrado porque sus propiedades son muy similares a las del medio de cultivo que contendrá a las células en el proceso de sembrado dinámico.

Para un correcto funcionamiento del proceso de sembrado, se debe evitar que el aire llegue a la cámara donde se encuentra el scaffold ya que si el aire llega a esta zona, las probabilidades de que las células se adhieran correctamente al scaffold disminuyen notablemente. Por lo tanto, en cada ciclo de bombeo se hizo pasar por el scaffold sólo una parte del fluido, dejando siempre 1,5 ml restantes como medida de seguridad de forma que en el caso de que se sucediesen desequilibrios, el aire no llegase a la cámara de sembrado.

Nótese que, como se ha comentado anteriormente, al iniciarse el primer ciclo de bombeo, la cantidad de fluido que hay a cada lado de la cámara, es la misma. Por lo tanto, la duración del primer intervalo de bombeo será la mitad con respecto a los siguientes.

En concordancia con esto, se programó la bomba para que hiciera pasar a través del scaffold 2 ml de fluido en el primer intervalo y 4ml en los posteriores.

- SEMBRADO POR PERFUSIÓN DIRECTA

Se utilizó la perfusión directa como método de sembrado celular. Se trata de un sistema de sembrado dinámico que consiste en hacer pasar el fluido por el scaffold alternativamente en una y otra dirección.

La principal ventaja de este método frente a otros métodos estáticos es que se consigue un reparto celular uniforme y homogéneo en el scaffold (8). Además, este método permite integrar el sistema de sembrado de células con el sistema de cultivo que se realizará a continuación. Gracias a esto, no hace falta manipular el scaffold entre las fases de sembrado y cultivo, reduciendo así las posibilidades de contaminación de las células.

- BOMBA PERISTÁLTICA

Para los ensayos realizados, se utilizaron dos cabezales de bomba de distintas características del fabricante Watson-Marlow. A continuación se detallan las propiedades de cada uno de los dos modelos utilizados:

- Watson Marlow 314D

- El cabezal de la bomba consta de 4 rodillos.
- Un único canal de carga.
- Caudal máximo: 2 l/min.
- Permite usar 7 diámetros de tubo distintos.
- Posibilidad de colocar hasta 6 cabezales en una misma unidad.



Figura 3.2. Cabezal Watson-Marlow 314D

- Watson Marlow 308MC

- Cabezal de bomba provisto de 8 rodillos para mayor precisión.
- Disponible con 3 o 5 canales de carga.
- Permite acoplar varios cabezales para alcanzar 15 canales.
- Cada canal es independiente, es posible retirar uno sin afectar al resto.



Figura 3.3. Cabezal Watson-Marlow 318MC

- TUBOS TYGON

Los tubos que se colocan en el cabezal de la bomba requieren una resistencia muy alta para evitar el desgaste al ser continuamente aplastados por los rodillos de la bomba.

Los tubos Tygon son tubos flexibles, blandos y tienen buena resistencia a la corrosión por productos químicos y a la compresión, por lo que son muy adecuados para utilizarlos con bombas peristálticas de bajo rendimiento como la utilizada en los ensayos.

Se utilizaron tubos de distintos diámetros en función del cabezal:

Cabezal de bomba	Diámetro tubo [mm]
314D	0,8
	1,6
MC318	0,88
	1,52



Figura 3.4. Tubos de silicona y tubos Tygon

- TUBOS DE SILICONA

Para la parte del circuito que no entra en contacto con los rodillos del cabezal de la bomba, no es necesaria la utilización tubos de alta resistencia como la que ofrecen los tubos Tygon.

Así pues, se utilizaron tubos de silicona como reservorios para el fluido a bombeiar y conectores de distintas características para unir estos tubos a la cámara de sembrado y a los tubos Tygon de la bomba.

Los tubos de silicona utilizados en los distintos ensayos son de diámetro 6,4mm y 4,8mm

- CONECTORES LUER

El sistema LUER es un sistema de conexión estandarizado para evitar fugas entre un macho y el acoplamiento hembra correspondiente en instrumentos médicos y de laboratorio tales como tubos, jeringuillas, agujas hipodérmicas o llaves de paso. Este tipo de conexión, recibe el nombre del médico alemán Hermann Wülfing Luer, que lo inventó en el siglo XIX.

Hay dos variedades de conexión Luer:

- Luer Lock: la parte hembra del conector tiene unas pestañas que se atornillan al macho.
- Luer Slip: el ajuste se consigue por fricción de las dos partes.



Figura 3.5. Conectores tipo LUER

- BIORREACTOR DE FLUJO: TEB1000

El cultivo celular para la ingeniería de tejidos ha de desarrollarse en unas condiciones ambientales particularmente exigentes, ya que es necesario controlar una gran cantidad de variables que afectan decisivamente al proceso de crecimiento y expansión celular como, por ejemplo, temperatura, el PH del medio de cultivo, la concentración de nutrientes o la aplicación de estímulos mecánicos sobre el andamiaje y/o las células entre otros. A fin de facilitar este proceso y el control de algunas de las variables que intervienen en el proceso de cultivo celular, EBERS comercializa el biorreactor de flujo TEB1000 (figura 3.7)



Figura 3.6. Biorreactor TEB 1000

Dicho biorreactor, destinado por completo al mercado de la investigación, permite controlar las variables que intervienen en el cultivo de las células, mejorando considerablemente la entrega de nutrientes y la eliminación de las sustancias de desecho en comparación con un cultivo estático. Para ello, se sirve de un sistema de control de flujo de medio de cultivo, que permite prescribir unas condiciones de cultivo especificando parámetros como el caudal o la velocidad del fluido así como especificar el modo en que las células van a ser estimuladas por la acción del propio flujo.

Las **principales ventajas** del biorreactor TEB 1000 frente a otros equipos del mercado son las siguientes:

✓ **Versatilidad**

El equipo es completamente modular, de tal modo que al biorreactor TEB1000 se le pueden acoplar distintas cámaras de cultivo, cada una de ellas válida para una aplicación específica. EBERS comercializa varios diseños de cámaras de cultivo, pero existe la posibilidad de que el usuario utilice sus propias cámaras de cultivo con el TEB1000.

✓ **Control automático de la estimación celular**

El equipo dispone de un sistema electrónico para el control del flujo de medio cultivo que permite regular de forma prefijada y automática el grado de estimulación mecánica aplicado sobre las células del cultivo.

✓ **Equipo completo.**

La principal ventaja del biorreactor EBERS con respecto a otros equipos de características similares disponibles en el mercado reside en la integración total de todos componentes necesarios para crear las condiciones aptas para el desarrollo celular.

Gracias a esta característica, no es necesario utilizar ningún o muy escaso equipamiento adicional para desarrollar los cultivos, lo que resulta en experimentos más limpios, baratos y fáciles de desarrollar.

Dicha integración se obtiene gracias a la Master Unit TEB1000, que constituye en núcleo del biorreactor EBERS. Esta unidad incluye toda la maquinaria y los elementos de control para proporcionar un ambiente de control apropiado, incluyendo:

- Sistema de bombeo de medio de cultivo
- Control de temperatura
- Control de la concentración de CO₂
- Control de la concentración de O₂

Por tanto, una vez que las condiciones de cultivo están ya garantizadas, sólo es necesario utilizar una cámara de cultivo y material accesorio, como tubos o reservorios para medio de cultivo, para completar todo lo necesario para el desarrollo de cultivos celulares en Ingeniería de Tejidos.

✓ **Coste**

El coste inicial del TEB 1000 es, de por sí, inferior al de otros equipos equivalentes del mercado. Además, su diseño versátil y modular permite ampliar el rango de aplicaciones del equipo en un futuro a un coste reducido.

✓ Panel de control

El biorreactor incluye un sistema de control integrado mediante pantalla táctil donde configurar todos los parámetros necesarios del proceso de sembrado. Esta particularidad lo hace muy sencillo de manejar para el usuario.



Figura 3.7. Pantalla de control táctil

- CÁMARA DE CULTIVO (P3D-6)

La cámara donde se aloja el scaffold en el proceso de sembrado se ha fabricado con polipropileno mediante moldeo por inyección.

Al tratarse de la parte del circuito donde va a alojarse el scaffold, y por tanto, donde se va a realizar todo el proceso de sembrado y cultivo celular, se requiere que esté correctamente esterilizada para evitar contaminar el proceso de sembrado de células.

Las cámaras P3D han sido diseñadas específicamente para el sembrado y cultivo de células en scaffolds. La cámara está formada por dos partes (macho y hembra) entre las cuales se aloja el scaffold, impidiendo el movimiento de éste.

La fijación de la cámara es regulable, de forma que el usuario pueda alojar en ella scaffolds de distintos diámetros y alturas.

Características:

- Conexiones de tipo LUER

Estas conexiones facilitan el acoplamiento de la cámara con los tubos que conforman el circuito de sembrado

- **Material transparente**

La trasparencia del plástico utilizado, permite monitorizar visualmente el proceso.

- **No hay superficies perpendiculares**

La cámara se ha fabricado minimizando las superficies perpendiculares a la dirección del flujo. Esto facilita el paso del fluido y evita que las células se depositen en las paredes de la cámara.

- **Fácil introducción / extracción del scaffold**

La apertura y cierre de la cámara se ha simplificado para evitar posibles daños en el scaffold durante la inserción o extracción del mismo.

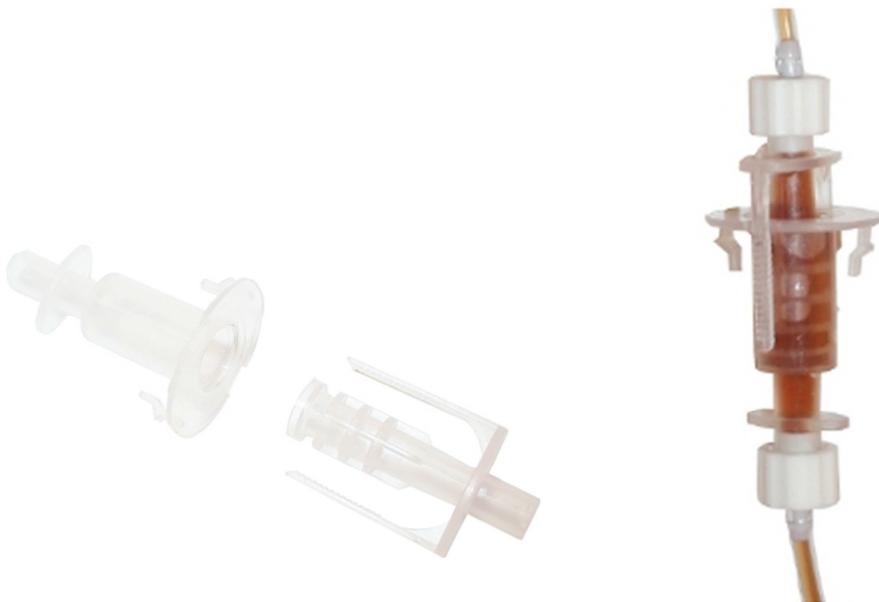


Figura 3.8. Cámara de cultivo P3D-6

El montaje del equipo se hizo sobre un soporte diseñado y construido para este ensayo, y que nos permite colocar los tubos donde circula el fluido en posición vertical.

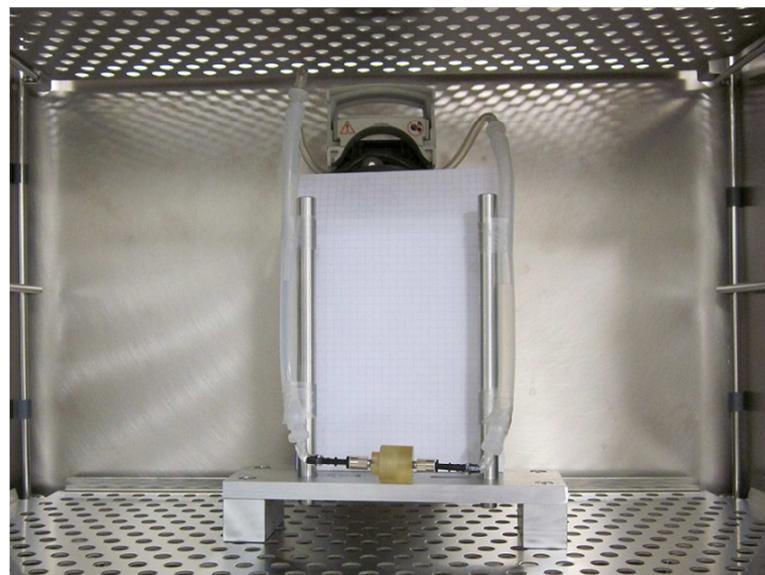


Figura 3.9. Montaje para el ensayo de bombeo

3.3. Estudio del desequilibrio durante el proceso de bombeo

3.3.1. Introducción al ensayo y objetivo

El objetivo de estos ensayos es medir el volumen de fluido desplazado en cada dirección de funcionamiento de la bomba mediante la realización de simulaciones de bombeo en condiciones similares a las que se producirán en el sembrado de células y evaluar los resultados obtenidos.

La duración del ensayo se determinó de modo que se asemejara a la de un proceso de sembrado real, se programó el birreactor para que ejecutara ciclos de 50 repeticiones con las condiciones obtenidas en el estudio preliminar descrito en el apartado de materiales y métodos (3.2).

El aire bombeado por el cabezal de la bomba impulsa al fluido contenido en unos tubos que actúan como reservorio y cuyo diámetro es 6,4mm, haciéndolo pasar por la cámara donde se sitúa el scaffold de forma que el flujo vaya alternativamente en una y otra dirección.

3.3.2. Realización del ensayo

Antes de iniciar el ensayo se anotó la altura del fluido en la hoja milimetrada que colocamos en el soporte de los tubos.

Para evaluar el desequilibrio, tras la realización de los ciclos programados, se midió la diferencia en milímetros entre la altura a la que se encontraba el fluido en el tubo reservorio antes de iniciar el proceso, y la altura a la que se encuentra tras todo el proceso de bombeo, obteniendo así el volumen de líquido que se ha desequilibrado en una u otra dirección.

Esto permitió visualizar fácilmente si existía algún desequilibrio en el proceso y el carácter del mismo, si se trata de un desequilibrio irregular o por lo contrario, es progresivo y predecible.

Los distintos ensayos realizados se monitorizaron de manera continua para observar si el desequilibrio, en el caso de que se produjera, ocurría de forma continuada y acumulativa ciclo tras ciclo o, por el contrario, se debe a algún suceso puntual.

Se realizaron ensayos con los dos cabezales disponibles, 314D y MC318, dando como resultado, en ambos casos, desequilibrios muy irregulares como se observan en la Tabla 3.1.

Caudal [ml/min]	Revoluciones de la bomba [rpm]	Diámetro de tubo bomba [mm]	Volumen desplazado por ciclo [ml]	Nº de ciclos	Sentido desequilibrio	Altura de desequilibrio [mm]
3,769	4,5	1,8	2,5	50	Izquierdas	15
3,769	4,5	1,8	2,5	27	Derechas	-
3,769	4,5	1,8	2,5	50	Izquierdas	135
3,769	4,5	1,8	2,5	50	-	0
3,769	4,5	1,8	2,5	50	Derechas	27
3,769	4,5	1,8	2,5	50	Izquierdas	60
3,769	25	0,8	2,5	50	Derechas	61
3,769	25	0,8	2,5	25	Derechas	64
3,769	25	0,8	2,5	20	Izquierdas	20
3,769	25	0,8	2,5	50	Derechas	130
3,769	25	0,8	2,5	25	Izquierdas	34
3,769	25	0,8	2,5	20	Derechas	26

Tabla 3.1. Tabla de mediciones de bombeo

Los campos sombreados en la tabla, corresponden a ensayos en los que el desequilibrio del fluido superó los 1,5 ml que establecimos como medida de seguridad, y por tanto el aire pasó a la cámara de sembrado. En el segundo ensayo se produjo gran desequilibrio y por lo tanto se interrumpió el proceso sin llegar a completar los ciclos programados. Este mal funcionamiento se atribuyó a un mal colocamiento del tubo en el cabezal de la bomba

3.3.3. Hipótesis de la causa de mal funcionamiento

Al observar desequilibrios tan irregulares en cada ensayo se contemplaron algunas posibles causas del problema:

- Error en el cambio de sentido de bombeo.

La bomba se programó de forma que se ejecutaba un bombeo en un sentido de giro e inmediatamente, al terminar, comenzaba a bombear en dirección opuesta sin realizar ninguna pausa intermedia. El tiempo que emplea el motor en realizar el cambio de sentido de giro puede provocar que el siguiente ciclo tenga una duración inferior al tiempo programado, en caso de que esto sucediese, esto provocaría desequilibrios ya que el tiempo de bombeo en cada una de las direcciones sería distinto.

Para descartar que esto causara problemas, se creó otro programa en el que la bomba realizaba una pausa de 2 segundos entre cada bombeo en direcciones opuestas.

Los resultados obtenidos con el programa de bombeo modificado, seguían mostrando claros desequilibrios por lo que se descartó que esta pudiera ser la causa principal de los mismos.

- Asimetría del circuito.

Se valoró la posibilidad de que el desequilibrio estuviera causado por la diferencia en cuanto a la resistencia fluídica que presenta el circuito según el sentido de bombeo. Para descartar esta posibilidad, se minimizó el diferencial de resistencia fluídica en cada uno de los dos sentidos de bombeo mediante la utilización de las mismas longitudes de cada tubo y los mismos conectores en ambos lados del circuito de sembrado.

Adicionalmente, se realizaron nuevos ensayos comenzando el bombeo en el sentido contrario al usado habitualmente dando como resultado valores de desequilibrio similares independientemente del sentido de bombeo inicial.

- Error en el giro del motor que controla la bomba.

Al programarse ciclos de bombeo en los que la bomba trabaja el mismo tiempo en los dos sentidos de giro, la posición del cabezal debería ser la misma cuando se acaba el proceso que cuando se inicia.

Sin embargo, en uno de los ensayos realizados, se observó que, tras ejecutarse el programa de sembrado completo, la bomba no acabó en la posición en la que lo había iniciado.

Según los parámetros del programa de bombeo utilizado, se calcularon las revoluciones teóricas que debía proporcionar el motor en el eje de salida y se inició

un ciclo con el cabezal de la bomba abierto para poder contabilizar si se correspondían con las que se producían en el cabezal de la cámara.

Se observó que el giro no se correspondía con el teórico. Además el error que se producía era irregular y completamente distinto en cada ciclo de giro de la bomba, lo que determinaba que los desequilibrios producidos en los ensayos previos, eran producidos principalmente por este desajuste.

Esto se consideró como causa principal de los desequilibrios por lo que se realizó una reprogramación del autómata que regula el giro del motor.

3.4. Reajuste del motor de la bomba

Tras reprogramar el motor de giro de la bomba, se realizaron nuevas pruebas de bombeo para comprobar que con un giro correcto no se producirían desequilibrios en el flujo.

Se realizaron programas cortos de 5 bombeos en cada dirección y el material utilizado para estos ensayos fue el siguiente:

- Cabezal de bomba Watson Marlow 308MC
- Tubos Tygon de 0.88 y 1.52 mm de diámetro para la bomba
- Tubos de silicona de 4.8 mm de diámetro como reservorios del fluido.
- Los valores de caudal utilizados fueron 0.5 y 1 ml/min.

