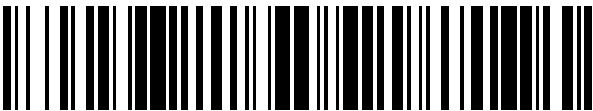


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 876**

21 Número de solicitud: 202330648

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
A61B 8/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:
27.07.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:
03.02.2025

71 Solicitantes:
UNIVERSIDAD DE GRANADA (70.00%)
Complejo Administrativo Triunfo, Pab.1, Cuesta
del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES y
BIOIBERICA, S.A.U. (30.00%)

72 Inventor/es:
MARTÍNEZ MORENO, Daniel;
MARCHAL CORRALES, Juan Antonio;
RUS CARLBORG, Guillermo;
CALLEJAS ZAFRA, Antonio Manuel;
JIMÉNEZ GONZÁLEZ, Gema y
GÁLVEZ MARTÍN, Patricia

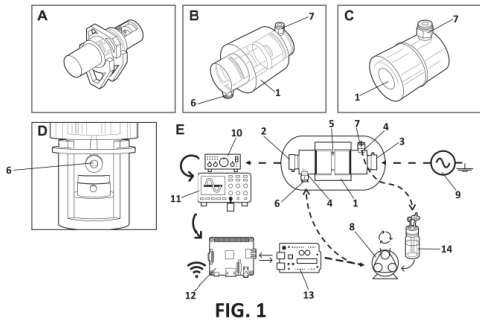
74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **BIORREACTOR Y SISTEMA PARA GENERACIÓN DE UN TEJIDO BIOLÓGICO Y MÉTODO PARA DETERMINAR EN TIEMPO REAL EL CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DE UN TEJIDO BIOLÓGICO Y MÉTODO DE OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE UN TEJIDO BIOLÓGICO**

57 Resumen:

Biorreactor y sistema para generación de un tejido biológico y método para determinar en tiempo real el crecimiento y maduración de un tejido biológico y método de optimización de producción de un tejido biológico.

El biorreactor comprende: una cámara de cultivo (1) de células configurada para alojar una estructura (5) para albergar fuente celular y destinada a promover el cultivo de células: un transductor de transmisión (2) configurado para emitir una onda ultrasónica en dirección a la estructura: un transductor de recepción (3) enfrentado al transductor de transmisión (2) y configurado para recibir la onda ultrasónica una vez que ha atravesado la estructura (5); y un circuito fluido (4) destinado a pasar a través de la estructura (5) con el fin de generar un esfuerzo cortante en la superficie del mismo para facilitar la generación y diferenciación en las células, donde el circuito fluido (4) comprende una bomba peristáltica (8).



DESCRIPCIÓN

BIORREACTOR Y SISTEMA PARA GENERACIÓN DE UN TEJIDO BIOLÓGICO Y MÉTODO PARA DETERMINAR EN TIEMPO REAL EL CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DE UN TEJIDO BIOLÓGICO Y MÉTODO DE OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE UN TEJIDO BIOLÓGICO

5

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención pertenece al campo del cultivo de células, más concretamente, al campo de biorreactores con estructuras adaptadas para el cultivo de células.

La invención se refiere a un método para determinar en tiempo real el crecimiento y
maduración de un tejido biológico. Además, la presente invención se refiere a un método
15 de optimización de producción un tejido biológico en base a las mediciones del método
para determinar en tiempo real el crecimiento y maduración de un tejido biológico.

La invención también se refiere a un biorreactor para la generación de un tejido biológico
mediante cultivo de células, que comprende elementos configurados para llevar a cabo
20 los métodos anteriores, y un sistema para la generación del cultivo de células que
comprende el biorreactor. El biorreactor de la invención permite monitorizar y optimizar
la generación y diferenciación de las células para la generación de tejidos biológicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25

El objetivo de la medicina regenerativa (MR) es restaurar o establecer la función normal
mediante la regeneración total o parcial de células, órganos o tejidos humanos. Las
células vivas, los biomateriales y las señales bioactivas son los tres pilares de la
ingeniería de tejidos (IT).

30

Entre las diversas enfermedades que pueden beneficiarse de los avances en IT se
encuentra la OA, un trastorno incurable y complejo. La OA es una enfermedad
socioeconómica importante que afecta principalmente al cartílago articular (CA), que es
un tejido con una baja capacidad de autocuración y, por lo tanto, un objetivo ideal para
35 la MR y la IT.

El proceso patogénico que conduce a la OA se caracteriza por un deterioro persistente del CA de bajo grado, que es la causa principal de la degeneración articular continua. Debido a la pérdida de CA, OA causa dolor y pérdida de la función articular. Como tal, la OA no debe considerarse como una enfermedad, sino más bien como el punto final
5 común de una serie de vías secundarias asociadas con la edad, los posibles traumas, la obesidad y los cambios resultantes en la biomecánica de la articulación.

Un trastorno mecánico que causa lesiones de bajo grado al CA es el principal impulsor en el desarrollo de OA. Como resultado, se pueden identificar tres etapas distintas desde una perspectiva biomecánica: i) la ruptura proteolítica de la matriz extracelular (MEC)
10 del CA, ii) la fibrilación y erosión de la superficie del CA, y iii) el inicio de la inflamación sinovial.

Una estimulación mecánica común para CA son las cargas mecánicas, que se describen como interacciones directas entre dos superficies, en forma de tensiones que varían de 0.5 a 8 MPa. Asimismo, las cargas de fricción ejercidas por el líquido intersticial aumentan la presurización del líquido cartilaginoso induciendo presiones hidrostáticas. Este hecho contribuye al aumento de la rigidez del CA bajo tensiones dinámicas. Por otro lado, la MEC sólida sostiene la proporción restante (66%) de la carga de
15 compresión.
20

Debido a que el CA es un tejido avascular sin sistema linfático y sin terminaciones nerviosas, los pacientes con OA tienen una tasa limitada de regeneración, siendo la IT una herramienta precisa para revertir ese proceso con técnicas como la biofabricación. Actualmente no existe un tratamiento conocido para la OA que pueda detener o
25 disminuir su progresión.

Actualmente las lesiones de CA son tratadas principalmente con tratamientos quirúrgicos. Sin embargo, estos tratamientos presentan falta de efectividad a largo
30 plazo. Otro ejemplo es la mosaicoplastia, un tratamiento para las lesiones condrales focales cuyos resultados son relativamente aceptables durante los primeros 2 años, pero que en muchos casos fracasa después.