Se tomó nota de 2 mediciones en cada uno de los 5 bombeos y se calculó la media.

- Giro del eje de la bomba
- Altura de fluido desplazado

Con los datos obtenidos se elaboraron dos tablas que muestran los resultados obtenidos en cada una de las direcciones de bombeo.

Caudal programado [ml/min]	Vueltas completas [rev]	Diámetro de tubo bomba [mm]	Altura desplazada [mm]	Diámetro de tubo reservorio [mm]	Volumen por vuelta [mm/rev]
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	45	4,8	0,039055162
0,5	20,85	0,88	45,8	4,8	0,039749476
1	20,85	0,88	47	4,8	0,040790947
1	20,85	0,88	47	4,8	0,040790947
1	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
1	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
1	20,85	0,88	47	4,8	0,040790947
1	20,85	0,88	46,6	4,8	0,04044379
0,5	7,75	1,52	47	4,8	0,109740806
0,5	7,75	1,52	47	4,8	0,109740806
0,5	7,75	1,52	46	4,8	0,107405895
0,5	7,75	1,52	46	4,8	0,107405895
0,5	7,75	1,52	46	4,8	0,107405895
0,5	7,75	1,52	46,4	4,8	0,108339859
1	7,75	1,52	47	4,8	0,109740806
1	7,75	1,52	47	4,8	0,109740806
1	7,75	1,52	48	4,8	0,112075717
1	7,75	1,52	47	4,8	0,109740806
1	7,75	1,52	47	4,8	0,109740806
1	7,75	1,52	47,2	4,8	0,110207788

Tabla 3.2. Tabla de mediciones de bombeo en sentido horario.

Caudal programado [ml/min]	Vueltas completas [rev]	Diámetro de tubo bomba [mm]	Altura desplazada [mm]	Diámetro de tubo reservorio [mm]	Volumen por vuelta [mm/rev]
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
0,5	20,85	0,88	45	4,8	0,039055162
0,5	20,85	0,88	45,8	4,8	0,039749476
1	20,85	0,88	47	4,8	0,040790947
1	20,85	0,88	47	4,8	0,040790947
1	20,85	0,88	47	4,8	0,040790947
1	20,85	0,88	46	4,8	0,039923055
1	20,85	0,88	48	4,8	0,041658839
1	20,85	0,88	47	4,8	0,040790947
0,5	7,75	1,52	46	4,8	0,107405895
0,5	7,75	1,52	45	4,8	0,105070984
0,5	7,75	1,52	45	4,8	0,105070984
0,5	7,75	1,52	44	4,8	0,102736073
0,5	7,75	1,52	44	4,8	0,102736073
0,5	7,75	1,52	44,8	4,8	0,104604002
1	7,75	1,52	42	4,8	0,098066252
1	7,75	1,52	45	4,8	0,105070984
1	7,75	1,52	44	4,8	0,102736073
1	7,75	1,52	45	4,8	0,105070984
1	7,75	1,52	45	4,8	0,105070984
1	7,75	1,52	44,2	4,8	0,103203056

Tabla 3.3. Tabla de mediciones de bombeo en sentido anti-horario.

Como se observa en las tablas 3.2 y 3.3, el giro del motor se ha corregido completamente ya que esta vez el giro del cabezal de la bomba es preciso, pero sigue existiendo cierta diferencia en el volumen de fluido bombeado en cada ciclo. Sin embargo, este desequilibrio es muy ligero e inferior al que se registraba anteriormente y, lo que es más importante, se trata de un desequilibrio en cierta medida “predecible”, ya que suele darse siempre en la misma dirección de bombeo y aumentar con diámetros de tubo y caudales mayores. Por lo tanto, se podría estudiar y corregir mediante software si fuera necesario.

3.5. Estudio de la estabilidad de bombeo en los perfiles de sembrado

3.5.1. Introducción y objetivo del ensayo

Una vez subsanado el problema referente al giro del motor del biorreactor, se procedió a continuar las pruebas de sembrado.

Éstas se van a realizar con caudales muy variables, desde 0,6 ml/min hasta 6,5 ml/min, cubriendose así los rangos de caudales que se utilizarán posteriormente para el sembrado celular.

El objetivo de estas nuevas simulaciones es medir los valores de caudal de aire bombeado por el cabezal de la bomba para compararlo con el valor del caudal teórico de bombeo con líquido.

3.5.2. Realización del ensayo.

El proceso de sembrado se llevará a cabo con el cabezal 318MC ya que dispone de 5 canales de carga distintos e independientes frente al único canal que nos ofrece el cabezal 314D. Los experimentos se centraron en analizar los resultados con el cabezal Watson-Marlow 318MC.

El objetivo de estas nuevas pruebas es determinar el perfil de flujo real teniendo en cuenta el posible porcentaje de error de caudal obtenido experimentalmente bombeando aire, respecto al teórico de la bomba dado proporcionado por el fabricante para un bombeo con líquido.

Para ello se utilizaron tubos de distintos diámetros, observando así cual ofrece un comportamiento más cercano a los valores de caudal teórico. Se dispone de tubos 1,52 mm y 2.79 mm.

Con los datos obtenidos se completó una tabla en la que se establecieron todos los parámetros de cada semi-ciclo realizado:

- sentido de giro
- caudal programado
- tiempo programado
- tubo utilizado
- volumen de fluido desplazado
- caudal medido (en función de ese volumen y las revoluciones por minuto del giro del cabezal de la bomba).

Con la diferencia entre caudal teórico y caudal medido, calculamos el porcentaje de error para cada semi-ciclo de bombeo.

Dirección de giro [Derecha/Izquierda]	Caudal programado [ml/min]	Tiempo programado [min]	Tubo bomba [mm]	Volumen [ml]	Caudal [ml/min]	%Error	Rpm bomba
Izquierda	0,6	210	1,52	1,447644672	0,411652513	31,39124777	4,615384615
Derecha	0,6	210	1,52	1,682886931	0,478546047	20,24232554	4,615384615
Izquierda	0,6	210	1,52	1,46574023	0,41679817	30,53363837	4,615384615
Derecha	0,6	210	1,52	1,610504698	0,457963421	23,67276315	4,615384615
Izquierda	0,6	210	1,52	1,447644672	0,411652513	31,39124777	4,615384615
Derecha	0,6	210	1,52	1,664791373	0,47340039	21,09993494	4,615384615
Izquierda	0,6	210	1,52	1,447644672	0,411652513	31,39124777	4,615384615
Derecha	0,6	210	1,52	1,610504698	0,457963421	23,67276315	4,615384615
Izquierda	0,6	210	1,52	1,483835789	0,421943826	29,67602897	4,615384615
Derecha	0,6	210	1,52	1,610504698	0,457963421	23,67276315	4,615384615
Izquierda	1,3	92	1,52	1,501931347	0,958679583	26,25541667	10
Derecha	1,3	92	1,52	1,574313581	1,004881009	22,70146084	10
Izquierda	1,3	92	1,52	1,46574023	0,93557887	28,03239458	10
Derecha	1,3	92	1,52	1,592409139	1,016431365	21,81297189	10
Izquierda	1,3	92	1,52	1,501931347	0,958679583	26,25541667	10
Derecha	1,3	92	1,52	1,592409139	1,016431365	21,81297189	10
Izquierda	1,3	92	1,52	1,483835789	0,947129227	27,14390562	10
Derecha	1,3	92	1,52	1,610504698	1,027981722	20,92448293	10
Izquierda	1,3	92	1,52	1,483835789	0,947129227	27,14390562	10
Derecha	1,3	92	1,52	1,592409139	1,016431365	21,81297189	10
Izquierda	2,6	46	1,52	1,429549114	1,864629279	28,28348928	20
Derecha	2,6	46	1,52	1,610504698	2,100658301	19,20544995	20
Izquierda	2,6	46	1,52	1,46574023	1,911835083	26,46788142	20
Derecha	2,6	46	1,52	1,610504698	2,100658301	19,20544995	20
Izquierda	2,6	46	1,52	1,483835789	1,935437985	25,56007748	20
Derecha	2,6	46	1,52	1,592409139	2,077055399	20,11325389	20
Izquierda	2,6	46	1,52	1,46574023	1,911835083	26,46788142	20
Derecha	2,6	46	1,52	1,610504698	2,100658301	19,20544995	20
Izquierda	2,6	46	1,52	1,501931347	1,959040888	24,65227355	20
Derecha	2,6	46	1,52	1,610504698	2,100658301	19,20544995	20
Izquierda	6,5	46	1,52	3,239104954	4,224919505	35,00123839	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,528633888	4,602565941	29,19129322	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,329582746	4,342934016	33,18563052	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,61911168	4,720580452	27,37568535	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,420060538	4,460948527	31,37002266	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,637207238	4,744183354	27,01256378	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,456251654	4,508154332	30,64377951	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,655302797	4,767786257	26,6494422	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,492442771	4,555360136	29,91753636	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,655302797	4,767786257	26,6494422	50

Tabla 3.4. Resultados del ensayo de bombeo

Dirección de giro [Derecha/Izquierda]	Caudal programado [ml/min]	Tiempo programado [min]	Tubo bomba [mm]	Volumen [ml]	Caudal [ml/min]	%Error	Rpm bomba
Izquierda	6,5	46	1,52	3,474347213	4,531757234	30,28065794	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,691493914	4,814992061	25,92319906	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,492442771	4,555360136	29,91753636	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,709589472	4,838594963	25,56007748	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,474347213	4,531757234	30,28065794	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,691493914	4,814992061	25,92319906	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,474347213	4,531757234	30,28065794	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,691493914	4,814992061	25,92319906	50
Izquierda	6,5	46	1,52	3,51053833	4,578963039	29,55441479	50
Derecha	6,5	46	1,52	3,709589472	4,838594963	25,56007748	50
Izquierda	1,65	73	2,79	1,755269165	1,385738814	16,01582944	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,773364723	1,400024781	15,15001324	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,791460282	1,414310749	14,28419705	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,773364723	1,400024781	15,15001324	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,447644672	1,142877373	30,73470469	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,393357997	1,100019471	33,33215326	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,375262438	1,085733504	34,19796945	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,375262438	1,085733504	34,19796945	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,393357997	1,100019471	33,33215326	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,393357997	1,100019471	33,33215326	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,302880205	1,028589635	37,66123422	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,320975763	1,042875603	36,79541803	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,302880205	1,028589635	37,66123422	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,320975763	1,042875603	36,79541803	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,302880205	1,028589635	37,66123422	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,320975763	1,042875603	36,79541803	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,320975763	1,042875603	36,79541803	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,320975763	1,042875603	36,79541803	5
Izquierda	1,65	73	2,79	1,302880205	1,028589635	37,66123422	5
Derecha	1,65	73	2,79	1,302880205	1,028589635	37,66123422	5
Izquierda	3,3	36	2,79	1,375262438	2,171467008	34,19796945	10
Derecha	3,3	36	2,79	1,302880205	2,057179271	37,66123422	10
Izquierda	3,3	36	2,79	1,35716688	2,142895074	35,06378565	10
Derecha	3,3	36	2,79	1,302880205	2,057179271	37,66123422	10
Izquierda	3,3	36	2,79	1,339071322	2,114323139	35,92960184	10
Derecha	3,3	36	2,79	1,302880205	2,057179271	37,66123422	10
Izquierda	3,3	36	2,79	1,35716688	2,142895074	35,06378565	10
Derecha	3,3	36	2,79	1,302880205	2,057179271	37,66123422	10
Izquierda	3,3	36	2,79	1,35716688	2,142895074	35,06378565	10
Derecha	3,3	36	2,79	1,302880205	2,057179271	37,66123422	10

Tabla 3.4. Resultados del ensayo de bombeo (cont.)

3.3.3. Análisis de los resultados

A la vista de los resultados mostrados en la Tabla 3.4, se aprecia que existe un porcentaje de error entre el caudal dado por el fabricante de la bomba para el bombeo con líquido, y el obtenido en las pruebas bombeando aire. Este porcentaje de error oscila siempre entre el 30% y el 40%.

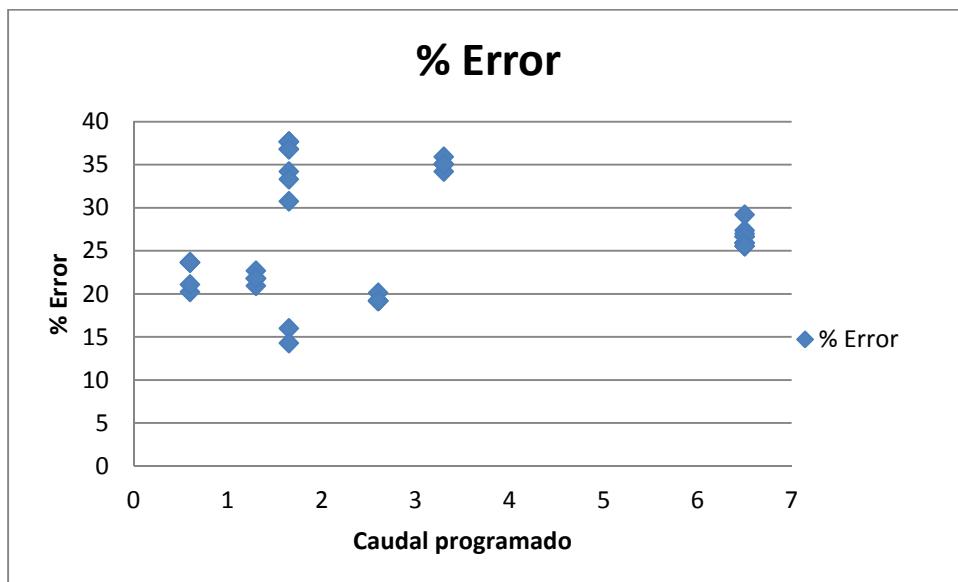
También se puede ver claramente que existe cierta diferencia entre el volumen de fluido bombeado en una dirección y en otra, siendo siempre superior el caudal bombeado en sentido horario. Este dato confirma los resultados obtenidos en la tabla 3.4 del apartado anterior. Por lo tanto, se asume que existe tendencia al desequilibrio del sistema.

Debido a esta diferencia entre los bombeos en sentido horario y anti-horario, se decidió evaluar el error obtenido en las mediciones de caudal separando los datos obtenidos según la dirección del flujo.

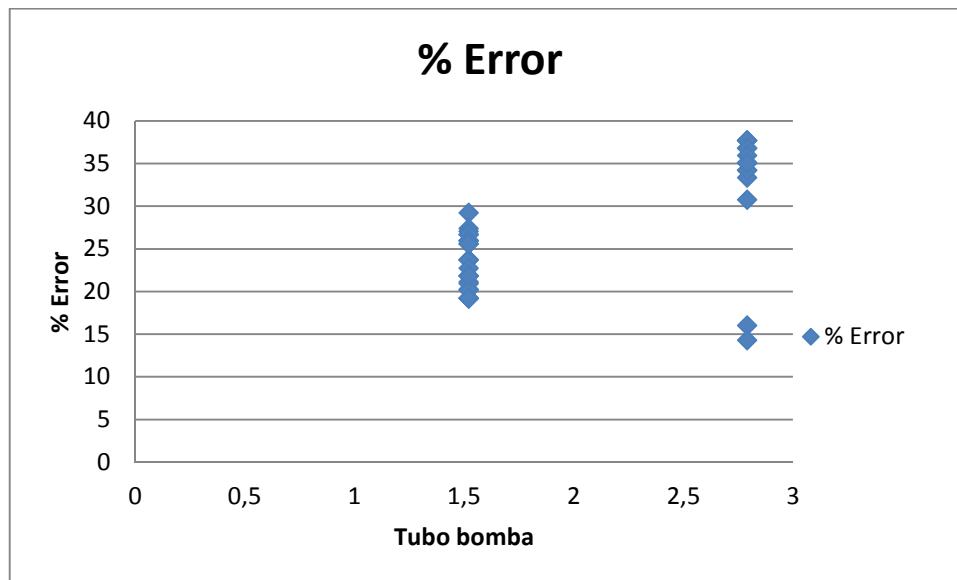
Los dos parámetros que pueden influir en mayor medida en la diferencia entre caudal teórico de la bomba, y el obtenido experimentalmente para bombeo de aire, son el diámetro del tubo de la bomba y el caudal programado.

Así pues, a partir de las tablas anteriores se realizan representaciones gráficas del valor de error calculado en función del sentido de bombeo, el valor de caudal programado en cada ensayo y el diámetro del tubo utilizado en la bomba.

Representaciones en sentido horario



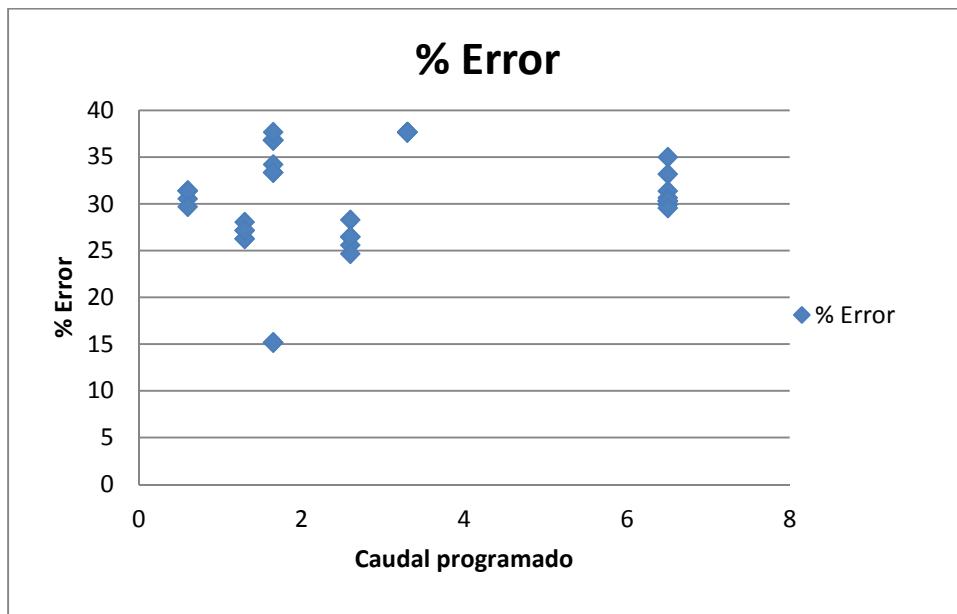
Gráfica 3.1. Porcentaje de error en función del caudal programado.



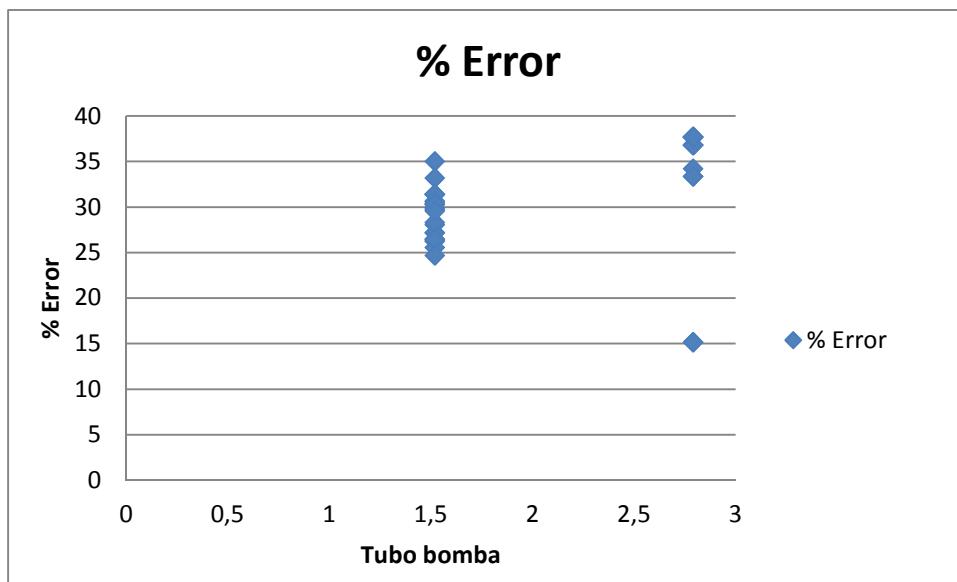
Gráfica 3.2. Porcentaje de error en función del diámetro del tubo

Tal y como se ve en las gráficas 3.1 y 3.2, los valores de error obtenidos en los ensayos, se encuentran más agrupados si los analizamos respecto al diámetro de tubo de la bomba que si lo hacemos respecto al valor de caudal programado, donde se muestran registros más dispersos e impredecibles.

En el caso de utilizar un tubo de 1,52 mm de diámetro, el error de caudal oscila entre un 20% y un 30% aproximadamente. Este porcentaje aumenta hasta valores en torno al 30% y 40% con el tubo más grande (2,79 mm de diámetro) aunque se observa como en algún ensayo se han obtenido caudales que sólo difieren en un 15% respecto al teórico. Esto se debe a que al ser un tubo más grande, influye en mayor medida la colocación del mismo en el cabezal de la bomba.

Representaciones en sentido anti-horario

Gráfica 3.3. % Error en función del caudal programado.



Gráfica 3.4. % Error en función del diámetro del tubo

Como ya sucedía en los resultados correspondientes al sentido horario, en las gráficas 3.3 y 3.4, los valores de error obtenidos en los ensayos se encuentran más agrupados si los analizamos respecto al diámetro de tubo de la bomba que si lo hacemos respecto al valor de caudal programado, donde se muestran registros más dispersos e impredecibles.

Para los ensayos en los que se utilizó un tubo de 1,52 mm de diámetro, el error de caudal oscila entre un 25% y un 35% aproximadamente. Este porcentaje aumenta hasta valores en torno al 35% cuando el tubo utilizado es el de 2.79 mm de diámetro.

3.3.4. Conclusiones

A pesar del reajuste que se realizó tras los ensayos anteriores (apartado 3.2), siguen apareciendo desequilibrios en el sistema. Estos desequilibrios, producidos por pequeñas diferencias de flujo entre un sentido y otro de bombeo, no afectan al proceso de sembrado, pero pueden acumularse y hacer que en algún momento sólo pase aire a través del scaffold en lugar del medio de sembrado.

Para solucionar esto se introdujo una nueva herramienta (Figura 3.10) en la pantalla de control táctil del biorreactor, de forma que el usuario pueda corregir en el acto el desequilibrio que observe que se está produciendo en su proceso de bombeo. De esta forma, si el usuario observa que se produce desequilibrio en cualquiera de los dos sentidos de bombeo, indica la dirección en la que se está produciendo y el porcentaje de volumen de fluido que se bombea de más en esa dirección y el sistema realiza el ajuste necesario para compensar ese desequilibrio.

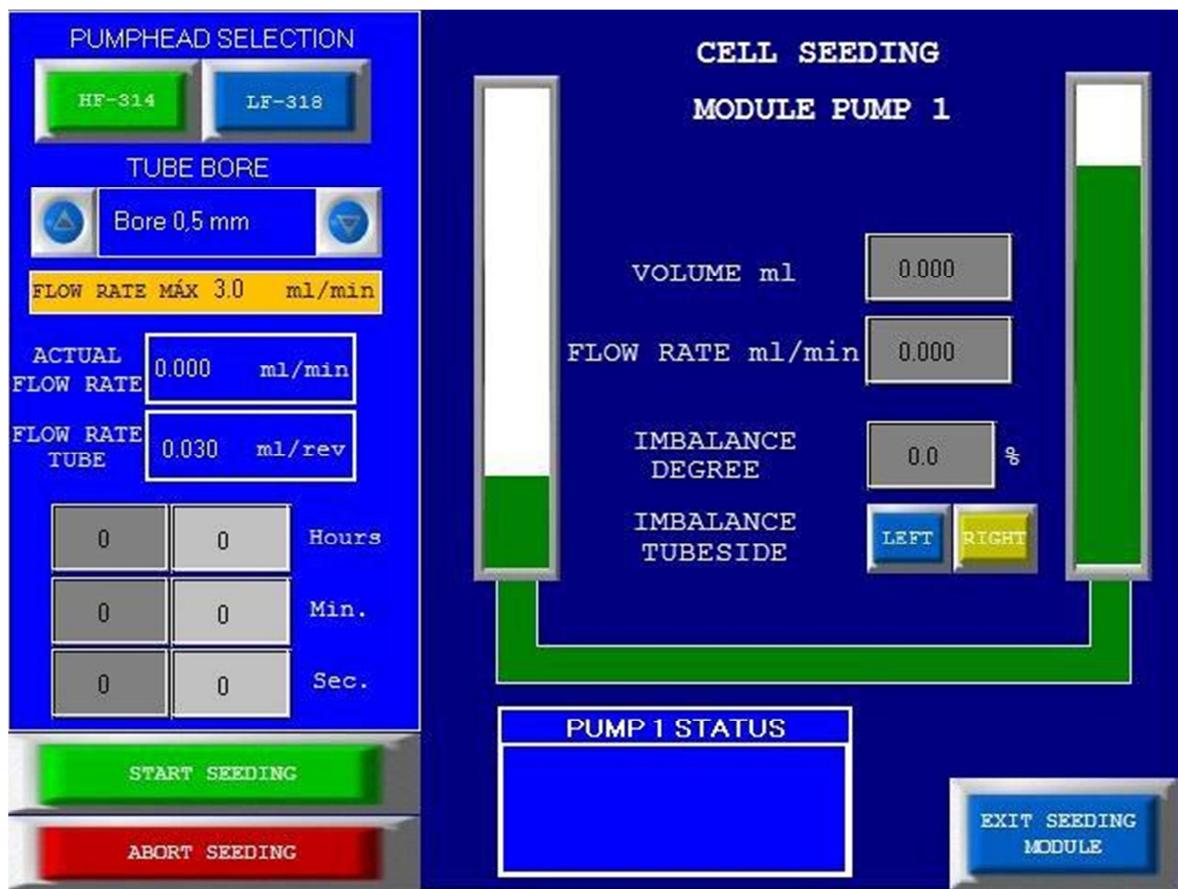


Figura 3.10. Herramienta de control del desequilibrio.

Capítulo 4:

SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE PASO DE FLUJO POR EL SCAFFOLD



CAPÍTULO 4. Simulación computacional de paso de flujo por el scaffold.

4.1. Introducción y objetivo.

En el presente capítulo, se presentan los resultados del análisis por elementos finitos del paso del fluido por el conjunto formado por la cámara de sembrado y el scaffold.

De esta forma, se podrán analizar los parámetros de flujo más adecuados para realizar el sembrado, de manera que las células se adhieran al scaffold con mayor facilidad.

Los grupos de tareas a realizar son los siguientes:

- Modelado 3D del scaffold mediante CT.
- Diseño CAD de la cámara de sembrado.
- Mallado del conjunto cámara-scaffold mediante ANSYS ICEM.
- Simulación mediante ANSYS CFX.
- Comparativas y análisis de resultados.

El proceso de sembrado se puede realizar con valores de caudal variables y la cámara de sembrado está preparada para que se pueda utilizar con scaffolds de diferentes tamaños (de 5 a 7mm de diámetro). Por lo tanto, será necesario realizar simulaciones distintas y que proporcionen resultados que permitan asumir todas las posibilidades de procesos de sembrado distintos que se pueden dar.

Se realizaron dos grupos de simulaciones:

I. Simulación con distintos valores de caudal.

Los caudales utilizados varían entre 0'1, 1 y 5 ml/min.

El objetivo de estas simulaciones es obtener los perfiles de las caídas de presión que se dan en las paredes del scaffold y en la entrada y salida de la cámara para todos los valores de caudal que se utilice en el proceso de sembrado de células.

II. Simulación con scaffolds de distinto diámetro.

El caudal utilizado para estas simulaciones es 1 ml/min.

Dado que la cámara de sembrado es apta para scaffolds de diámetro variable, se realizan simulaciones con dos tamaños de scaffold distinto. El objetivo de estas simulaciones es analizar si se producen diferencias entre el flujo que se

produce al utilizar un scaffold que ocupe por completo el diámetro de la cámara de sembrado y el producido con un scaffold de tamaño intermedio.

4.1.1. Introducción al TC



Figura 4.1. Sistema CT

En general, la tomografía axial computada (TAC) o también conocida como tomografía computada (TC o CT en inglés), es una técnica de diagnóstico utilizada en medicina.

La TC es una tecnología sanitaria de exploración de rayos X que produce imágenes detalladas de cortes axiales del cuerpo. En lugar de obtener una imagen como la radiografía convencional, la TC obtiene múltiples imágenes al rotar alrededor del cuerpo. Una computadora combina todas estas imágenes en una imagen final que representa un corte del cuerpo como si fuera una rodaja. Esta máquina crea múltiples imágenes en rodajas (cortes) de la parte del cuerpo que está siendo estudiada.

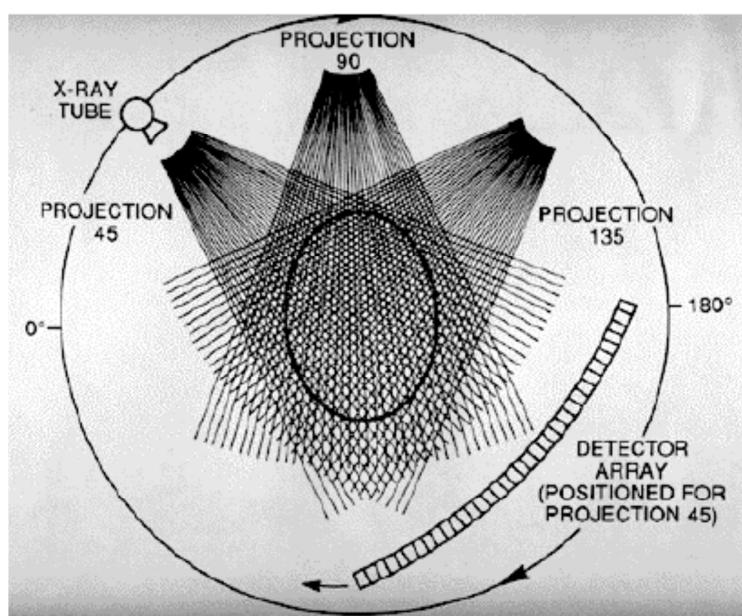


Figura 4.2. Esquema de funcionamiento de un escáner de tercera generación.

4.1.2. Historia de la TC

Podría decirse que desde el descubrimiento de los rayos X por Roentgen, la TC ha sido la más valiosa contribución al campo del diagnóstico por imagen.

En los fundamentos de esta técnica trabajaron de forma independiente el ingeniero electrónico y físico sudafricano nacionalizado norteamericano Allan McLeod Cormack y el ingeniero electrónico inglés Godfrey Newbold Hounsfield, que dirigía la sección médica del Laboratorio Central de Investigación de la compañía EMI. Ambos obtuvieron de forma compartida el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1979.

En 1967 Cormack publica sus trabajos sobre la TAC siendo el punto de partida de los trabajos de Hounsfield, que diseña su primera unidad. En 1972 comenzaron las experiencias clínicas, publicando los primeros resultados clínicos, sorprendiendo a la comunidad médica, si bien la primera imagen craneal se obtuvo un año antes.

Los primeros cinco aparatos se instalaron en Reino Unido y Estados Unidos; la primera TC de un cuerpo entero se consiguió en 1974.

En el discurso de presentación del comité del Premio Nobel se destacó que previo al escáner, “las radiografías de la cabeza mostraban sólo los huesos del cráneo, pero el cerebro permanecía como un área gris, cubierto por la neblina. Súbitamente la neblina se ha disipado”.

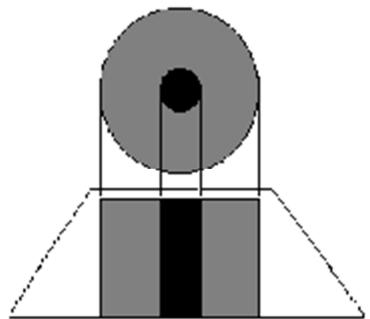
En recuerdo y como homenaje a Hounsfield, las unidades que definen las distintas densidades de los tejidos estudiadas en TC se denominan unidades Hounsfield.

4.1.3. Principio de funcionamiento

El aparato de TAC emite un haz muy fino de rayos X. Este haz incide sobre el objeto que se estudia y parte de la radiación del haz lo atraviesa. La radiación que no ha sido absorbida por el objeto, en forma de espectro, es recogida por los detectores. Luego el emisor del haz, que tenía una orientación determinada (por ejemplo, estrictamente vertical a 90º) cambia su orientación (por ejemplo, haz oblicuo a 95º). Este espectro también es recogido por los detectores. El ordenador 'suma' las imágenes, promediándolas.

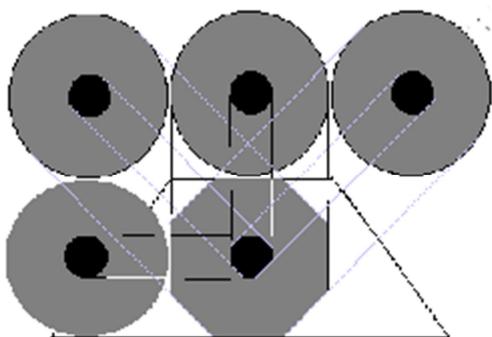
Nuevamente, el emisor cambia su orientación. Los detectores recogen este nuevo espectro, lo 'suman' a los anteriores y 'promedian' los datos. Esto se repite hasta que el tubo de rayos y los detectores han dado una vuelta completa, momento en el que se dispone de una imagen tomográfica definitiva y fiable.

A continuación se muestra un esquema que explica lo que hace el ordenador con los espectros de rayos que recibe.



La figura 4.3 representa el resultado en imagen de una sola incidencia o proyección (vertical, a 90°). Se trata de una representación esquemática de un miembro, por ejemplo un muslo. El color negro representa una densidad elevada, la del hueso. El color gris representa una densidad media, los tejidos blandos (músculos). El hueso, aquí, deja una zona de 'sombra'. Los músculos, una zona de 'penumbra'.

Figura 4.3. Una sola proyección.



En la figura 4.4 el ordenador dispone de datos de cuatro incidencias: 45°, 90°, 135° y 180°. Los perfiles de la imagen son octogonales, lo que la aproxima mucho más a los contornos circulares del objeto real.

La precisión de la representación aumenta conforme se aumenta el número de proyecciones utilizadas.

Figura 4.4. Cuatro proyecciones.

Una vez que ha sido reconstruido el primer corte, la mesa donde el objeto reposa avanza (o retrocede) una unidad de medida y el ciclo vuelve a empezar. Así se obtiene un segundo corte (es decir, una segunda imagen tomográfica) que corresponde a un plano situado a una unidad de medida del corte anterior.

A partir de todas esas imágenes transversales (axiales) un computador reconstruye una imagen bidimensional que permite ver secciones de la pierna (o el objeto de estudio) desde cualquier ángulo. Los equipos modernos permiten incluso hacer reconstrucciones tridimensionales. Estas reconstrucciones son muy útiles en determinadas circunstancias, pero no se emplean en todos los estudios, como podría parecer. Esto es así debido a que el manejo de imágenes tridimensionales no deja de tener sus inconvenientes.

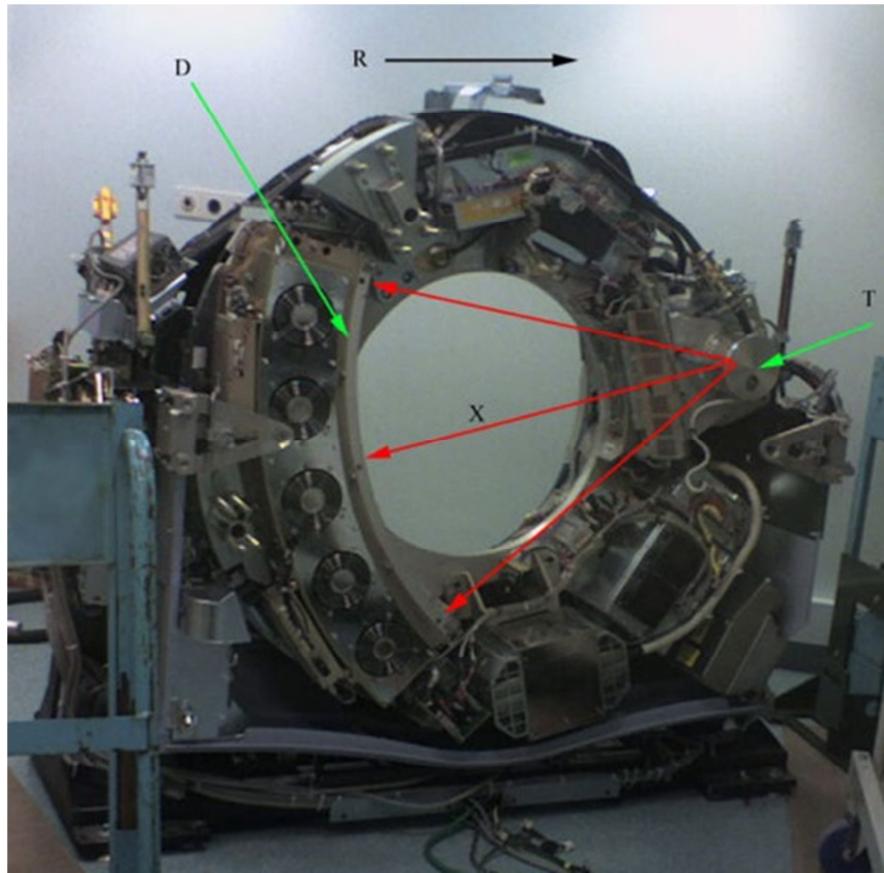


Figura 4.5. Interior de un tomógrafo axial computerizado.

En la figura 4.5. se puede ver el anillo giratorio de un TAC donde se aprecia el tubo emisor de rayos X (denominado con T en la imagen) y el detector encargado de recibir las proyecciones de esos rayos (D en la imagen).

4.1.4. Aplicaciones de la TC

Como se ha explicado anteriormente, el TAC se utiliza principalmente en medicina ya que es permite realizar un diagnóstico por imagen no invasivo, lo que le proporciona gran utilidad para la exploración prácticamente de todo el cuerpo, aunque se utiliza principalmente en áreas como el tórax, abdomen, sistema cardiovascular, muscular y óseo.

En el caso que nos ocupa, el TAC nos permite la obtención de un modelado tridimensional muy preciso del scaffold que utilizaremos para realizar el sembrado celular.

4.2. Modelado por elementos finitos.

4.2.1. Geometría

A partir del TC, se obtuvo el modelado en 3D de un scaffold cilíndrico (figura 4.6). Se utilizó un scaffold de fosfato de calcio cuyas características permiten el sembrado de células mediante perfusión directa.