Numerosos productos y tratamientos basados en IT han intentado simular el CA desde hace algunas décadas, incluido el implante autólogo de condrocitos (ACI) y el implante de condrocitos autólogos en matriz (MACI).
35

La biofabricación de estructuras que simulen tejidos y/o órganos para su uso en IT se lleva a cabo a partir de biomateriales sintéticos como ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL) y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Estos materiales no son capaces de imitar fácilmente las propiedades mecánicas del tejido real. Por lo tanto, el uso de nuevos biomateriales que soporten esfuerzos son bastante prometedores en IT para la OA. A pesar de ello, es importante asegurar la adecuada interacción célula-biomaterial reduciendo el comportamiento hidrofóbico de este tipo de polímeros sintéticos. Una buena manera de abordar esta problemática es mediante modificaciones superficiales, por ejemplo, con péptidos Arg-Gly-Asp (RGD), con ácido butírico 1-pireno (PBA) o con varios elementos de MEC como fibronectina o colágeno.

Anteriormente, se ha investigado cómo la estimulación biomecánica induce la condrogénesis de células madre mesenquimales (MSC) por fosforilación de Sox9 a través de la proteína quinasa A (PKA), cAMP, Ser133 y CREB. Por lo tanto, cualquier vía que implique la transmisión de señales de la estimulación mecánica a la actividad electroquímica se conoce como mecano-transducción. El potencial mecano-sensorial transitorio del receptor vanilloide 4 (TRPV4), piezo1 y piezo2 se encuentran en condrocitos y osteoblastos. Tanto el tejido óseo como el tejido cartilaginoso exhiben mecano-sensibilidad aguda para mantener la homeostasis. Por ejemplo, la osteoporosis está relacionada con la inhibición de piezo1, y TRPV4 regula la respuesta anabólica de los condrocitos al estrés osmótico o mecánico. Aunque el mecanismo exacto de acción aún se desconoce, algunas pruebas apuntan a los cilios primarios como un potencial mecano-sensorial para las fuerzas de cizallamiento.

Como se ha explicado, hasta la fecha, se han desarrollado intervenciones no efectivas para el tratamiento de las lesiones de CA. Por lo tanto, son imperativos nuevos dispositivos médicos de bioingeniería que induzcan la maduración ex vivo de estructuras biomiméticas de tejidos biológicos, tales como cartílago, en tres dimensiones.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar en tiempo real el crecimiento y maduración de un tejido biológico, de ahora en adelante “método de determinación de la invención”, y que comprende:

- introducir un caudal de medio de cultivo en un biorreactor, donde el biorreactor comprende:
 - o una cámara de cultivo (1) que aloja una estructura (5), la cual alberga una fuente celular,
 - 5 o un transductor en transmisión (2) y un transductor en recepción (3) situado enfrente al transductor en transmisión (2), y
 - o un circuito fluido (4) conectado a la cámara de cultivo (1), situado entre el transductor en transmisión (2) y el transductor en recepción (3), y por el cual se introduce el caudal de medio de cultivo destinado a pasar a través de la estructura (5);
- generar una onda ultrasónica mediante el transductor en transmisión (2) que atraviesa la cámara de cultivo (1) y la estructura (5) con la fuente celular alojada en dicha cámara de cultivo (1);
- recibir la onda ultrasónica en el transductor en recepción (3) una vez que ha
- 15 atravesado la estructura (5), generando una señal de recepción (3);
- generar un modelo de simulación de propagación de ultrasonidos, calculando una señal simulada de recepción y fijando como variables dependientes una densidad de la estructura (5) y una velocidad del sonido en la estructura (5);
- definir una métrica de distancia entre la señal simulada de recepción y la
- 20 señal de recepción (3) de la onda ultrasónica obtenida en el transductor de recepción (3),
- determinar la densidad en la estructura (5) y la velocidad del sonido en la estructura (5) que minimiza la métrica de distancia, en cada instante de tiempo; y
- 25 - correlacionar la densidad y velocidad del sonido obtenidas con un aumento de rigidez y de contenido de tejido, monitorizando así el crecimiento de tejido a lo largo del tiempo.

En una realización preferida del método de determinación de la invención, el modelo de simulación es generado mediante modelos de elementos finitos (MEF), diferencias finitas, método de matriz de transferencia (transfer matrix formalism) o técnicas espectrales.

En la generación del modelo de simulación de propagación de ultrasonidos, la fijación de las condiciones de contorno se puede especificar dependiendo de la geometría, tipo

de tejido y la onda. Así las condiciones de contorno se pueden ser fijadas de manera rutinaria por la persona experta en la materia.

Además, en el cálculo de la señal simulada preferiblemente se simulan las siguientes variables, la matriz de desplazamiento de los transductores (donde la variables son X,Y), el gradiente de presiones a través de los campos de propagación (onda acústica, variable en Pa) y también se simula el voltaje del transductor receptor mediante el efecto piezo eléctrico.

En otra realización preferida del método de determinación de la invención, la métrica de distancia usada es una correlación cruzada entre las señales, una suma de las componentes del vector o una raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las componentes del vector.

En la presente invención, la métrica de distancia se refiere a la fase o el tiempo de vuelo (ToF).

En otra realización preferida del método de determinación de la invención, la etapa de determinar la densidad y la velocidad de propagación se realiza mediante un algoritmo de búsqueda que puede ser un método basado en gradiente, un algoritmo genético o una red neuronal entrenada con un conjunto de señales de ultrasonidos en recepción pre-calculadas y valores de densidad y velocidad de sonido correspondientes a dichas señales.

En la presente invención, la expresión “crecimiento y maduración de un tejido biológico”, se refiere al proceso por el cuál las células de la fuente celular se duplican, se diferencian y/o producen elementos de la matriz extracelular. La matriz extracelular se compone de una mezcla compleja de biomoléculas estructurales que son liberadas por una célula al medio extracelular. Las matrices extracelulares están involucradas en el soporte de las células que forman parte de un tejido. Las matrices extracelulares comprenden elementos fibrosos los cuales incluyen fibras de colágeno y fibras elásticas. Además, las matrices extracelulares incluyen glicoproteínas, tales como laminina de la membrana basal, microfibrillas alrededor de fibras elásticas, fibras, fibronectinas en la superficie celular y similares. El tejido particularmente diferenciado tiene la misma estructura básica. Por ejemplo, en el cartílago hialino, los condroblastos producen de manera

característica una gran cantidad de matrices de cartílago que incluyen proteoglicanos. En los huesos, los osteoblastos producen matrices óseas que provocan la calcificación.