Las dimensiones de este scaffold son las siguientes:

- Diámetro: $D = 6 \text{ mm}$
- Espesor: $e = 3 \text{ mm}$

El índice de porosidad del scaffold es $60 \pm 10 \text{ ppi}$ (poros por pulgada).

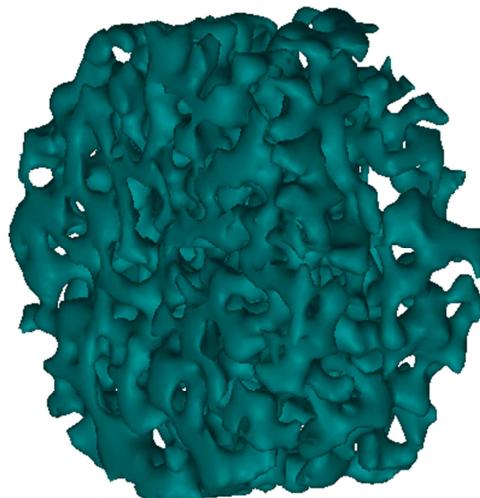


Figura 4.6. Geometría del scaffold

La cámara de sembrado se diseñó mediante un programa CAD en 3D y las dimensiones utilizadas en el modelo (figura 4.7) corresponden a las dimensiones interiores de la cámara de sembrado dinámico descrita en el apartado 3.2.

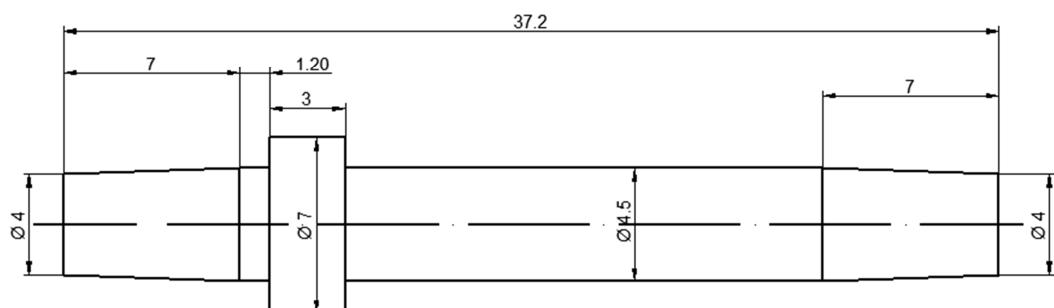


Figura 4.7. Geometría de la cámara de sembrado

4.2.2. Discretización

El volumen que se malla a continuación, corresponde al espacio que va a ocupar el fluido en movimiento al pasar a través de la cámara de sembrado, así que se utiliza una malla cuyos elementos son tetraedros ya que es el único tipo de elemento que nos permite realizar el correcto mallado de una geometría compleja como son los poros del scaffold.

Una vez obtenido el volumen del scaffold en formato stl a partir del TC, se importa la geometría al programa Ansys ICEM v.10.

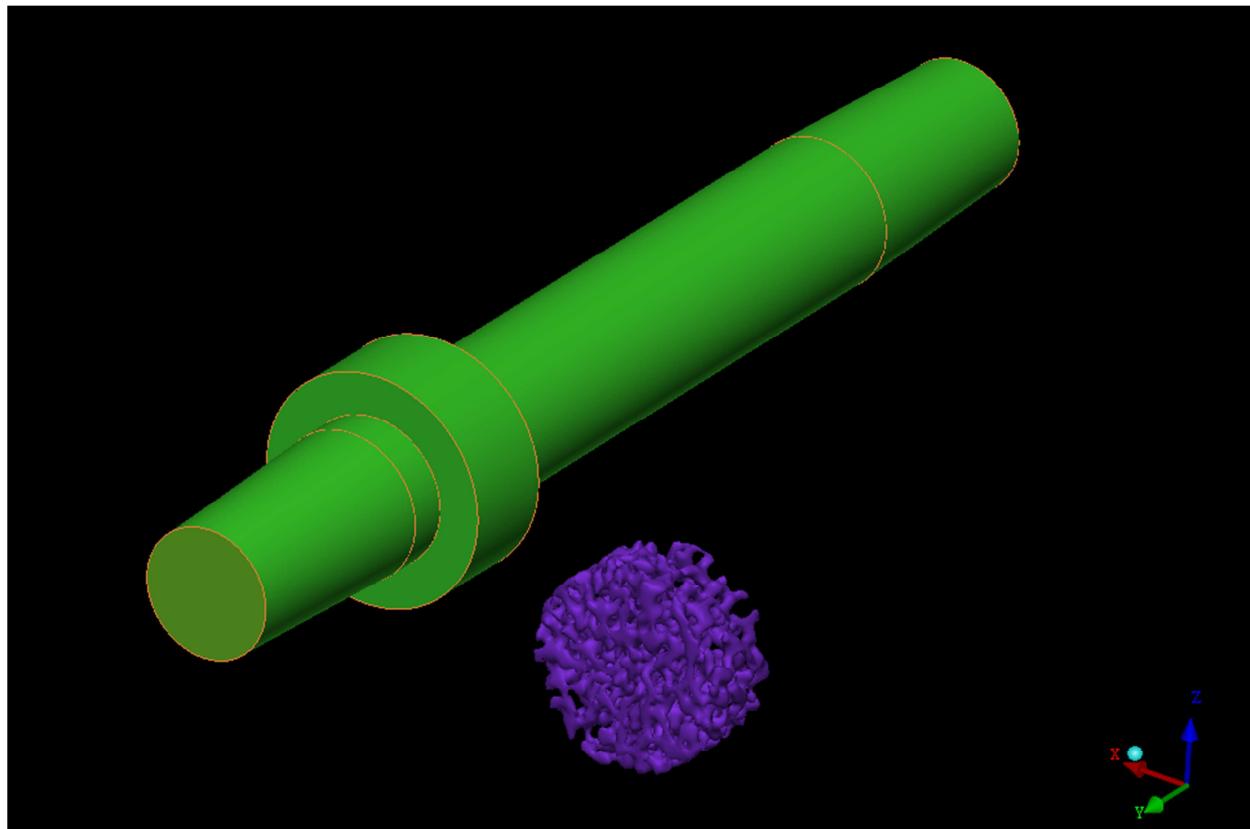


Figura 4.8. Geometría de la cámara de sembrado y scaffold

Con toda la geometría definida, se deben establecer familias de elementos para posteriormente poder establecer distintas condiciones de contorno en esos elementos como serán la condición de no deslizamiento en las paredes, o las velocidades de entrada y salida del flujo en los extremos.

Así, creamos las siguientes familias de elementos (Figura 4.7):

- Inlet: superficie de entrada a la cámara
- Outlet: superficie de salida de la cámara
- Wall: contorno correspondiente a toda la cámara de sembrado, la pared de ésta.
- Scaffold: pared del elemento scaffold.
- Body: punto establecido para definir el volumen de mallado.

El scaffold se debe situar correctamente alineado en el interior de la cámara, es importante que todo el volumen del scaffold esté situado en el interior de la cámara, ya que en caso contrario, se podrían producir errores al crear la malla.

Ansys ICEM ofrece la posibilidad de emplear diferentes tipologías de elementos para realizar el mallado del dominio. De este modo, es capaz de poder adaptar el mallado a cualquier contorno de los sólidos que limitan el dominio.

La característica principal que diferencia a los distintos elementos es el número de nodos con el que resuelven las ecuaciones dentro de su volumen de control. A mayor número de nodos por elemento, más precisa será su resolución interna, sin embargo también aumentan los requisitos computacionales de la malla. Los distintos tipos de elementos que se pueden utilizar varían desde los 8 hasta los 4 nodos: hexaedros, prismas, pirámides o tetraedros. A pesar de la mayor precisión que proporcionan los elementos con mayor número de nodos, debido a la compleja geometría del scaffold sólo se pueden utilizar elementos tetraédricos para la creación de malla.

A continuación, se realizaron varias mallas de distinto número de elementos para posteriormente llevar a cabo una comparativa los perfiles de velocidad obtenidos con las distintas mallas utilizadas. De este modo, se analizará la sensibilidad de la solución en función del tamaño de elemento de las mismas.

El objetivo de este estudio es, por tanto, obtener una malla cuya precisión de cálculo sea la adecuada para, posteriormente, realizar los cálculos restantes con ella.

Se realizan 3 mallas distintas especificando el tamaño de cada elemento según la posición que ocupe. Las características de las distintas mallas se pueden ver en la siguiente tabla.

	Nº Elementos	3 mm.	1,7 mm.	1 mm.
Tamaños de elemento	Inlet	0,3	0,5	0,5
	Outlet	0,3	0,5	0,5
	Curvas	0,2	0,5	0,5
	Pared	0,5	1	1
	Scaffold	0,05	0,1	0,3

Tabla 4.1. Tamaños de referencia de cada elemento según la familia a la que pertenecen.

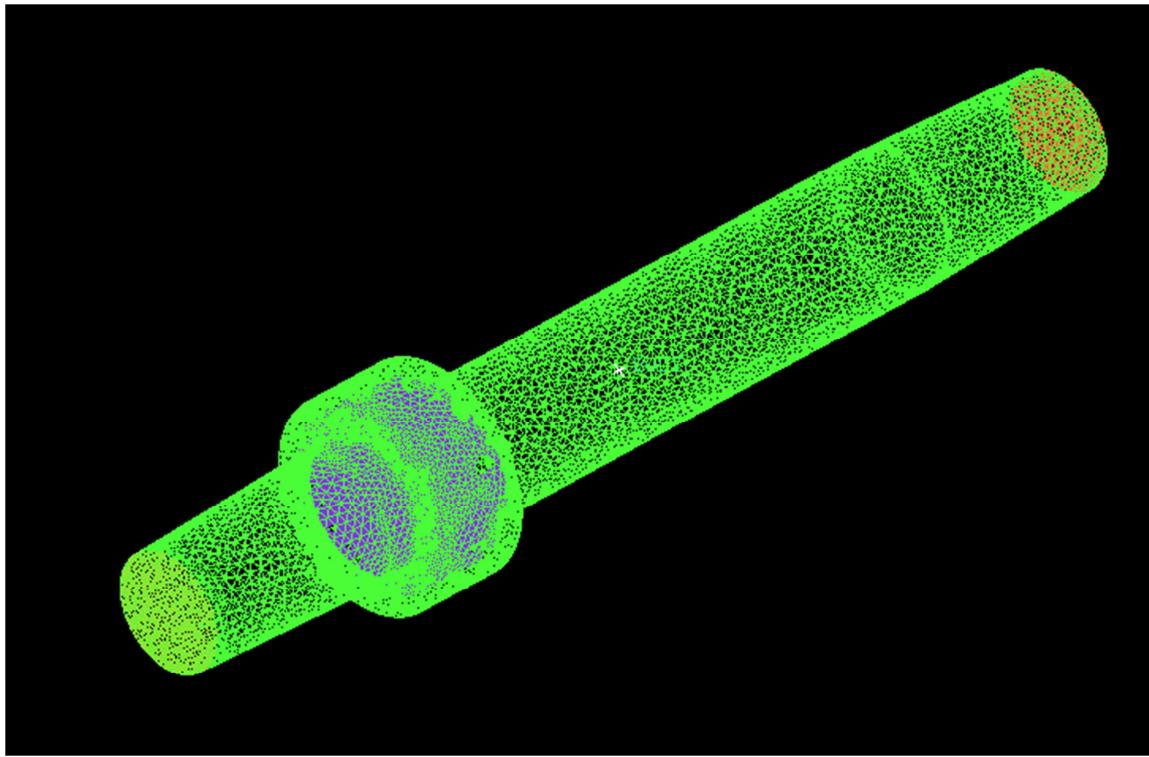


Figura 4.9. Malla del conjunto cámara – scaffold

4.2.3. Condiciones de contorno

Tras crear y refinar adecuadamente la malla en ICEM, se exporta en formato “Nastran” conservando los elementos de volumen y de áreas (prescindimos de elementos lineales).

Este fichero se importa en ANSYS CFX donde se establece el dominio donde se va a producir el flujo y éste se define como laminar y estacionario.

En primer lugar, es necesario definir el agua como fluido seleccionado para el dominio. El fluido que se utilizará en las simulaciones será agua, ya que sus propiedades se asemejan mucho a las del medio de cultivo.

A continuación, se definen las condiciones de contorno necesarias:

- **Condición de no deslizamiento**

Para garantizar que el flujo tenga velocidad nula en las paredes, se define la condición de “*no deslizamiento*” tanto en las paredes de la cámara de sembrado como en el scaffold.

- **Velocidad normal a la entrada y a la salida del dominio**

Se realizarán tres simulaciones con distintos valores de caudal pertenecientes al rango de caudales que se utilizarán para realizar el sembrado celular: 0'1, 1 y 5 ml/min

Teniendo en cuenta estos caudales y que el diámetro del tubo a la entrada y salida es 4 mm, las velocidades en esas zonas son las siguientes:

Caudal (ml/min)	Velocidad (mm/s)
0'1	0'132695
1	1'32695
5	6,63146

Tabla 4.2. Velocidad normal en entrada y salida ($A = 4\text{mm}$)

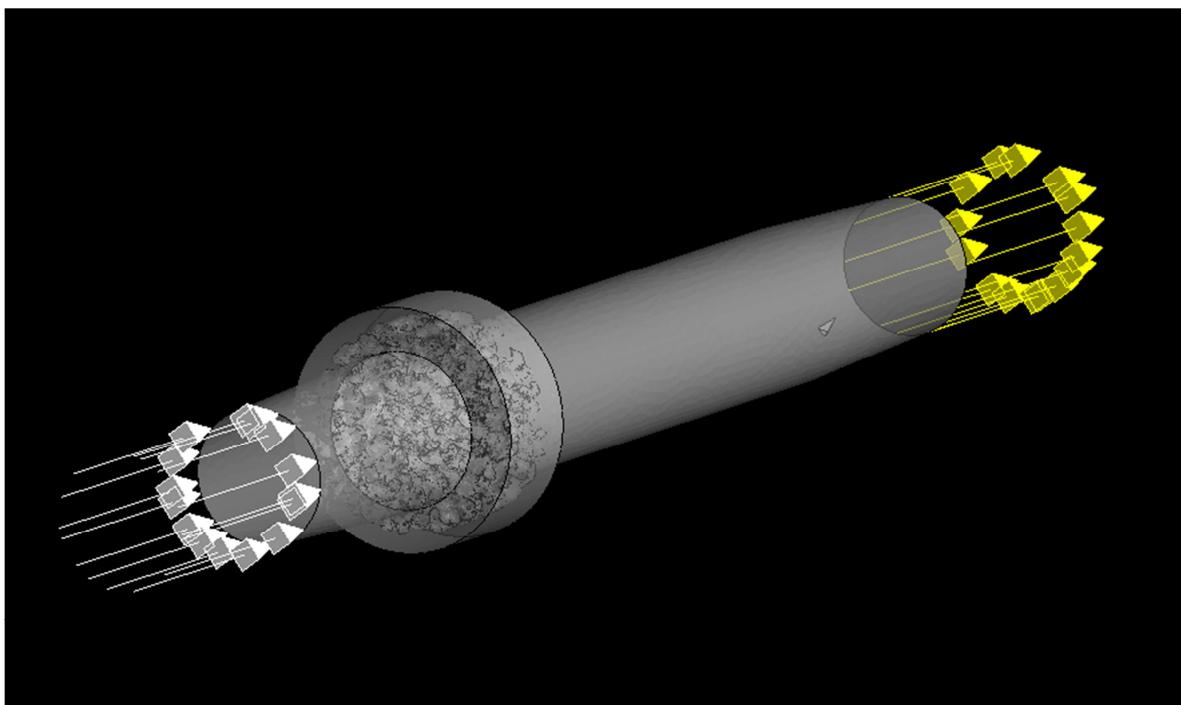


Figura 4.10. Condiciones de contorno de entrada y salida.

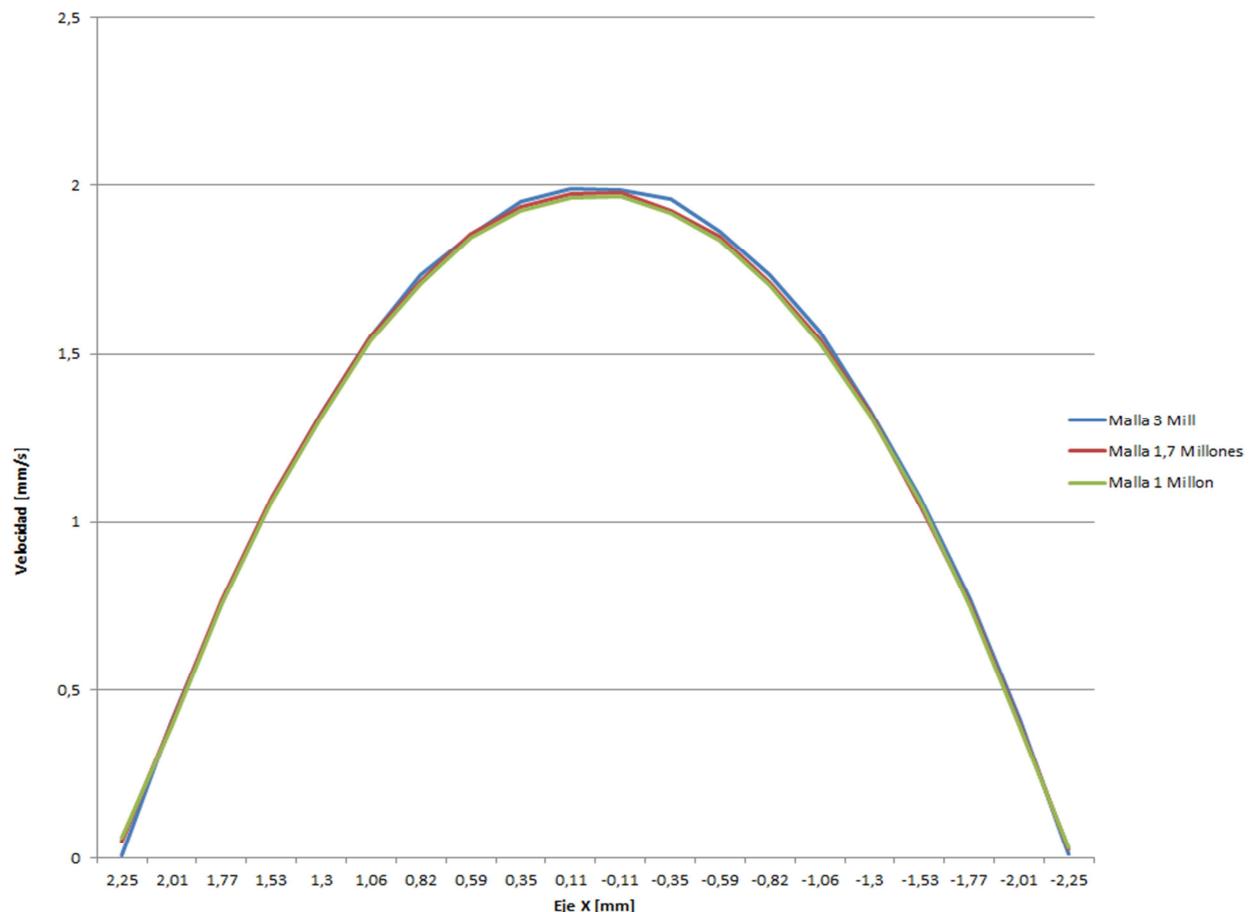
Con el dominio definido y las condiciones de contorno establecidas, se procede a realizar la simulación del flujo. Esta tarea, requerirá mayor o menor tiempo de procesado en función del tipo de malla realizada en el apartado anterior y de las tolerancias asignadas al proceso de cálculo.