5 En la presente invención las variables que se correlacionan con el crecimiento y maduración del tejido biológico son las medidas de densidad y la velocidad de ultrasonido obtenidas mediante el método de determinación de la invención. El aumento del número de células y un aumento de la producción de la matriz extracelular se correlacionan con un aumento de la densidad y aumento de la velocidad del sonido.

10 En la presente invención, el término “biorreactor” se refiere a un dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo el cultivo de células, tales como una cámara de cultivo (1) que aloja una estructura (5) la cual alberga una fuente celular, y un circuito fluido (4) que proporciona medio de cultivo.

15 El caudal de medio de cultivo introducido en la cámara de cultivo (1) del biorreactor en el método de determinación de la invención no solo proporciona los nutrientes necesarios para la fuente de células, sino que además genera estimulación mecánica que induce el crecimiento y maduración de un tejido biológico. El caudal de medio de cultivo puede ser introducido por un circuito fluido (4).

20 En la presente invención, el término “tejido biológico” se refiere a la agregación de uno o más tipos de células unidas en el desempeño de una función particular en un organismo. Los tejidos biológicos forman parte de órganos o diferentes sistemas fisiológicos de un sujeto, donde sujeto se refiere un humano o a un animal no humano
 25 (ej. ratón, rata, perro, cerdo o caballo). La presente invención se refiere específicamente a tejidos sólidos entre los que se incluyen, sin limitación, el tejido óseo o hueso, cartílago en el sistema esquelético o un órgano, músculo, tejido adiposo, tejido epitelial, conjuntivo o nervioso. Los diferentes tipos de tejido no se limitan a los tejidos anatómicos normales, sino que también pueden incluir diferentes tipos de células especializadas
 30 que se encuentran en condiciones patológicas, como tejido tumoral y no tumoral adyacente del mismo tipo o diferente, como adenocarcinoma de mama y tejido mamario normal (no maligno) adyacente. La aplicación de una estimulación mecánica es uno de los factores necesarios en la generación y diferenciación de las células de tejidos tales como el tejido cartilaginoso o el tejido óseo, pero también promueve la generación y
 35 diferenciación de otros tejidos biológicos sólidos como tejido muscular, el miocardio y tejido vascular, entre otros (Ogunrinade, O., Kameya, G. T., & Truskey, G. A. (2002).

Effect of fluid shear stress on the permeability of the arterial endothelium. *Annals of biomedical engineering*, 30, 430-446; Yeatts, A. B., & Fisher, J. P. (2011). Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*, 48(2), 171-181; Lee, A. A., Graham, D. A., Dela Cruz, S., Ratcliffe, A., & Karlon, W. J. (2002). Fluid shear stress-induced alignment of cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biomech. Eng.*, 124(1), 37-43; Huang, Y., Jia, X., Bai, K., Gong, X., & Fan, Y. (2010). Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Archives of medical research*, 41(7), 497-505). El método de determinación de la presente invención permite determinar el crecimiento y maduración del tejido biológico en base a los cambios de densidad y velocidad de sonido medidos, dados por los cambios en el número de células y producción de elementos de la matriz extracelular. El método de determinación de la presente invención es aplicable a diferentes tipos de tejidos teniendo en cuenta la densidad final de cada tipo de tejido, donde dicha densidad viene dada por masa de tejido/volumen de tejido (ej. g de tejido /cm³ de tejido).

En el método de determinación de la invención, las condiciones del temperatura, oxígeno y dióxido de carbono en el interior de la cámara de cultivo (1) del biorreactor pueden ser definidas por la persona experta en la materia de manera rutinaria, dependiendo del tipo de tejido biológico que se desee generar.

La cámara de cultivo (1) en el biorreactor del método de la invención, aloja una estructura (5) la cual alberga una fuente de células para la generación del tejido biológico, promovido por los esfuerzos mecánicos producidos por el caudal de medio de cultivo.

En la presente invención, los términos “fuente de células” o “fuente celular”, usados indistintamente, se refiere al conjunto de células usadas para la generación de un tejido mediante la aplicación de las condiciones y estímulos necesarios para ello. La fuente de células se encuentra por tanto en condiciones óptimas de temperatura, presión y suministro de nutrientes para su cultivo, siendo dichas variables definidas por el experto en la materia de manera rutinaria.

En la presente invención, el término “medio de cultivo” se refiere a una solución líquida que se utiliza para proporcionar suficientes nutrientes (por ejemplo, vitaminas, aminoácidos, nutrientes esenciales, sales y similares) y tiene las propiedades (por

ejemplo, osmolaridad, amortiguación) para mantener las células vivas (o células vivas en un tejido) y promover su crecimiento y/o diferenciación.

5 En la presente invención, la fuente celular puede ser de diferentes tipos y orígenes, las cuales mediante las condiciones adecuadas de cultivo dan lugar a un determinado tipo de tejido biológico.

Así, en una realización preferida del método de determinación de la invención, la fuente celular se selecciona de entre células madre y células diferenciadas.

10

El término “células madre”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a células indiferenciadas, autorrenovables y capaces de diferenciarse a uno o más tipos de células especializadas. Las células madre se pueden encontrar tanto en tejidos embrionarios como en tejidos adultos, siendo células madre embrionarias o células madre adultas respectivamente. Dentro de las células madre adultas se encuentran las células madre mesenquimales (MSCs), las cuales se pueden obtener de tejidos tales como el tejido adiposo o médula ósea entre otros. (MSCs, conforman una fuente de células indiferenciadas que pueden convertirse en el linaje de células de diferentes tejidos, como por ejemplo el linaje condrogénico (ej. condroblastos) u osteogénico (ej. osteoblastos). Las MSCs poseen una alta tasa de proliferación *in vitro*, conservando su capacidad de diferenciación multipotente, lo que las hace bastante interesantes como agentes terapéuticos. La almohadilla de grasa infrapatelar es uno de los sitios de los cuales se pueden aislar las células multipotentes, para la generación de tejidos biológicos mediante técnicas y medios de ingeniería de tejidos (IT) como los de la presente invención. Las células madre también pueden obtenerse mediante técnicas de reprogramación celular en el laboratorio obteniéndose las denominadas células madre pluripotentes inducidas, las cuales también pueden usarse como fuente celular.