4.4.4. Influencia de la discretización en los perfiles de velocidad

Tras realizar el mallado del volumen de fluido, se exportó el proyecto al programa ANSYS CFX para realizar la simulación del paso del flujo a través de la cámara y así obtener el perfil de velocidad del fluido tras hacerlo pasar a través del scaffold. Para realizar la simulación, se impuso un caudal de 1 mililitro por minuto y condición de no deslizamiento en las paredes del dominio.

La recta donde se analizaron los perfiles de velocidad de las distintas simulaciones, se situó a una distancia equivalente a dos veces el espesor del scaffold, esta distancia está considerada como suficiente para evitar las perturbaciones que puedan darse en el flujo a causa del paso por el scaffold.

En la siguiente gráfica, se muestran los perfiles de velocidad de las tres mallas distintas. Cada perfil se ha conformado con 20 puntos de muestreo a lo largo de los 4,5 mm de diámetro de la cámara.



Gráfica 4.1. Perfiles de velocidad

En esta gráfica se aprecia un problema en los resultados, y es que la velocidad en los extremos del tubo debería resultar nula ya que se trata de un flujo laminar.

Al crear el dominio donde se evalúa el flujo, se especificaron las condiciones de contorno como velocidad a la entrada del tubo y condición de no deslizamiento en las paredes (tanto en las paredes de los tubos como en las del scaffold). Sin embargo, con las mallas menos refinadas no se alcanza el valor de velocidad nula en la pared.

El motivo al que se asocia el defecto citado, es que el programa evalúa los valores de velocidad en el nodo de la malla más cercano a la pared, en lugar de hacerlo en la pared misma. Este efecto se ve acrecentado en las mallas con menor número de elementos y mayor tamaño de estos elementos en la zona de las paredes,

reduciéndose cuando se trata de mallas de más elementos y de tamaño más pequeño como se aprecia en malla de 3 millones.

En la figura 4.11 se muestra una representación gráfica de la velocidad medida en la sección utilizada para obtener los perfiles de velocidad mostrados anteriormente. Se puede apreciar como varía desde el valor de velocidad nula en la pared, hasta el valor máximo de velocidad de 2 mm/s aproximadamente que se dan en la zona central del plano de corte.

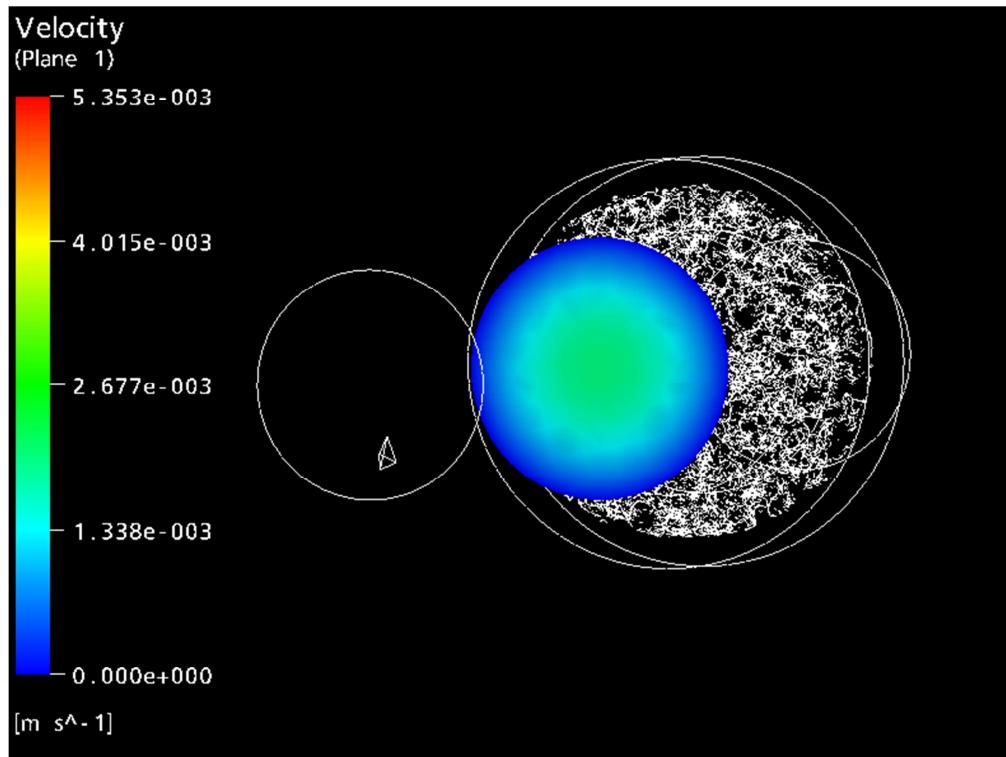


Figura 4.11. Representación gráfica de la velocidad en el plano de corte

En cuanto a la medida obtenida de la velocidad máxima en el centro del tubo, tenemos los siguientes resultados según las distintas mallas:

- Malla 3 millones de elementos: $V_{Max} = 1,99168 \text{ mm/s}$
- Malla 1,7 millones de elementos: $V_{Max} = 1,97462 \text{ mm/s}$
- Malla 1 millón de elementos: $V_{Max} = 1,96232 \text{ mm/s}$

En este aspecto, las mallas de 3 y 1,7 millones de elementos tienen valores muy cercanos entre sí, siendo ligeramente superior la velocidad máxima en la malla de 1,7 millones. La malla más pequeña es la que da un valor de velocidad inferior.

Estas diferencias, expresadas de forma porcentual, son mínimas, se tiene lo siguiente:

- La malla de 1.7 mill. da un valor de velocidad 0,85% inferior al de la malla de 3 millones.
- La malla de 1 mill. da un valor de velocidad 0,62% inferior al de la malla de 1,7 millones.

- La malla de 1 mill. da un valor de velocidad 1.47% inferior al de la malla de 3 millones.

Las variaciones de velocidades máximas dadas en las mallas de 1,7 millones y 1 millón de elementos, respecto a la dada en la malla de 3 millones de elementos, son próximas al 1%. En este punto de refinamiento de malla, se considera que reducir aún más el tamaño de elemento deja de tener influencia en los resultados numéricos que obtengamos. Por lo tanto, cualquiera de las tres mallas realizadas, se considera apta para realizar las simulaciones.

Sin embargo, en la gráfica 4.1 se puede observar cómo en la malla de 3 millones de elementos, el defecto de aproximación al valor 0 de velocidad en la pared de la cámara prácticamente no aparece (la velocidad obtenida en la pared con esta malla es 1×10^{-2} mm/s) mientras que en las mallas de menor número de elementos, ese efecto se aprecia ligeramente.

Por este motivo, y teniendo en cuenta que las diferencias en cuanto al tiempo de cálculo computacional requerido son escasas, se elige la malla de 3 millones de elementos como la idónea para realizar las simulaciones de flujo.

4.3. Estudio de la variación de presión en el scaffold y la cámara de sembrado.

A continuación, se van a analizar las variaciones de presión que se dan tanto en las superficies de entrada-salida de la cámara como en las paredes del scaffold.

Dado que la cámara de sembrado admite la posibilidad de utilizar scaffolds de tamaño variable desde 5 hasta 7 mm, para estas simulaciones utilizaremos un scaffold de tamaño intermedio, de 6 mm de diámetro.

El objetivo de estas simulaciones es determinar cómo varía la presión tanto en el scaffold como en la cámara de sembrado en función del caudal de flujo utilizado. El rango de caudales a analizar varía desde 0'1 ml/min hasta 5 ml/min, por lo que se toman tres medidas distintas para posteriormente realizar una interpolación y prever las caídas de presión para todas las medidas de caudal.

4.3.1. Caudal Q = 0'1 ml/min

En primer lugar se va a tomar una medida de caída de presiones con el valor de caudal mínimo al que se va a trabajar.

Variación de presión en el scaffold

Tras realizar la simulación, se representa gráficamente el perfil de presiones en las paredes del scaffold.

Como se puede ver en las figuras 4.12 y 4.13, las presiones mínimas y máximas se registran en la parte del scaffold correspondiente a la zona central ya que es por ahí por donde entra o sale el flujo a través del tubo, las paredes que están en contacto con la cámara de sembrado, registran unas presiones intermedias y considerablemente uniformes.

La presión máxima que se registra en la cara de entrada del flujo es: 2.907×10^{-2} Pa. Y la presión mínima registrada en la cara de salida del flujo es: -2.566×10^{-2} Pa.

Es decir, la caída de presión que se da en las paredes del scaffold es: 5.473×10^{-2} Pa.

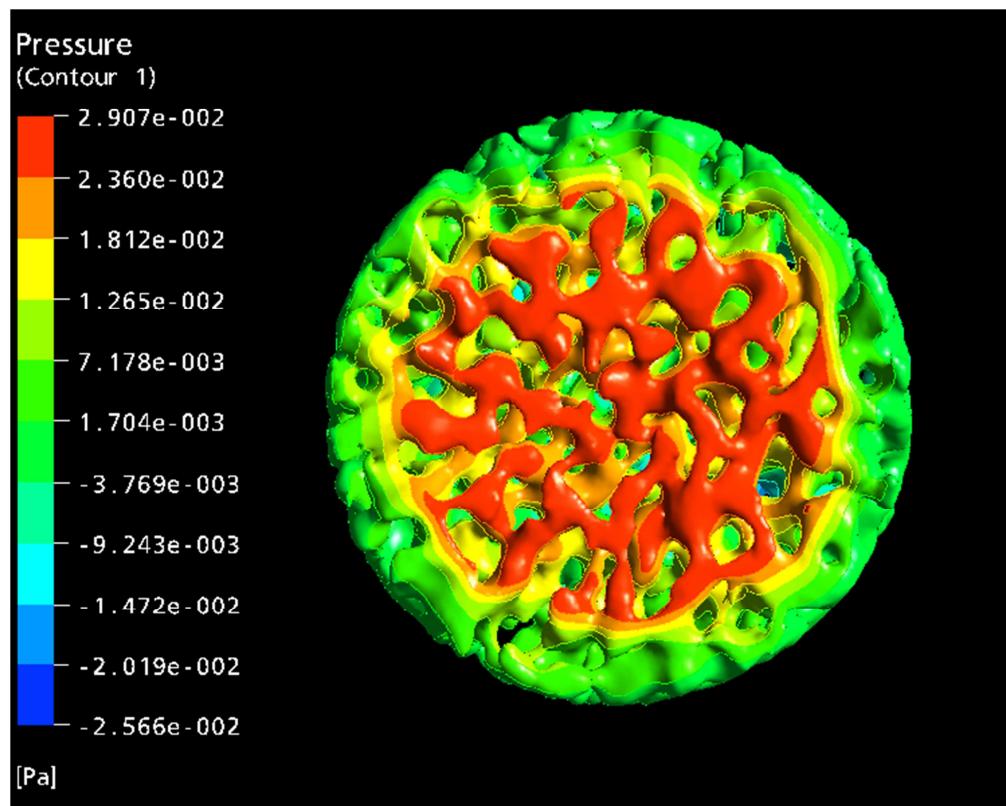


Figura 4.12. Representación gráfica de presiones a la entrada del scaffold para $Q = 0'1 \text{ ml/min}$

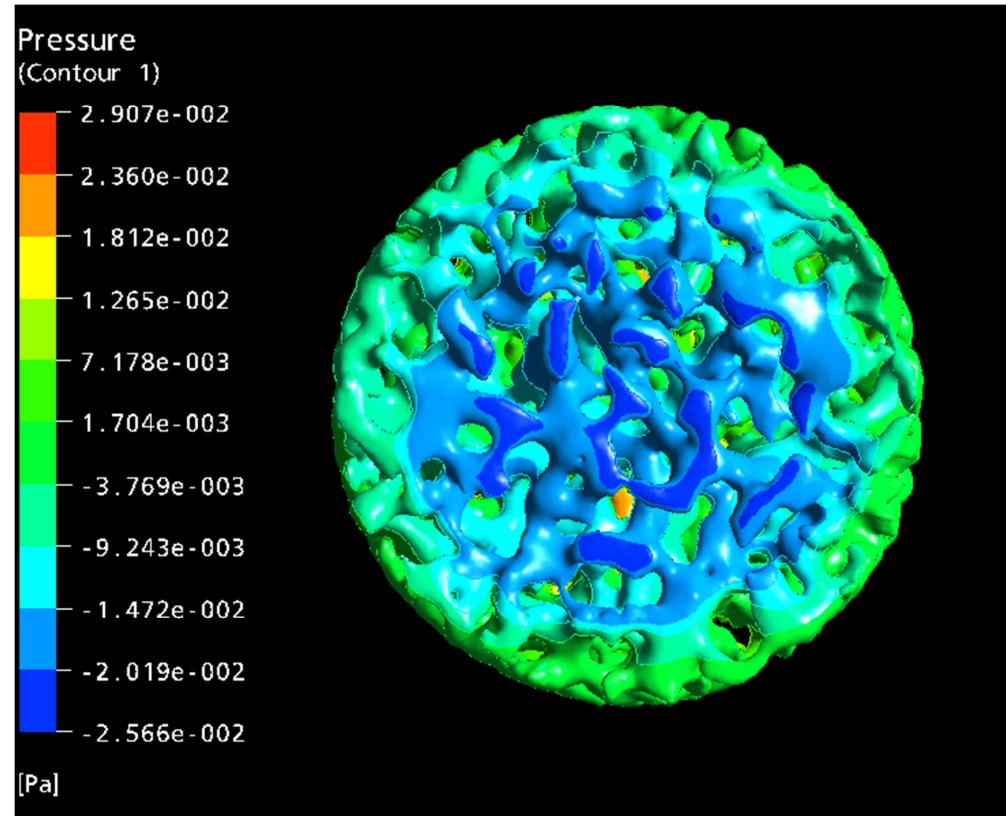


Figura 4.13. Representación gráfica de presiones a la salida del scaffold para $Q = 0'1 \text{ ml/min}$

Variación de presión en la entrada-salida de la cámara.

También se va a analizar la variación de presión que se da en la entrada y salida de la cámara, así que creamos una superficie INLET en la entrada y OUTLET en la salida, para representar gráficamente la medida de presión en esas zonas.

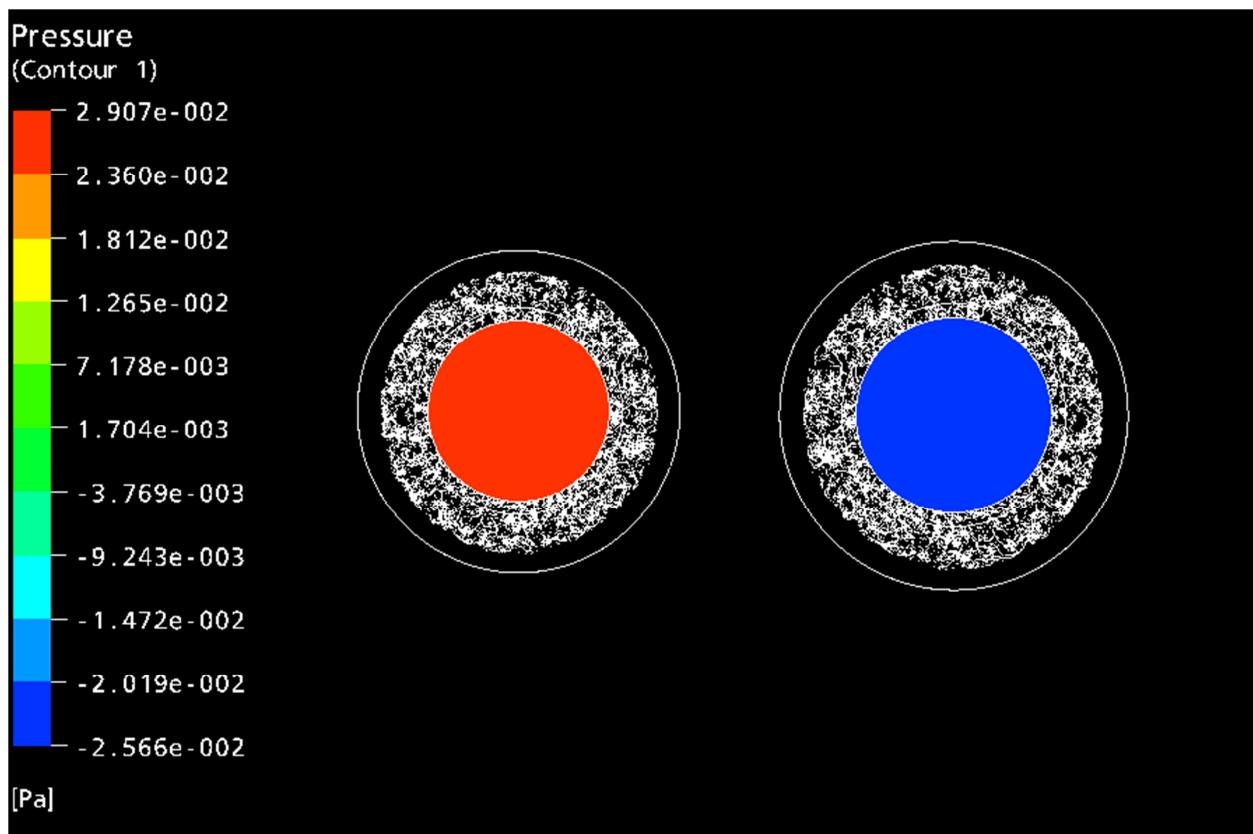


Figura 4.14. Representación gráfica de presiones a la entrada y salida de la cámara de sembrado

Los valores de presión en estas superficies varían muy ligeramente, tanto que esa variación no queda representada con la escala de presiones dada (Figura 4.14)

Por lo tanto, se creó una línea coincidente con el diámetro para tomar distintos valores de presión en los puntos que conforman dicha línea, de esta manera obtenemos el valor máximo de presión a la entrada de la cámara.

La presión máxima a la entrada de la cámara de sembrado es 2.66×10^{-2} Pa mientras que la presión a la salida de la cámara de sembrado: -2.32×10^{-2} Pa.

Por lo que la caída de presión entre la entrada y salida de la cámara de: 4.98×10^{-2} Pa.

4.3.2. Caudal Q = 1 ml/min

Este caudal corresponde a un valor intermedio dentro del rango de trabajo.

Variación de presión en el scaffold

En primer lugar, se representan gráficamente los valores de caudal que se dan en todas las paredes del scaffold.

Como era de esperar, las presiones en las paredes del scaffold han aumentado considerablemente respecto a las que aparecían en el caso anterior, debido a que el valor de caudal utilizado en esta ocasión es 10 veces superior. Vuelven a registrarse las mayores presiones en la parte central del scaffold, coincidiendo con la parte de la cámara por donde viene el flujo.