15

20

25

30

Así, en otra realización preferida del método de determinación de la invención, la fuente celular es de células madre seleccionadas de la lista que consiste en: células madre adultas, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas.

35

Por otro lado, en la presente invención, el término el término “células diferenciadas” se refiere a aquellas células que tras un proceso de maduración presentan características funcionales propias del tejido del que forman parte, además las células diferenciadas se caracterizan por haber perdido su capacidad de diferenciarse a otros tipos de células

especializadas de forma natural. Ejemplos de células diferenciadas incluyen, sin limitación, fibroblastos, condrocitos, osteocitos, miocitos o neuronas.

Así, en otra realización preferida del método de determinación de la invención, las células diferenciadas se seleccionan de la lista que consiste en: fibroblastos, condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, miocitos, células endoteliales y miocitos.

En una realización más referida del método de determinación de la invención, el tejido biológico es tejido cartilaginoso.

En otra realización aún más preferida del método de determinación de la invención, el tejido biológico es tejido cartilaginoso, y la fuente celular se selecciona de entre células madre mesenquimales y células diferenciadas; donde las células diferenciadas se seleccionan entre condrocitos y fibroblastos.

Tanto las células madre como las células diferenciadas pueden ser obtenidas a partir de los tejidos de un sujeto, donde el sujeto puede ser un humano o un animal no humano. Preferiblemente tanto las células madre como las células diferenciadas son obtenidas de los tejidos del sujeto, el cual posteriormente va a recibir un injerto del tejido biológico generado.

La estructura (5) en la que se alberga la fuente celular para promover el cultivo de células y la generación de tejido biológico puede estar compuesta de cualquier biomaterial que permita una rigidez y consistencia adecuada a formar redes fibrilares para adecuar la adhesión celular, la viabilidad celular y el paso de flujo a través de sus poros. Algunos ejemplos de biomateriales de los que se compone una estructura (5) para albergar la fuente celular incluyen, sin limitación, polímeros sintéticos como poliuretano termoplástico 1,4-butanodiol (bTPUe), o ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PLC) o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Los ejemplos aportados de polímeros sintéticos se encuentran dentro del ámbito de protección del método de determinación de la invención.

Para asegurar la adecuada interacción célula-biomaterial en la estructura (5), reduciendo el comportamiento hidrofóbico de los materiales polímeros sintéticos tales como bTPUe, PLA, PLCo PLGA, la estructura (5) que alberga la fuente celular dentro

del biorreactor puede ser previamente funcionalizada, por ejemplo, con péptidos Arg-Gly-Asp (RGD), con ácido 1 pireno butírico (PBA), ácido acético 1-pireno (PCA), o con varios elementos ECM como fibronectina o colágeno.

5 El biomaterial de la estructura (5), la cual alberga la fuente celular en el método de determinación de la invención, se encuentra formando una red de fibras malladas, la cual comprende huecos en los cuales se emplazan las células de la fuente celular.

10 Así, en una realización preferida del método de determinación de la invención, la estructura (5) está conformada por fibras con un diámetro de entre 50 μm y 400 μm y se representa en el modelo de simulación como una matriz de círculos.

15 En otra realización preferida del método de determinación de la invención, donde el transductor de transmisión (2) y el transductor de recepción la estructura (5) están enfrentados, y además ambos están colocados perpendicularmente al circuito fluido (4). Por tanto, la dirección de la onda ultrasónica generada por el transductor de transmisión (2) es paralela a la dirección del flujo del medio de cultivo que pasa a través de la estructura (5).

20 El material de las paredes de la cámara de cultivo (1) del biorreactor puede ser cualquier material bioinerte que tenga una densidad e impedancia significativamente diferentes a la estructura (5) con la fuente celular que se aloja en la cámara de cultivo (1).

25 A medida que se produce el crecimiento y maduración del tejido biológico, se producen variaciones en el diámetro de las fibras de la estructura (5). La variación en diámetro de las fibras de la estructura (5) se debe a un aumento del número de células de la fuente celular, y un aumento de matriz extracelular producida por las mismas. Por lo tanto, a medida que se produce el crecimiento y diferenciación del tejido biológico, aumenta la cantidad de células y de matriz extracelular, y por tanto aumenta el diámetro de las fibras
30 de la estructura (5). Al aumentar el diámetro de la estructura (5), el flujo de medio de cultivo disminuye progresivamente, por lo que la producción del tejido biológico se puede ver afectada.

35 Por lo tanto, los presente inventores además han desarrollado un método para la optimización de producción de tejido biológico a partir de las determinaciones llevadas a cabo en el método de determinación de la invención.

Así en otro aspecto, la invención se refiere a un método de optimización de la producción de tejido biológico, de ahora en adelante “método de optimización de la invención”, que comprende las etapas de:

5

- determinar una densidad de la estructura (5) y una velocidad del sonido en la estructura (5) haciendo uso del método de determinación de la invención; y
- determinar un flujo de bomba que optimiza el crecimiento y maduración de tejido mediante la expresión:

10

$$q = u \cdot \left(1 - \frac{\pi \cdot (K_4 \cdot \rho_{ECM})^2}{4 \cdot A_{total}}\right)$$

donde q es el flujo de bomba, u es la velocidad del flujo y es constante, K_4 es una constante que relaciona una variación en diámetro de fibras de la estructura con una densidad de matriz, ρ_{ECM} es la densidad de matriz extracelular y A_{total} es el área total de la estructura (5) en dirección perpendicular al flujo de bomba.

15

En la presente invención el término “flujo de bomba” se refiere al flujo de medio de cultivo bombeado por una bomba, preferiblemente una bomba peristáltica, e introducido en el biorreactor mediante el circuito fluido (4).

20

En una realización preferida del método de optimización de la invención, K_4 , que relaciona una variación en diámetro de fibras de la estructura con una densidad de matriz, se obtiene por medio de la expresión:

25

$$K_4 = \left(K_2 + \frac{K_3}{K_1}\right)$$

donde K_4 , se obtiene de las expresiones:

$$\frac{dD_f(t)}{dt} = K_2 \cdot \rho_{ECM} + K_3 \cdot [cell] - \zeta_{material}$$

$$\rho_{ECM} = K_1[cell]$$

30

y donde K_1 es una constante que depende del metabolismo celular, del tipo de matriz sintetizada y de la edad de las células, [cell] es la concentración de células adheridas a la estructura, D_f es el diámetro de la fibra de la estructura y varía en función de: $K_2 \cdot$

ρ_{ECM} que representa la matriz sintetizada por las células, donde K_2 es el coeficiente de incremento de diámetro en función de la cantidad de matriz, $K_3 \cdot [cell]$ que representa el número de células adheridas, donde K_3 es el coeficiente de incremento de diámetro en función de la masa celular, y $\zeta_{material}$ que representa la degradación del polímero del cual está hecha la estructura (5) y que se considera despreciable.

Algunos resultados obtenidos que permiten correlacionar la señal simulada del modelo computacional con la señal medida de ultrasonidos para determinar el crecimiento de la fuente celular sobre la estructura son:

- disminuye el voltaje recibido y se produce un retardo en la señal recibida;
- aumenta la amplitud de la señal recibida;
- aumenta la señal de tiempo de vuelo (ToF);
- la componente K de la ecuación de velocidad de sonido aumenta más que la densidad, indicando un aumento del módulo elástico o una disminución de la viscosidad; y
- hay ausencia de rebotes cercanos considerables.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un biorreactor para la generación de tejido biológico, de ahora en adelante “biorreactor de la invención”, que está destinado a albergar una fuente celular y que comprende:

- una cámara de cultivo (1) de células configurada para alojar una estructura (5) para albergar la fuente celular;
- un transductor en transmisión (2) configurado para emitir una onda ultrasónica en dirección a la estructura (5);
- un transductor en recepción (3) dispuesto enfrente al transductor en transmisión (2) y configurado para recibir la onda ultrasónica una vez que ha atravesado la estructura (5);
- un circuito fluido (4) destinado a pasar a través de la estructura (5) con el fin de generar un esfuerzo cortante en la superficie de la misma para facilitar la generación y diferenciación en las células; donde el circuito fluido (4) comprende una entrada (6) y una salida (7), y una bomba peristáltica (8) configurada para generar un flujo laminar; y
- un módulo de procesamiento configurado para llevar a cabo las etapas del método de determinación de la invención, y en función de la densidad en la estructura (5) y la velocidad del sonido en la estructura (5) obtenidas, controlar el flujo generado por la bomba peristáltica (8) mediante una

regulación del flujo de bomba generado, de acuerdo con las etapas del método de acuerdo con el método de optimización de la invención.

5 En otra realización preferida, el biorreactor de la invención además comprende un generador de señales (9) conectado al transductor de transmisión (2); preferiblemente el generador de señales (9) está además conectado al módulo de procesamiento para generar la onda ultrasónica.

10 En otra realización preferida, el biorreactor de la invención además comprende un amplificador (10) y un osciloscopio (11) conectados al transductor en recepción (3).

15 En otra realización preferida del biorreactor de la invención, el transductor de transmisión (2) y el transductor de recepción la estructura (5) están enfrentados y colocados perpendicularmente al circuito fluido (4). Por tanto, la dirección de la onda ultrasónica generada por el transductor de transmisión (2) es paralela a la dirección del flujo del medio de cultivo que pasa a través de la estructura (5).

20 En otra realización preferida del biorreactor de la invención, donde el módulo de procesamiento es una Raspberry PI (12) y una placa Arduino (13) conectada a la bomba peristáltica (8).

25 En otra realización preferida, el biorreactor de la invención además comprende un recipiente (14) destinado a almacenar el medio de cultivo y conectado a la bomba peristáltica (8), a la entrada (6) del circuito fluido (4) y a la salida (7) del circuito fluido (4).

30 En otra realización preferida del biorreactor de la invención, donde la cámara de cultivo (1) está hecha de un material seleccionado de la lista que consiste en: metacrilato de polimetilo (PMMA), acero inoxidable, titanio, cristal de zafiro, platino, y cristal.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un sistema para la generación de un tejido biológico, de ahora en adelante sistema de la invención que comprende el biorreactor de la invención y comprende además una estructura (5) situada en la cámara de cultivo (1) de células, sobre la que se dispone la fuente celular.

En una realización preferida del sistema de la invención, la estructura (5) está hecha de un polímero seleccionado de la lista que consiste en: poliuretano termoplástico 1,4-butanodiol (bTPUe), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PLC) y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

5

En otra realización preferida del sistema de la invención, la estructura (5) está conformada por fibras con un diámetro de entre 50 μm y 400 μm .

10

En otra realización preferida del sistema de la invención, la superficie de la estructura (5) está funcionalizada con péptidos Arg-Gly-Asp (RGD), con PBA, ácido acético 1-pireno (PCA) con fibronectina o con colágeno.

15

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un programa de ordenador, de ahora en adelante "programa de la invención", para la determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico configurado para llevar a cabo las etapas del método de determinación de la invención, y para optimización de producción de tejido configurado para llevar a cabo las etapas del método de optimización de la invención haciendo uso del sistema de la invención.

20

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una unidad de almacenamiento configurada para almacenar el programa de ordenador de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

30

35

Figura 1. Muestra los elementos del biorreactor (BR) de acuerdo con una realización preferente de la invención. A) Vista del biorreactor. B) Vista de la cámara de cultivo del biorreactor (1), entrada (6) y salida (7) del sistema fluido. C) Vista de la cámara de cultivo (1) con la salida del sistema de flujo (7). D) Concepto visual del transductor con el sistema de acoplamiento. E) Diagrama que muestra los diferentes elementos del biorreactor: cámara de cultivo (1), transductor en transmisión (2) dispuesto enfrente al transductor

en recepción (3), circuito fluido (4) destinado a pasar a través de la estructura (5) que alberga la fuente celular, entrada del circuito fluido (6), salida del sistema fluido (7), bomba peristáltica (8), generador de señales (9), amplificador (10), osciloscopio (11), Raspberry PI (12), placa de Arduino (13), y recipiente (14) destinado a almacenar el medio de cultivo y conectado a la bomba peristáltica (8).