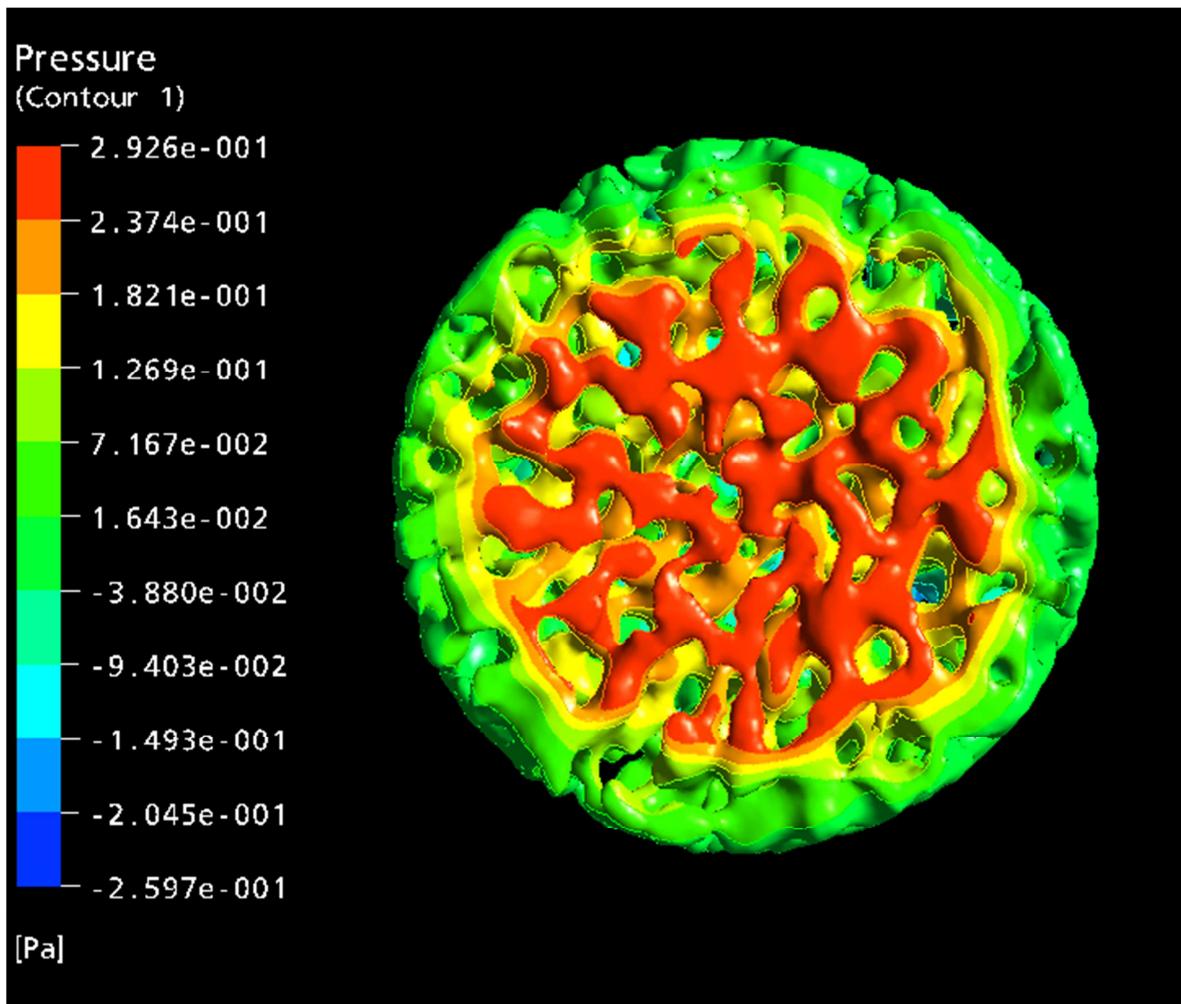


Figura 4.15. Representación gráfica de presiones a la entrada del scaffold para Q = 1 ml/min

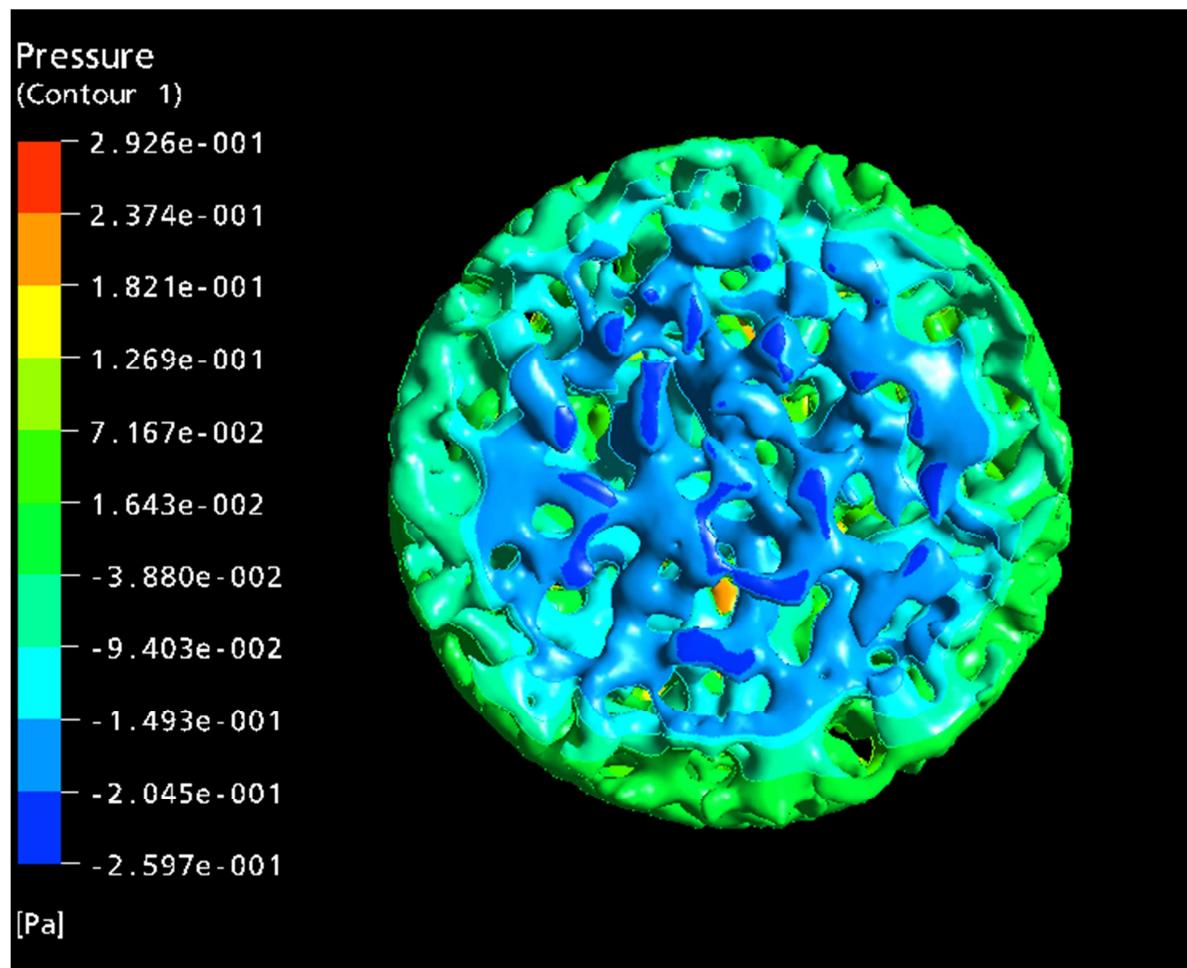


Figura 4.16. Representación gráfica de presiones a la salida del scaffold para $Q = 1 \text{ ml/min}$

La presión máxima que se registra en la cara de entrada del flujo es $2.926 \times 10^{-1} \text{ Pa}$ y la presión mínima es $-2.597 \times 10^{-1} \text{ Pa}$. Por lo tanto, la caída de presión que se da en las paredes del scaffold es $5.523 \times 10^{-1} \text{ Pa}$.

Variación de presión en la entrada-salida de la cámara

La representación gráfica de la presión en las superficies de entrada y salida de la cámara de sembrado se muestra en la figura 4.17, donde se observa que aparecen valores de presión constante en toda la superficie. Para obtener el valor exacto, es necesario crear un punto cualquiera contenido en la superficie y evaluar el valor de presión en dicho punto.

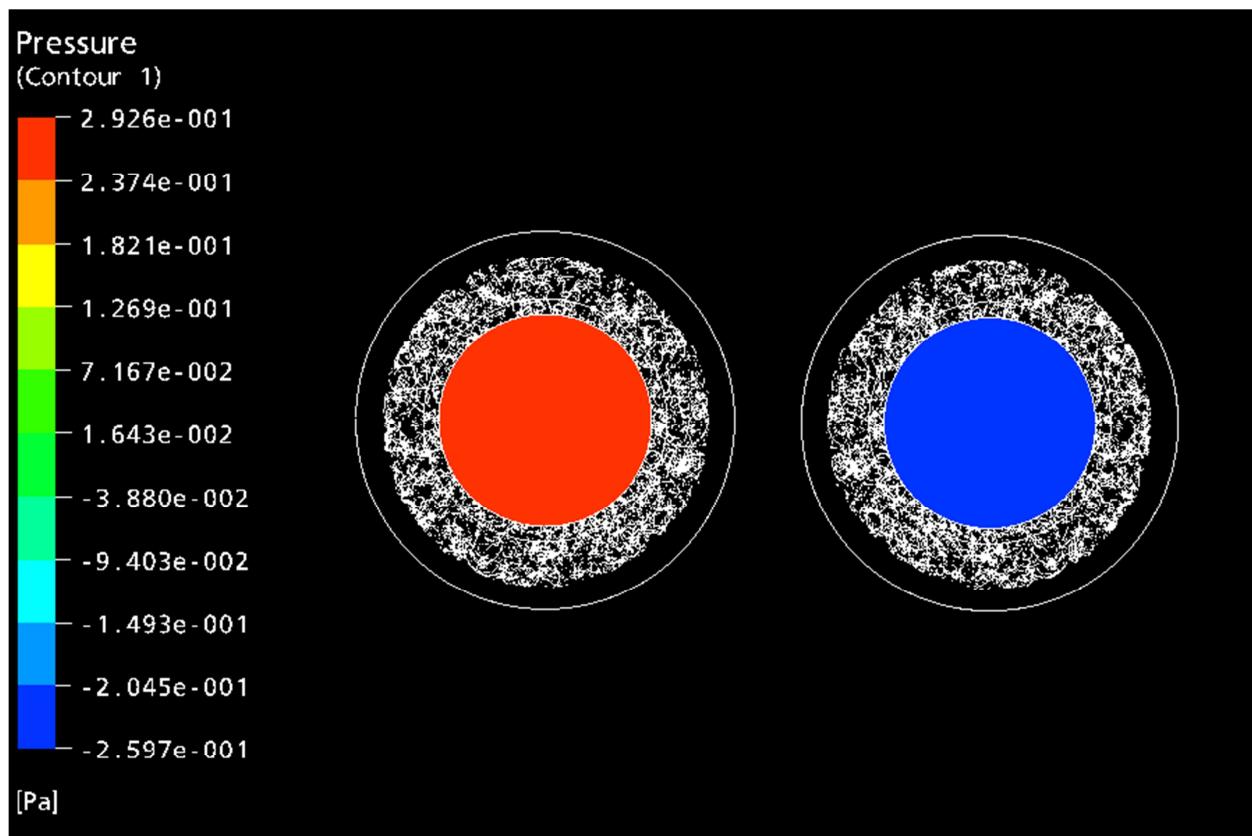


Figura 4.17. Representación gráfica de presiones a la entrada y salida de la cámara de sembrado

Utilizando dicho método se obtiene un valor de presión a la entrada de la cámara de sembrado 2.68×10^{-1} Pa, mientras que la presión a la salida de la cámara de sembrado es de -2.33×10^{-1} Pa. Por consiguiente, el valor de caída de presión entre la entrada y la salida de la cámara es de 5.01×10^{-1} Pa.

Se puede apreciar que las presiones obtenidas en esta simulación siguen una tendencia lineal respecto a las obtenidas con el caudal 10 veces inferior utilizado anteriormente.

4.3.3. Caudal Q = 5 ml / min.

Por último, para finalizar el análisis realizamos una simulación con el valor de caudal más alto de los que se van a utilizar para realizar el sembrado de células.

Variación de presión en el scaffold

En las figuras 4.18 y 4.19, se muestran gráficamente los valores de presión en todas las paredes del scaffold.

Una vez más, las presiones más altas aparecen distribuidas con idéntica forma que en los casos anteriores.

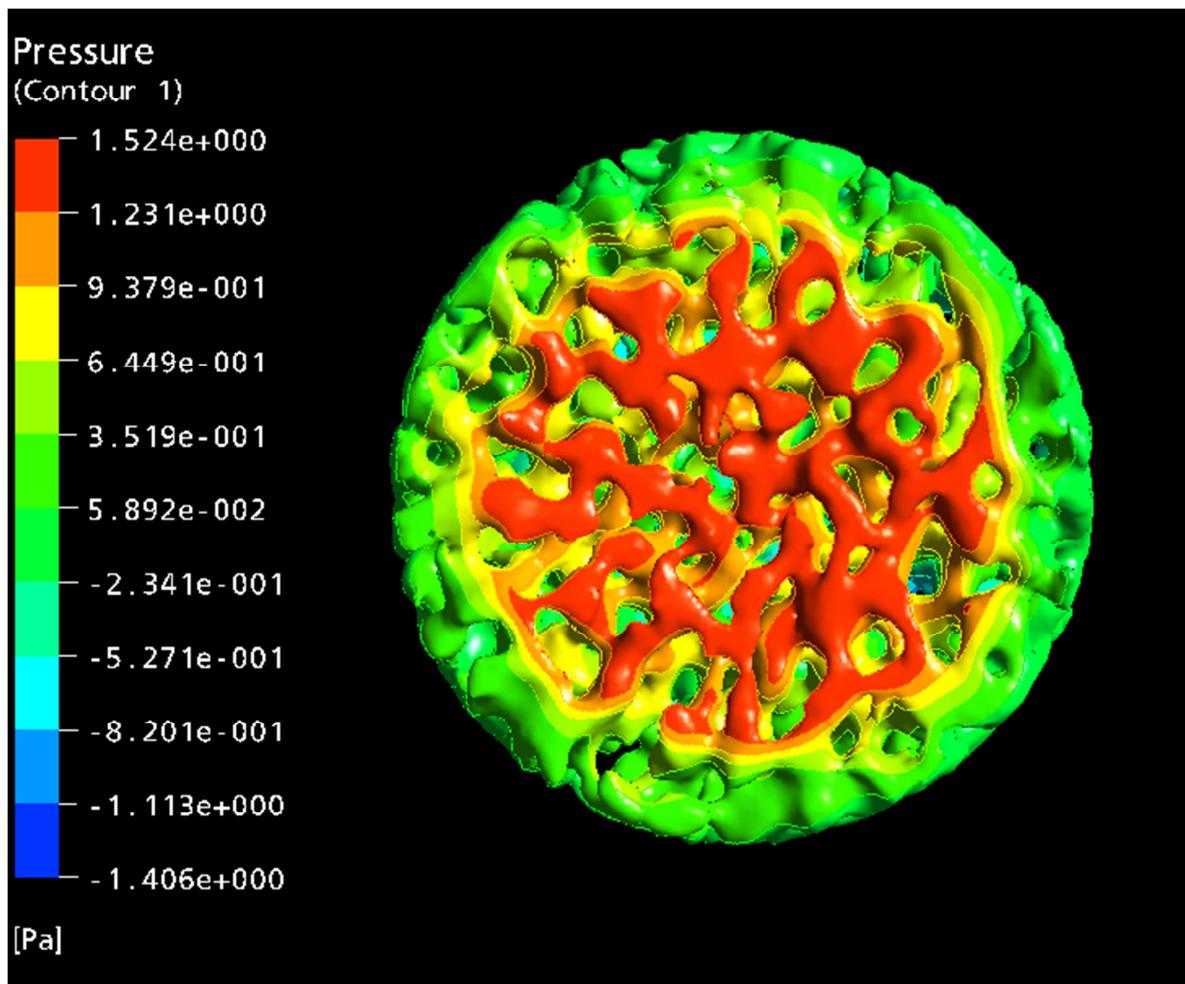


Figura 4.18. Representación gráfica de presiones a la entrada del scaffold para $Q = 5 \text{ ml/min}$

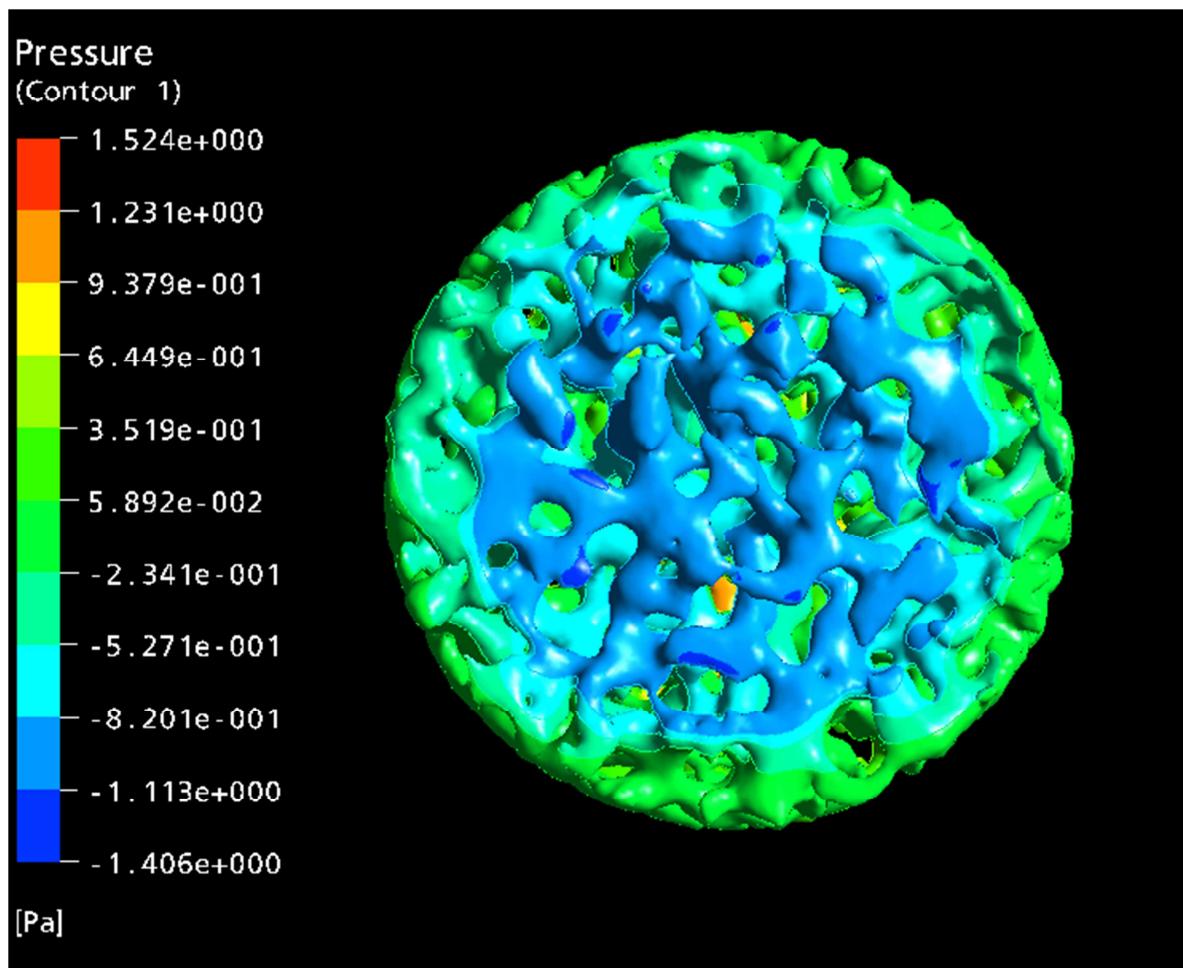


Figura 4.19. Representación gráfica de presiones a la salida del scaffold para Q = 5 ml/min

La presión máxima que se registra en la cara de entrada del flujo es 1.524 Pa mientras que la mínima en la cara de salida del flujo, es -1.406 Pa.