Figura 2. Disposición final del biorreactor (BR) y parámetros globales. (A) Fotografía del montaje final del BR (1) dentro de una campana laminar, bomba peristáltica (8). (B) Fotografía del circuito Arduino (13) que controla la bomba peristáltica, Raspberry (12). (C) Grabador de señales de salida por Raspberry PI. En rojo se representa la estructura funcionalizada con células sembradas, y en negro, la misma estructura sin células. (D) Amplitud de presión del transductor excitante de onda P vs amplitud de voltaje. (E) Resultados de la calibración del caudal, caudal vs amplitud de voltaje de la bomba peristáltica. (F) Modelo fluidodinámico 2D en MEF para evaluar la velocidad de flujo de incidencia (a y c) sobre fibras de la estructura y sus correspondientes esfuerzos de cizallamiento (b y d) dependiendo del caudal. Dos caudales están representados $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Figura 3. Modelo MEF de fenómenos de propagación de ondas P. (A) Representación 2D de los diferentes elementos del biorreactor: cámara de cultivo (1), transductor en transmisión (2) dispuesto enfrente al transductor en recepción (3), circuito fluido (4) destinado a pasar a través de la estructura (5) que alberga la fuente celular, entrada del sistema fluido (6), salida del sistema fluido (7). (B) Imagen térmica del componente "u" del desplazamiento del transductor de ultrasonido transmisor, (es decir, componente X) a $t = 0,5 \mu\text{s}$ (a) y $t = 1 \mu\text{s}$ (b). (C) propagación de la onda P en diferentes momentos: (a) $t = 0,5 \mu\text{s}$, (b) $t = 1 \mu\text{s}$, (c) $t = 15 \mu\text{s}$, (d) $t = 18 \mu\text{s}$, (e) $t = 34 \mu\text{s}$, y (f) $t = 50 \mu\text{s}$. (D) Imagen térmica del componente "u" (es decir, componente X) del desplazamiento del transductor de ultrasonido receptor en $t = 35 \mu\text{s}$ (a) y $t = 40 \mu\text{s}$. (b). (E) Señal final de modelado eléctrico obtenida del modelo MEF.

Figura 4. (A) Ensayo Alamar Blue para detectar la actividad metabólica en las estructuras de bTPUe funcionalizados con PBA después de sembrar IPFP-MSC con diferentes caudales y control. Los valores se normalizaron con respecto al día 1. (B) Cuantificación del ADN en el día 7 de experimentación de control y biorreactor (BR) $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. (C) Cuantificación general de colágeno con ensayo Sirius Red de muestra control y muestra BR ($0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). (D) Cuantificación de colágeno tipo II utilizando el kit Elisa tanto para

muestras control como BR ($0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). (E) Las imágenes SEM en el día 7 de ambas estructuras, control sin células y Br con células, las barras de escala se expresan en micras. (* significa valor $p < 0,001$; cont. = flujo de perfusión continuo, disct. = flujo de perfusión discreto). (F) Imágenes de contraste mejorado de una región de interés (ROI) de ambas condiciones. (G) Perfil de densidad espectral de potencia (PSD) del promedio de tres muestras. (H) Valores de el gradiente cuadrático medio de la raíz (Sq_d) y la relación interfacial desarrollada (S_{dr}) que fundan una diferencia estadística ($p < 0,001$) entre las muestras de control y la condición BR.

Figura 5. Imágenes de inmunofluorescencia. Imágenes sin anticuerpo primario (es decir, negativo) de la muestra de control (A) y la muestra del biorreactor $\rightarrow$ BR (B). (C) Muestras de control y muestras BR (D) con anticuerpo primario de colágeno tipo II + 2nd Ab, un y anticuerpo agrecano primario + 2nd Ab. Cell Tracker™ verde se representa en verde. El Ab secundario (Alexa 647 nm) se muestra en rojo. En azul se representa el marcador DAPI.

Figura 6. (A) Señales arbitrarias de onda P obtenidas de las estructuras con células durante la experimentación en el biorreactor BR. (B) Señales arbitrarias de onda P obtenidas de las estructuras en blanco (sin células) durante la experimentación BR. (C) Curva de evolución de amplitud de señales de amplitud media. (D) Curvas de tiempo de vuelo (ToF). (E) Imágenes térmicas 2D del modelo de esfuerzo cortante del fluido (CFD) utilizando diferentes diámetros de fibra de la estructura. (F) Velocidad de flujo de salida del BR frente al diámetro de la fibra de la estructura (FD) en negro; y la velocidad instantánea del punto medio ($X = 0$, $Y = 0$) dentro del dominio de la estructura. (G) Evolución de la densidad a lo largo del tiempo del contenido de células BR en muestras de estructuras con células y estructuras en blanco (sin células) obtenidos por señales empíricas de correlación cruzada con señales sintéticas. (H) Velocidad del sonido del dominio de la estructura (cSD) (estructura + agua) obtenido por correlación cruzada. (*: valor $p < 0,001$).

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

El biorreactor de la invención, en comparación con cultivos estáticos, mejora la condrogénesis a través de tensiones de bajo cizallamiento mediante la perfusión de un fluido. El biorreactor impulsa el crecimiento de las células madre sembradas en

estructuras de bTPUe funcionalizadas con PBA e induce una mayor producción de MEC con un alto contenido de colágeno tipo II.

5 El uso de microscopía SEM (microscopía electrónica de barrido, del inglés “scanning electron microscopy”) e imágenes confocales proporcionan evidencia de que las estructuras con células estimuladas por el biorreactor aumentaron tanto la presencia celular como la matriz extracelular (MEC) del tejido biológico producido, cartílago (CA).

10 Se realizó un modelo computacional de elementos finitos MEF para evaluar y comprender el efecto efectivo de una onda de presión ejercida por ultrasonidos en el cultivo. Para ello, se obtuvo un conjunto de señales sintéticas a través del problema inverso, donde se barrieron diferentes parámetros del modelo.

15 El uso de un MEF para analizar la dinámica de fluidos revela la necesidad no solo de regular el caudal inicial, sino también de modificarlo con el tiempo para acomodar el crecimiento del tejido.

20 En la invención también se propone un método que hace uso del biorreactor de la invención en conjunto con el MEF y que permite rastrear de forma independiente el aumento de la densidad del tejido a lo largo del tiempo y determinar la velocidad del sonido en el tejido utilizando una caracterización inversa de problemas a través del modelo MEF. Es decir, a partir de diferentes soluciones, se obtienen los parámetros iniciales desconocidos del problema a tratar. Como resultado del hecho de que ambas métricas están estrechamente asociadas a un aumento en la rigidez del material y el contenido de colágeno, permite inferir que el método de la invención es capaz de
25 monitorear el crecimiento del tejido a lo largo del tiempo.