Es decir, la caída de presión que se da en las paredes del scaffold es: 2.93 Pa.

Variación de presión en la entrada-salida de la cámara

De nuevo, se realiza una representación gráfica de las presiones en la entrada y salida a la cámara de sembrado (Figura 4.20).

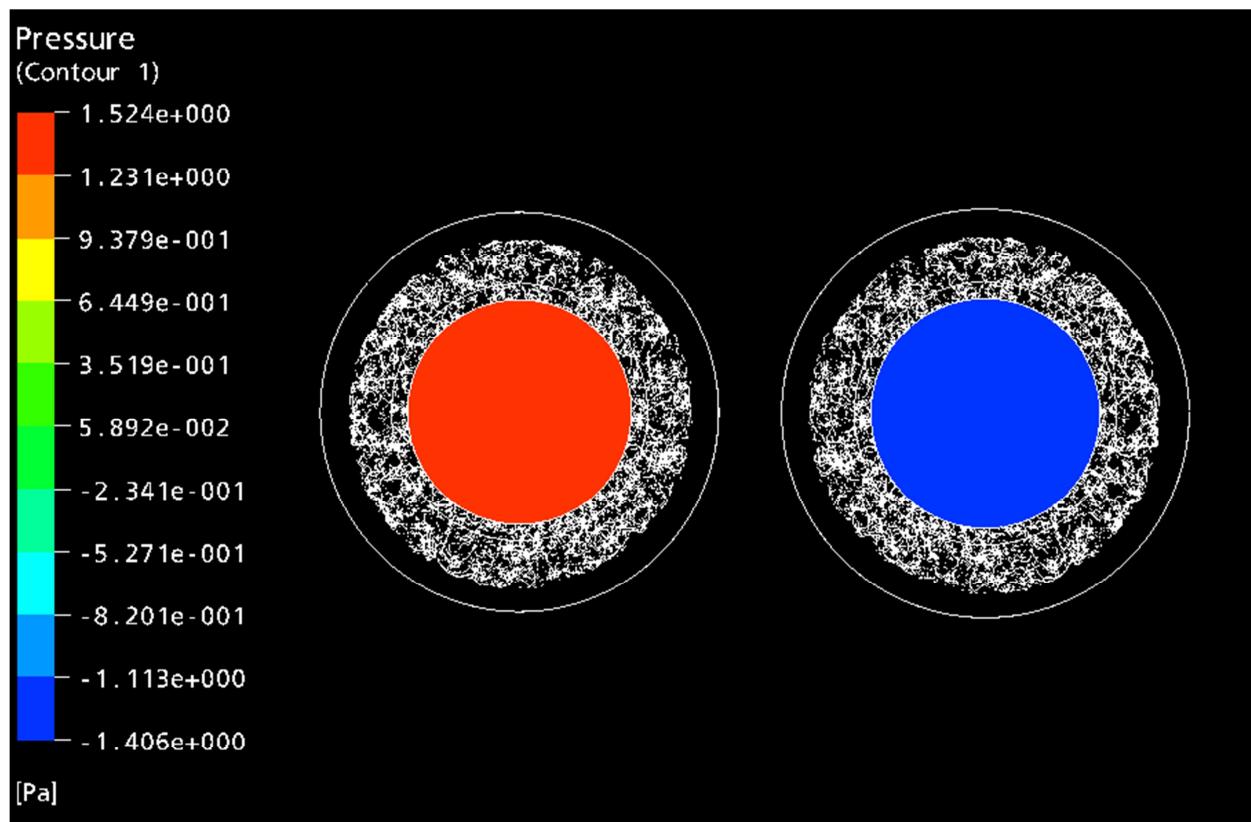


Figura 4.20. Representación gráfica de presiones a la entrada y salida de la cámara de sembrado

Se observa que la presión a la entrada de la cámara de sembrado es 1.39 Pa y la presión a la salida de la cámara de sembrado es -1.225 Pa. Por lo tanto, la caída de presión obtenida entre la entrada y la salida 2.615 Pa.

Como en los casos anteriores, se aprecia claramente que las presiones obtenidas aumentan linealmente con respecto al aumento de velocidad de flujo. De esta manera, y a partir de las tres simulaciones realizadas a distintos valores de caudal, podremos parametrizar las caídas de presión que se darán para todos los distintos valores de caudal que puedan ser utilizados en el proceso de sembrado de células sobre el scaffold.

4.3.4. Resultados. Valores de caídas de presión.

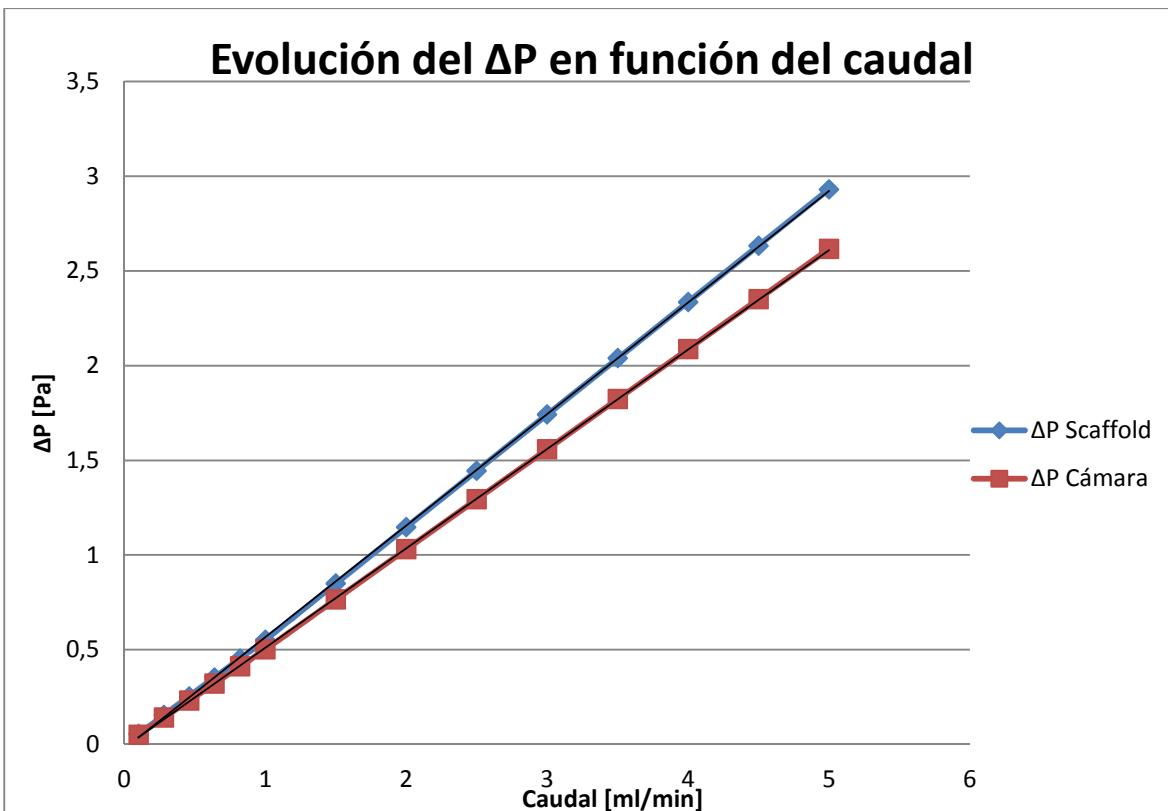
Como se ha visto en el apartado anterior, las caídas de presión varían de forma lineal con la velocidad del flujo.

En la siguiente tabla se realiza una interpolación lineal a partir de los valores obtenidos mediante las simulaciones realizadas para determinar el valor de caída de presión para distintos valores de caudal. Las filas sombreadas en gris representan los datos de partida obtenidos mediante la simulación por CFX mientras que el resto de datos se han obtenido mediante interpolación.

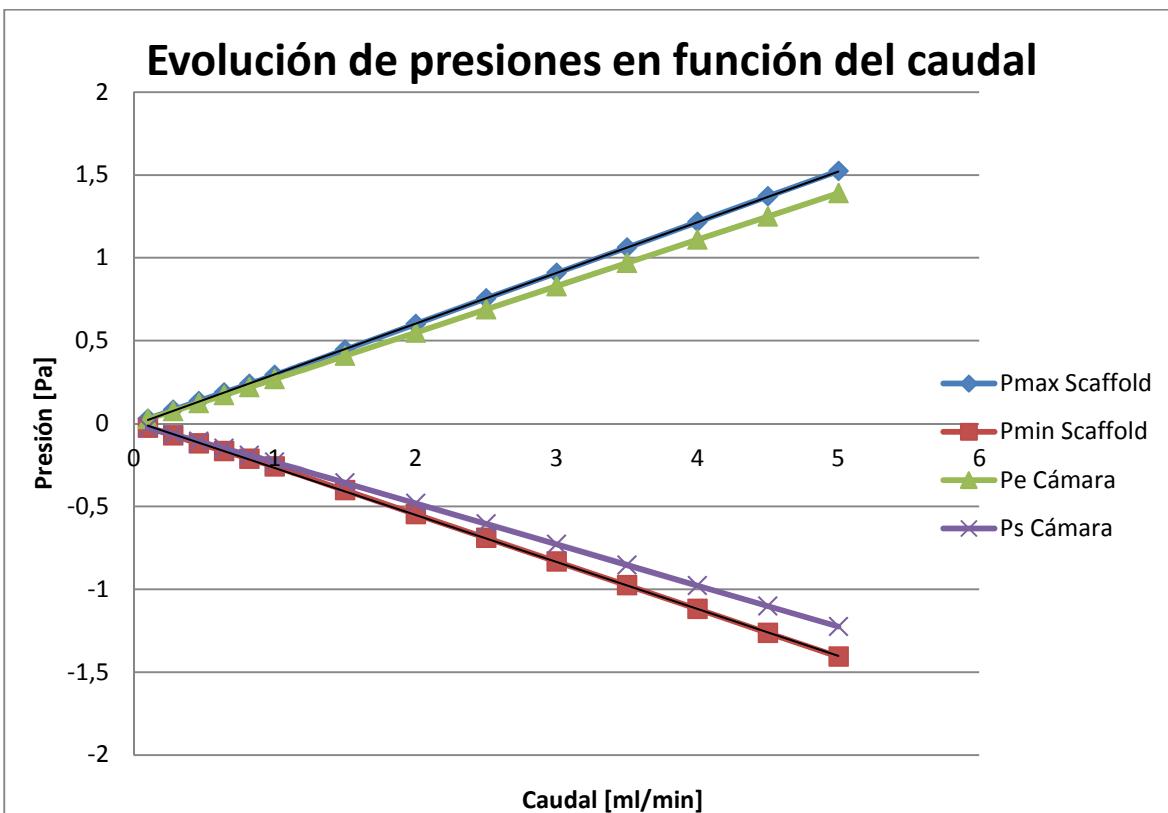
Q [ml/min]	SCAFFOLD			CÁMARA SEMBRADO		
	P entrada [Pa]	P salida [Pa]	ΔP [Pa]	P entrada [Pa]	P salida [Pa]	ΔP [Pa]
0,1	0,02907	-0,02566	0,05473	0,0266	-0,0232	0,0498
0,28	0,08177598	-0,07246792	0,1542439	0,07532436	-0,0653818	0,14070616
0,46	0,13448196	-0,11927584	0,2537578	0,12360432	-0,1073416	0,23094592
0,64	0,18718794	-0,16608376	0,3532717	0,17188428	-0,1493014	0,32118568
0,82	0,23989392	-0,21289168	0,4527856	0,22016424	-0,1912612	0,41142544
1	0,2926	-0,2597	0,5523	0,268	-0,233	0,501
1,5	0,446525	-0,4029875	0,8495125	0,40825	-0,357	0,76525
2	0,60045	-0,546275	1,146725	0,5485	-0,481	1,0295
2,5	0,754375	-0,6895625	1,4439375	0,68875	-0,605	1,29375
3	0,9083	-0,83285	1,74115	0,829	-0,729	1,558
3,5	1,062225	-0,9761375	2,0383625	0,96925	-0,853	1,82225
4	1,21615	-1,119425	2,335575	1,1095	-0,977	2,0865
4,5	1,370075	-1,2627125	2,6327875	1,24975	-1,101	2,35075
5	1,524	-1,406	2,93	1,39	-1,225	2,615

Tabla 4.3. Presiones obtenidas en función del caudal.

A continuación, se representan gráficamente los datos de la tabla 4.3 en dos gráficas distintas. La gráfica 4.2 muestra la variación de presión (ΔP) que se da en la cámara y scaffold mientras que la gráfica 4.3 representa la presión máxima y mínima que se da tanto en el scaffold como en la entrada y salida de la cámara de sembrado.



Gráfica 4.2. ΔP en función del caudal.



Gráfica 4.3. Presiones en función del caudal.

4.4. Estudio de la influencia del tamaño del scaffold.

Dado que la cámara de sembrado permite el uso de scaffolds de entre 5 y 7 mm, al utilizar un scaffold de un tamaño inferior al máximo, que no llene por completo el diámetro de la cámara, existirá un volumen libre entre el borde del scaffold y la pared de la cámara por donde puede circular el flujo sin que las células se depositen correctamente en el scaffold.

Si el flujo que sale a esa zona no atraviesa de un lado a otro de la cámara sino que permanece ahí de forma residual, es posible que las células no lleguen a adherirse al scaffold en ningún momento

Con estas simulaciones se verá si utilizar un tamaño de scaffold grande que ocupe toda la cámara de sembrado o utilizar uno de diámetro inferior, influye notablemente en el comportamiento del flujo. Para ello se van a evaluar las velocidades y presiones obtenidas en esta nueva simulación comparándolas con las obtenidas anteriormente.

Para esta comparativa, utilizaremos las condiciones de contorno indicadas en la sección 4.2.3 mientras que el caudal utilizado será de 1 ml/min.

4.4.1. Desarrollo de la simulación.

Representación de las líneas de flujo

En la figura 4.21 se representa cómo el caudal de 1 ml/min pasa a través de un scaffold de 6 mm de diámetro. Se representan 200 líneas de flujo y, tal y como se puede apreciar, sólo unas pocas de ellas salen por los laterales del scaffold al espacio que queda entre éste y la cámara de sembrado.

Además, las líneas de flujo que salen al volumen sin scaffold, rápidamente vuelven a pasar a través de él y pasan al otro lado de la cámara de sembrado. Es decir, no se produce ningún flujo residual entre el scaffold y las paredes de la cámara de sembrado.

Este análisis depende en gran medida del número de líneas de flujo representadas y de la zona seleccionada de inicio de las mismas, por lo tanto se trata de un análisis únicamente cualitativo que no nos permite sacar ninguna conclusión definitiva. Sin embargo, nos permite prever que no habrá grandes diferencias entre utilizar scaffolds de mayor o menor tamaño.

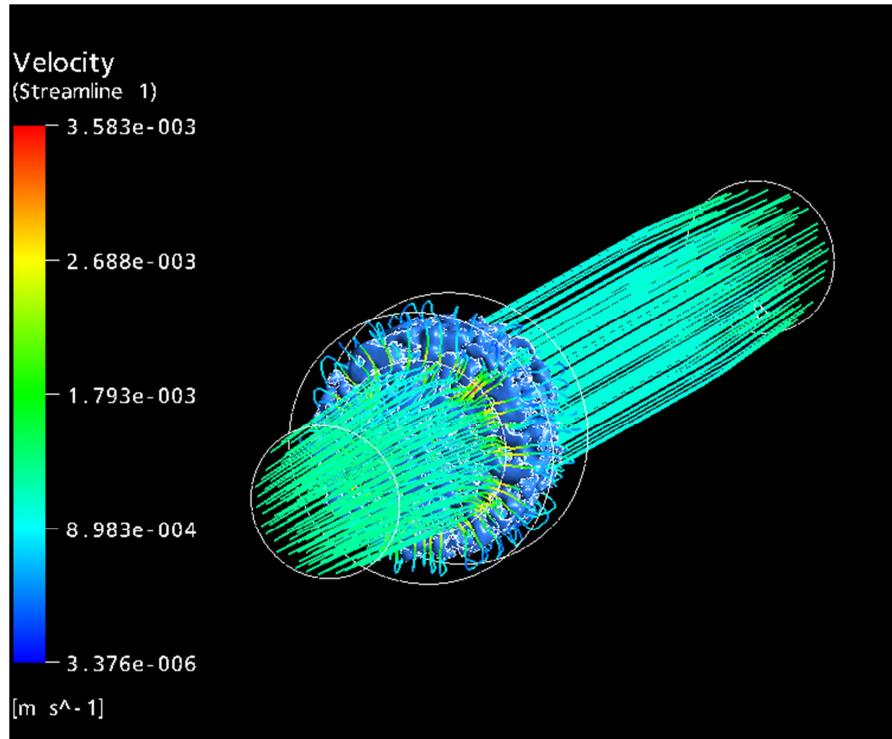


Figura 4.21. Líneas de flujo en el paso por la cámara de sembrado.

Comparación del perfil de velocidad

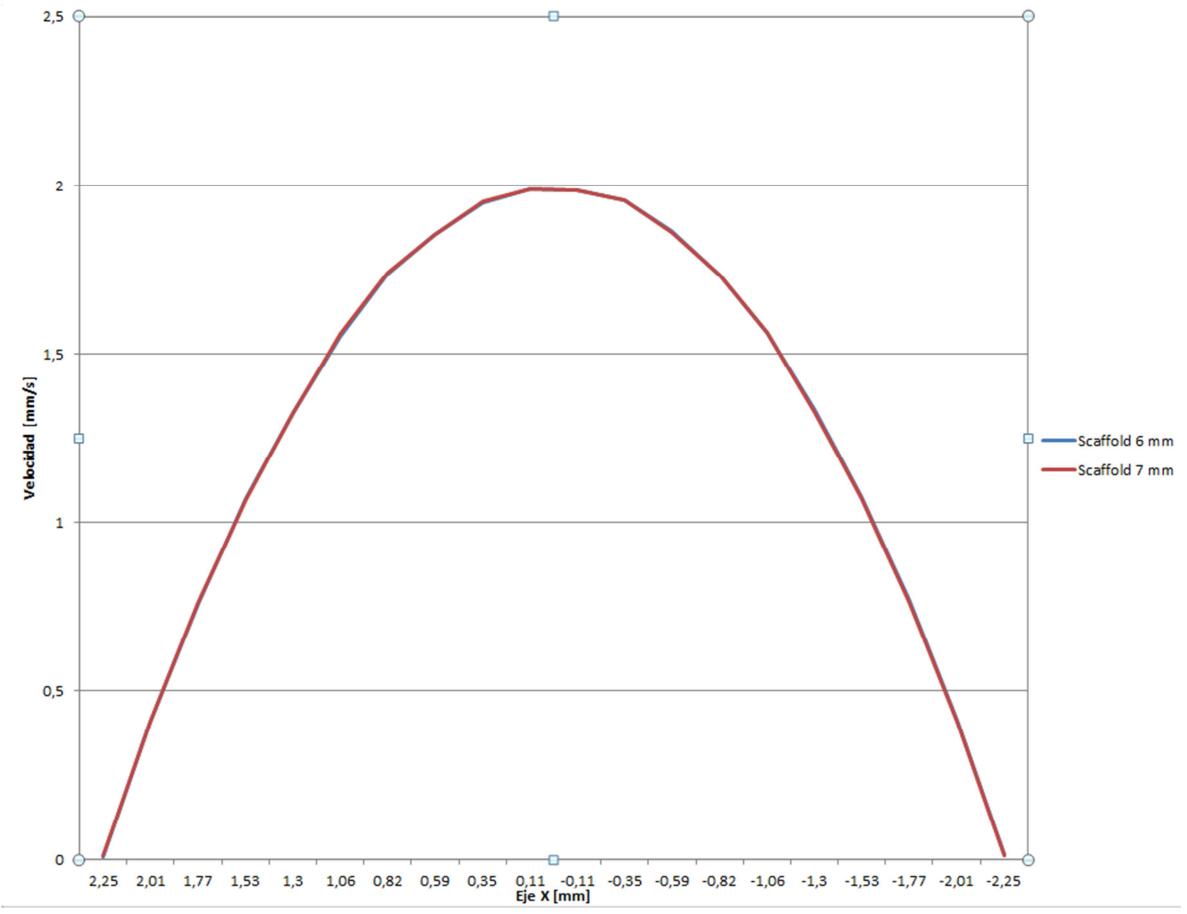
Los perfiles de velocidad obtenidos en las simulaciones con scaffold de 6 mm y de 7 mm se muestran en la gráfica 4.4. Las mallas utilizadas para esta simulación tienen el mismo tamaño de elemento para cada una de las partes del dominio, sin embargo en la malla del scaffold grande se alcanzan los 4 millones de elementos mientras que la otra es de 3 millones.

En la figura 4.22 se muestra un recorte en detalle de la gráfica 4.16 donde se ve cómo las dos curvas son prácticamente coincidentes.

Como se ve en la gráfica 4.4, los perfiles de velocidad para distintos tamaños de scaffold son prácticamente iguales, tanto es así que las gráficas del perfil de velocidad de cada caso se superponen completamente mostrándose sólo una de las curvas.

Las velocidades máximas que se dan en cada uno de los casos son las siguientes:

- Scaffold 6 mm diámetro: $V_{max} = 1,99168$ mm/s
- Scaffold 7 mm diámetro: $V_{max} = 1,99121$ mm/s



Gráfica 4.4. Perfiles de velocidad para distintos tamaños de scaffold.

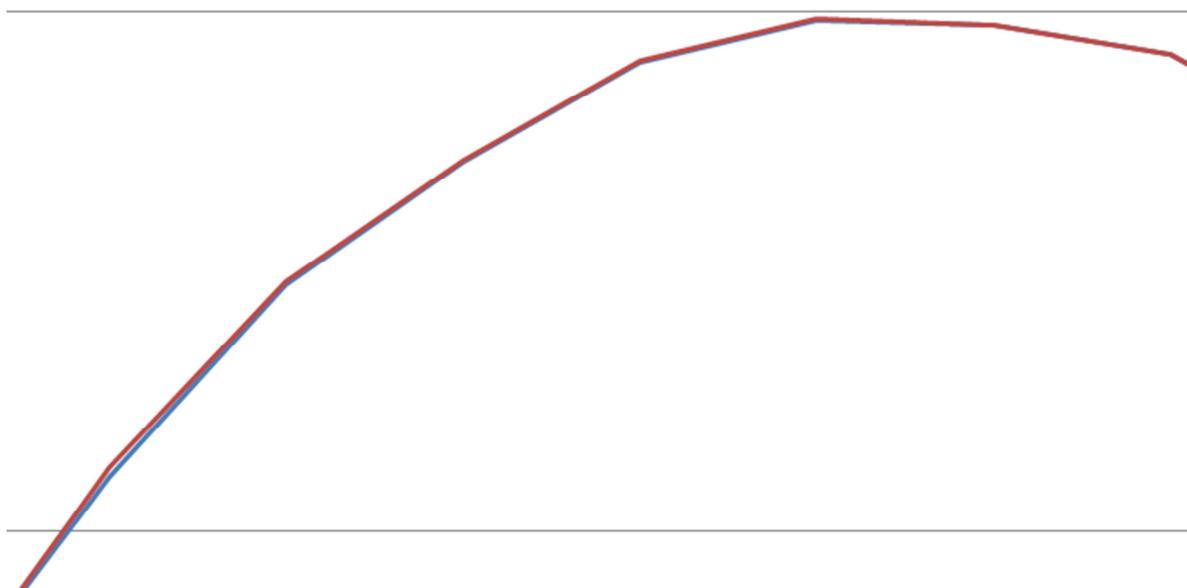


Figura 4.22. Detalle de la gráfica de velocidades.

Comparación de variaciones de presión en el scaffold.

Las variaciones de los valores de presión entre los scaffolds de 6 y 7 mm se muestran a continuación.

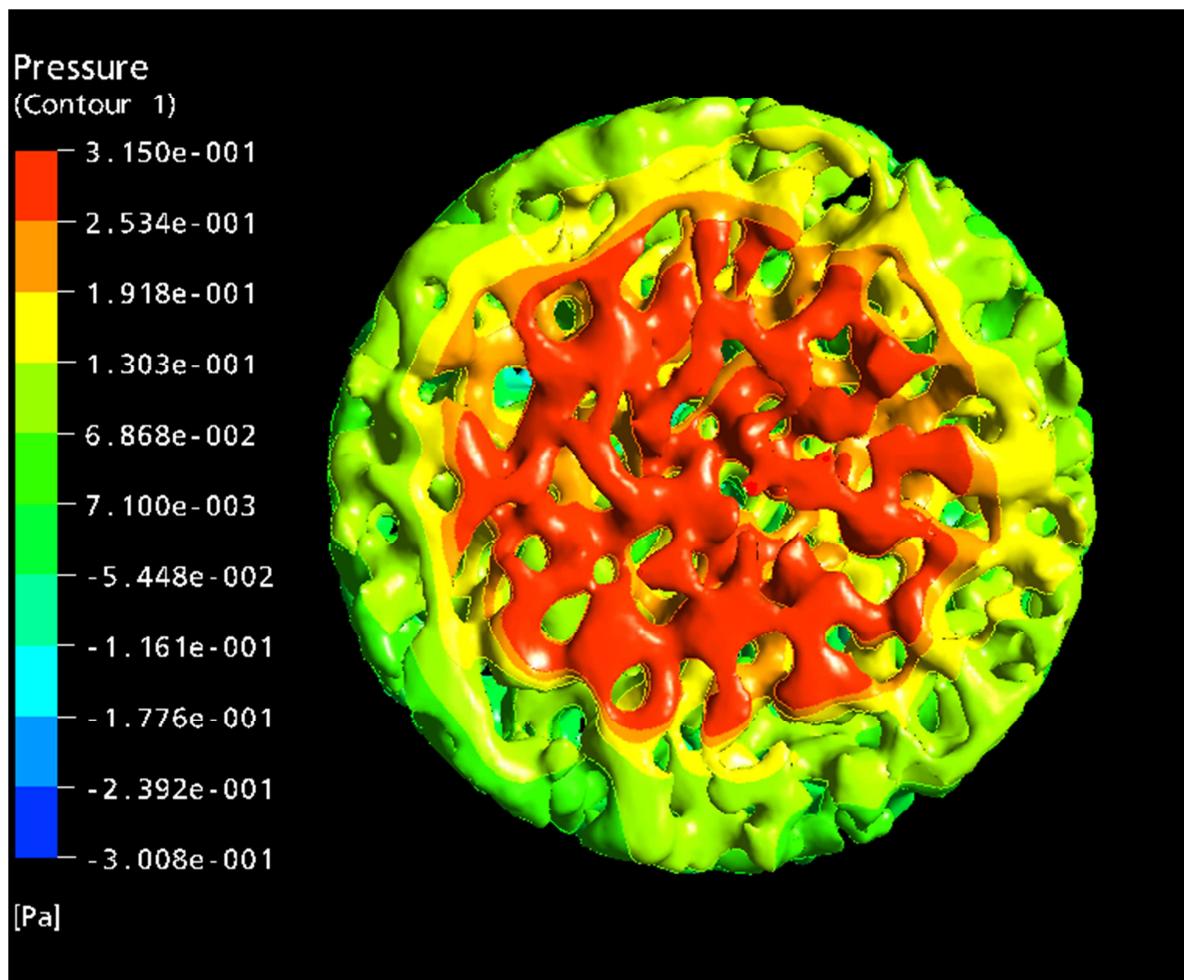


Figura 4.23. Representación de presiones en el scaffold.

Como se muestra en la figura 4.23, las presiones en el scaffold de 7 mm de diámetro varían entre 3.92×10^{-1} y -3.778×10^{-1} Pa.

En el apartado 4.3.2 (Figuras 4.14 y 4.15) se analizaba la variación de presiones que se dan en un scaffold de 6 mm de diámetro al hacer pasar un flujo de 1 ml/min de caudal a través de él. Los valores de presión que se obtuvieron fueron 3.150×10^{-1} y 3.008×10^{-1} Pa como máximo y mínimo respectivamente, son similares a los obtenidos en esta nueva simulación con un scaffold más grande.

4.4.2. Conclusión

Como se ha visto en el apartado 4.6.2 los valores de velocidad del flujo tras pasar por el scaffold, son similares independientemente del tamaño del scaffold utilizado entre los valores analizados.

En lo referente a la presión, los valores máximos y mínimos obtenidos en la simulación con el scaffold de 7 mm de diámetro, son ligeramente superiores respecto a los que obtuvimos con el scaffold de 6 mm. Sin embargo la distribución de presiones por toda la superficie es similar en ambos casos.

Tras analizar los resultados y observar que no se encuentran diferencias notables entre los valores de velocidad y las presiones obtenidas, se concluye que pequeñas variaciones en las dimensiones del scaffold no tienen apenas influencia en el comportamiento del flujo a su paso por la cámara de sembrado.

Capítulo 5:

CONCLUSIONES DEL PROYECTO



CAPÍTULO 5. Conclusiones del proyecto

5.1. Conclusiones generales

5.1.1. Diseño de un sistema de sembrado para andamiajes.

Los primeros ensayos dieron como resultado desequilibrios muy pronunciados e irregulares en el flujo, se observó que el motivo que causaba estos desequilibrios era un desajuste en el giro del motor al que va acoplada la bomba peristáltica que colocamos en el biorreactor de flujo TEB1000.

Mediante una reprogramación del autómata que regula el giro del motor, se ha corregido el desajuste en el giro de la bomba

A pesar de las correcciones realizadas, siguen apareciendo desequilibrios debidos a la acumulación de pequeñas variaciones del volumen de fluido bombeado en un sentido y otro en los ciclos de bombeo de larga duración. Estos pequeños desequilibrios son progresivos y suelen aparecer siempre en la misma dirección de bombeo.

Como solución al problema se ha creado una herramienta en el panel de control del biorreactor que permite al usuario indicar el porcentaje de desequilibrio que está observando en su ensayo y la dirección en la que se está produciendo para que el sistema corrija esta desviación.

5.1.2. Simulación de paso de flujo por el scaffold.

Los resultados obtenidos en este ensayo, nos permiten observar que la ΔP que se da en el scaffold varía linealmente en función del caudal de flujo introducido. A partir de estos valores de caída de presión, será posible calcular propiedades del scaffold como la permeabilidad.

Las cámaras de sembrado utilizadas (P3D-6), permiten la utilización de scaffolds de distintos diámetros. Las simulaciones realizadas nos permiten observar que para las pequeñas variaciones de diámetros del scaffold que se utilizan en estas cámaras de sembrado, no se aprecian diferencias importantes en el flujo.

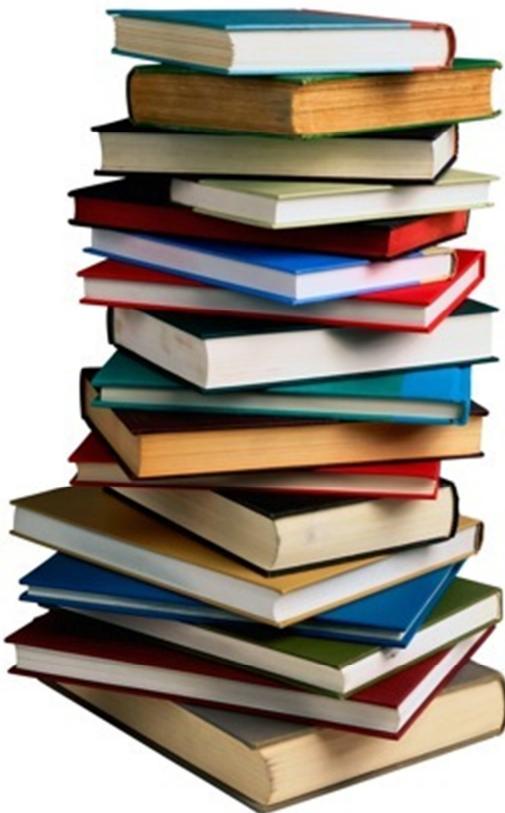
5.2. Líneas futuras

Como posibles líneas de trabajo de continuación del presente proyecto, se plantean las siguientes:

- Realizar los mismos ensayos con cultivos reales.
- Evaluar la eficiencia del sembrado según diversos parámetros: caudal, perfil de sembrado, tipo de scaffold, tamaño de scaffold.
- Cálculo de la permeabilidad del scaffold.
- Evaluar el crecimiento celular (segregación matriz) mediante el TC.
- Realizar simulaciones con flujos turbulentos.
- Realizar simulaciones con un scaffold descentrado en la cámara de sembrado.
- Realizar simulaciones de la adhesión celular.
- Simulación del efecto en el flujo del crecimiento celular (segregación de matriz extracelular).

Capítulo 6:

BIBLIOGRAFÍA



CAPÍTULO 6. Bibliografía

- Artículos y libros científicos.

1. U.S Department of Health and Human Sciences. 2010: *A New Vision – A future for Regenerative Medicine*. 2009.
2. *Efficient seeding of sheep bone marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (MSC) in poly (L-lactic acid) scaffolds*. I. Izal, P. Ripalda, V. Acosta, I. Ochoa, J. A. Bea, M. Doblaré, P. 2008, EORS.
3. *Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering*. Vunjak-Novakovic, G. et al. 1998, Biotechnol. Prog., pp. 193-202.
4. *Tissue Engineering of cartilage in space*. Freed, L.E. et al. 1997, PNAS, Vol.94, pp. 13855-13890.
5. *Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period*. Holy, C.E. et al. 2000, J. Biomed. Mater. Research, Vol. 51, pp. 376-382
6. *Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization*. Carrier, R. L. et al. 1999, Biotechnol. Bioeng., Vol. 64, pp. 580-589.
7. *Optimizing seeding and culture methods to engineer sommth muscle tissue on biodegradable polymer matrices*. Kim, B.S. et al. s.l. : Biotechnol. Biomed., 1998, Vol. 57, pp. 46-54.
8. *Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porus biodegradable polymers*. Isaugh-Riley, S.L. et al. 1998, Biomaterials, Vol. 19, pp. 1405-1412.
9. *The stiffnes of bone marrow cell-knit composites is increased during mechamical load*. Bruinink, A. et. al. 2001, Vol. 22, pp. 3169-3178
10. *Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, an proliferation in nonwoven fibrous matrices*. Li, Y. et al. 2001, Biotechnol. Prog, Vol. 17, pp. 935-944.
11. *Static and dynamic fibroblast seeding and cultivation in porous PEO/PBT scaffolds*. Xiao, Y.L. et al. 1999, J. Mater Sci. Mater. Med.
12. *Application of magnetic resonance microscopy to tissue engineering: a polylactide model*. Burg, K. J. et al. 2002, J. Biomed. Mater. Res., Vol. 61, pp. 380-390.
13. *Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity*. Wendt, D. et al. 2003, Biotechnol. Bioeng, Vol. 84, pp. 205-214.
14. *Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering*. Sodian, R. et al. 2002, Vol. 8, pp. 863-870.
15. *Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures*. Davisson, T. et al. 2002, Vol. 8, pp. 807-816.
16. *High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering*. Radissic, M. et al. 2003, Vol. 82, pp. 403-414.

17. *Tissue Engineering*. Langer, R. and Vacanti, J.P. 1993, Science 260, pp. 920-926.
18. Robert Lanza, Robert Langer, Joseph Vacanti. "Principles of Tissue Engineering". Second Edition.
19. D. Wendt, N. Timmins, J. Malda, F. Janssen, A. Ratcliffe, G. Vunjak-Novakovic and I. Martin. "Bioreactors for tissue engineering". *Tissue Engineering*, Chapter 16, ISBN 978-0-12-370869-4
20. Warren L. Grayson, Sarindr Bhumiratana, Christopher Cannizzaro, Grace Chao, Donald P. Lennon, Arnold I. Caplan and Gordana Vunjak-Novakovic. "Effects of Initial Seeding Density and Fluid Perfusion Rate on Formation of Tissue-Engineered Bone". *Tissue Engineering*, Volume 14, Number 11, (2008): 1809-1820.
21. Robert Maidhof, Anna Marsano, Eun Jung Lee and Gordana Vunjak-Novakovic. "Perfusion Seeding of Channeled Elastomeric Scaffolds with Myocytes and Endothelial Cells for Cardiac Tissue Engineering". *Biotechnology Progress*, Volume 26, No.2 (2010): 565-572
22. M. A. Koch, E. J. Vrij, E. Engel, J. A. Planell, D. Lacroix. "Perfusion cell seeding on large porous PLA/Calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters". *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 95A, No.4 (2010): 1011-1018.
23. Jose F. Alvarez-Barreto, Shawna M. Linehan, Robert L. Shambaugh, Vassilios I. Sikavitsas. "Flow Perfusion Improves Seeding of Tissue Engineering Scaffolds with Different Architectures". *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 35, N.3 (2007): 429-442.
24. European Competitiveness Report. The European Comission, 2001.
25. The Kobe Medical Industry Development Projetc Outline. City of Kobe, Japan, 2003.
26. McIntire, Larry V. Nerem, Robert M. Ratner, Buddy D. Russell, Allan J. Vacanti, Josep P. Letter to the President Bush. Alliance for the Engineering of Replacement Tissues, December 12, 2002.
27. Advanced Tissue Engineering and Science. A Multi-Agency Strategic Plan. National Science and Technology Council, 2007.

- Informes de proyectos internos de EBERS.
- Manual de usuario de Biorreactor de Flujo TEB1000.
- Archivos de ayuda de los programas ANSYS ICEM y ANSYS CFX.