30 Así, el biorreactor de la invención y el método asociado tienen la capacidad de inducir la producción de tejido biológico mediante estructuras que albergan una fuente celular, así como la capacidad de medir el crecimiento y maduración del tejido en tiempo real.

35 El biorreactor comprende una cámara de cultivo (1) destinada a albergar una estructura (5) tridimensional, cuya geometría, en este caso, es un anillo central de 24 mm de diámetro y una longitud total de 45 mm, de los cuales 5 mm corresponden al tamaño de la estructura (5) y el resto se corresponden a distancias de descanso, 20 mm por cada lado, para evitar el efecto de campo cercano de la señal de ultrasonido. La estructura

(5) tridimensional está destinada a promover el cultivo de células, por lo que se introduce una fuente celular de células madre mesenquimales (MSC) de la almohadilla adiposa infrapatelar (IPFP-MSC).

5 El biorreactor también comprende una entrada (6) y una salida (7). En este caso, la entrada (6) y la salida (7) son cilindros hechos con varillas de polímero termoplástico altamente transparente (PMMA) de 30 mm de diámetro y 40 mm de longitud que se perforan para formar canales de fluido (Figura 1). La longitud de los cilindros permite la presencia de un flujo laminar completamente desarrollado. Cuando un fluido entra en
10 una tubería, la longitud mínima para generar un flujo laminar completamente desarrollado debe cumplir: $\frac{L}{D} = 4.4Re^{1/6}$. El fluido usado en este caso es un medio de cultivo [medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)] rico en glucosa, 10% de suero fetal bovino (FBS) que es newtoniano ($\rho = 1009 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$; $\mu = 0.93 \text{ mPa} \cdot \text{s}$) con $Re = 4.6$. Por lo tanto, L para cumplir con las condiciones anteriores es de 22.7mm.

15

Los cilindros de entrada (6) y salida (7) presentan una longitud de 35 mm, superior a la mínima necesaria. Por otro lado, la longitud del campo cercano es (N): $N = \frac{D^2 f}{4c} = 15,4 \text{ mm}$, con la velocidad del sonido longitudinal del PMMA igual a $c = 2730 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

20 El biorreactor además comprende un transductor de transmisión (2) y un transductor de recepción (3) de ondas ultrasónicas. El transductor de transmisión (2) se puede acoplar mediante un cilindro hueco con un anillo de restricción y una almohadilla de bTPUe que ejerce presión para adquirir una señal precisa (Figura 1D).

25 La Figura 1E representa esquemáticamente el conjunto electrónico del biorreactor (BR). El osciloscopio MSO6054A ha sido programado para capturar cada señal entre 30 μs y 50 μs ; dicho período de tiempo se estableció manualmente la primera vez que se mostró el tiempo de vuelo (TOF) de las señales de la estructura (5) (aproximadamente 35 μs). El intervalo de captura de la señal se estableció en 5 minutos para ahorrar memoria y
30 permitir suficiente tiempo para la transferencia de señales entre el osciloscopio (11) y la Raspberry (12) y las señales de captura fueron el promedio de 200 señales medidas con resolución de 8 bits. Además, para garantizar una buena comunicación entre Arduino, el microcontrolador que regula la bomba (8) (programado en C++), y la Raspberry Pi (12), que era la unidad informática aplicada (Python), se aplicó una librería
35 parser (ParserLib de LuisLlamas).

Las figuras 2A y 2B muestran todo el conjunto del biorreactor junto con un circuito electrónico que regula la bomba peristáltica (8). Todos los componentes deben ser previamente esterilizados con Biozidal ZF y etanol al 70%, seguido de luz UV encendida dentro de la campana laminar. Después, el biorreactor se acopla y comienza a funcionar con flujos no superiores a 0.5 mLmin^{-1} para garantizar que no haya daño celular.

Las figuras 2C a 2E representan parámetros experimentales obtenidos del biorreactor. La figura 2C muestra dos señales de ultrasonido arbitrarias registradas en la Raspberry (12), una señal representa la estructura (5) con células para su cultivo, mientras que la otra es una señal de control, es decir, la estructura sin células. La amplitud de la señal con células es casi el doble que la señal de control y los rebotes más cercanos a la señal principal (aprox. 40-45 μs) están más atenuados en la señal con células.

La figura 2D representa la presión incidente ejercida por las ondas producidas por el transductor de transmisión (2). En este caso, aunque el generador de ondas tenía una amplitud de salida límite de 20 V, para verificar la respuesta lineal de la presión ejercida con respecto al voltaje de excitación de entrada, se muestra una curva de 0 a 50 V. La presión obtenida se extrajo a través de la fórmula de calibración hidrófona de onda de la hoja de datos del fabricante: $P = 0.35 V_m / 10^{-\frac{254}{20} + 6}$, aplicando una regresión lineal con $R^2 = 0.99$ con $P = 72.6 \cdot V_m + 43.8$. Para los procedimientos de experimentación, se seleccionó una tensión de excitación $V_{pp} = 20 \text{ V}$ donde se obtuvo una presión acústica de 1509 Pa. En cuanto al caudal, se estableció un protocolo de pesaje, donde la tensión varió de 5V, tensión mínima de funcionamiento de la bomba (8), a 24V, tensión operativa máxima, en pasos de 0,5V. Los resultados extraídos expresan que para obtener caudales inferiores a $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sólo era necesario aplicar 12V. De este modo, con tales resultados y para aumentar la resolución de control, teniendo en cuenta que el Arduino tiene una resolución de 8 bits para salidas moduladas de potencia (PWM), la fuente de alimentación a la bomba (8) se limita a 12V.

En las figuras 2Fa a 2Fd se muestra un modelo microfluídico a través de las fibras de la estructura (5) con dos flujos diferentes. La estructura (5) se representa como una matriz de círculos, donde cada círculo tiene un diámetro de 200 μm y se separan entre ellos 600 μm debido al patrón de capa de impresión. El tamaño del elemento de malla se adaptó a 100 μm debido a que es $\frac{1}{2}$ del diámetro de la fibra. La densidad media celular

($\rho = 1,009 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) y la viscosidad dinámica ($\mu = 0,93 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) conocen del estado de la técnica. El número de Reynolds se calcula como:

$$Re = \frac{\rho u D_h}{\mu} = 4.6 \ll 2300$$

5 donde u es la velocidad del flujo de entrada, siendo $u = 106.1 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; y $u = 66.31 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, y D_h es la altura del diámetro de entrada, que era de 4 mm. El Re obtenido es menor 2300, que se considera el límite superior para los flujos laminares, mientras que los flujos turbulentos se desarrollan cuando el número Re excede 2900.

10 De acuerdo con los resultados del modelo, se puede traducir el caudal obtenido por pesaje a velocidades de flujo reales incidentes sobre celdas: a) 0.5 mLmin^{-1} corresponde a flujos inferiores a $800 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ y b) 0.8 mLmin^{-1} corresponde a velocidades de flujo inferiores a $1000 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Es de notar que, aunque la velocidad de flujo es mayor entre las fibras, cerca de la superficie de la fibra (es decir, la ubicación de
15 la célula), la velocidad de flujo disminuye por debajo de la mitad del valor máximo (Figura 2F). Del modelo se pueden extraer los ratios máximos de cizallamiento, que son 10 mPa a 0.5 mLmin^{-1} y 16 mPa a 0.5 mLmin^{-1} .

Además, como parte de la presente invención se ha desarrollado un modelo 2D
20 complejo aplicando un MEF multifísicos para comprender el comportamiento mecánico del sistema de ultrasonido del biorreactor. La Figura 3 muestra la representación del modelo y la física detrás de su comportamiento. La Figura 3A representa la visualización del plano XY de la geometría, donde el plano modelado corresponde a una sección transversal en el centro del biorreactor. Este plano fue seleccionado en ambos modelos
25 (propagación de onda P y modelo dinámico fluídico) porque no hay simetría axial para los canales de flujo.

Para validar el modelo desarrollado, el biorreactor se ensambló sin ninguna estructura en su interior, lleno de agua y con un disco sólido de ácido poliláctico (PLA). En la
30 literatura previa se han obtenido tanto la densidad como la velocidad del sonido. La velocidad del sonido del PMMA se calculó empíricamente a $2630 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Se obtuvo una correlación, comparando señales sintéticas con experimentales, superior al 80%.

La señal se originó en el transductor de transmisión (2) como una onda (P) mecánica.
35 La Figura 3B muestra el desplazamiento mecánico en la dirección X, mientras que el

desplazamiento en Y fue insignificante. El desplazamiento total va desde $-25 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}$ (3B.a), a $t=T_0/2$, hasta $25 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}$ (3B.b), a $t=T_0$. Después de eso, la onda P se propaga a través del módulo de presión acústica (Figura 3C), donde las variables dependientes fueron densidades de material (ρ) y velocidades de sonido del material (c_s): $\frac{1}{\rho c^2} \frac{\partial^2 p_t}{\partial t^2} +$

5 $\nabla \cdot \left(-\frac{1}{\rho} (\nabla p_t - q_d) \right) = Q_m$, donde Q_m es la fuente de dominio de monopolo, q_d la fuente de dominio de dipolo, y $p_t = p + p_b$ con p_b siendo el campo de presión de fondo. Se ha de tener en cuenta que la impedancia interior es una condición límite que depende de ρ y c_s . Por lo tanto, la atenuación de la señal dependerá de la densidad y la velocidad del sonido del dominio de la estructura (5). Por tanto, para los límites externos que

10 representan las paredes del biorreactor $-n \cdot \left(-\frac{1}{\rho} (\nabla p_t - q_d) \right) = 0$.

En la Figura 3C-a, que corresponde a $T_0/2$, la onda P está parcialmente desarrollada; en 3C-b está completamente desarrollada y muestra que la onda P contacta con el dominio de la estructura (5) en $t=15 \mu\text{s}$ (3C-c); en $t=18 \mu\text{s}$ (3C.d) está en el centro del

15 dominio de la estructura (5), lo que implica que la onda principal viaja a través del dominio de la estructura (5) en $6 \mu\text{s}$ aproximadamente. A continuación, a los $34 \mu\text{s}$ la onda principal llega al transductor receptor (3C-e) y a $t=50 \mu\text{s}$ sólo hay rebotes obtenidos de diferentes condiciones de contorno (3C-f).

20 Como se hizo en el transductor transmisor (2), la Figura 3D muestra el desplazamiento en la dirección X de la onda P mecánica sobre los dominios del transductor receptor. Se observa que a $t=35 \mu\text{s}$ la onda P está completamente desarrollada y a $t=40 \mu\text{s}$ se transmiten rebotes de onda. Finalmente, la Figura 3E representa una onda de ultrasonido obtenida por el modelo propuesto como un potencial flotante del transductor

25 receptor.

Se eligió un modelo 2D porque reduce el tiempo computacional, los requisitos de memoria y la complejidad de la representación. Todos los parámetros anteriores son esenciales para calcular estudios de problemas inversos donde se realizan barridos

30 paramétricos. Al contrario que en el modelo anterior, que describe el flujo microfluídico, en este modelo no se ha modelado la porosidad debido a que la longitud de onda de la onda (P) de ultrasonido a través del dominio de la estructura (5) es mucho mayor que el tamaño de poro: $\lambda_{SD} = c_{SD}/f_0$, $c_{SD} > 1480 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, $f_0 = 1 \text{ MHz}$, $\lambda_{SD} > 1.48 \text{ mm}$ y $PS < 400 \mu\text{m}$, siendo SD el dominio de la estructura (5) y PS el tamaño de poro. El tamaño

del elemento de malla se seleccionó mediante barrido de parámetros para verificar la convergencia del modelo. Así, se estableció que un tamaño de elemento inferior a 400 μm era suficiente para adquirir una señal estable. En la figura complementaria 3G-3J no se aprecia variación significativa sobre amplitudes en tamaños de malla inferiores a 400 μm . El resto de parámetros (*i. e.* c_{PMMA} , c_{H_2O} , ρ_{PMMA} , ρ_{H_2O}) se reconstruyeron mediante problema inverso.

El reactivo Alamar Blue se utilizó para detectar la actividad metabólica en la estructura (5) de bTPUe funcionalizada con PBA después de sembrar células IPFP-MSC. Con el fin de evaluar la proliferación celular y la viabilidad; se realizaron diferentes regímenes de flujo y caudales (Figura 4A).

Las células IPFP-MSC se aislaron y crecieron desde pacientes con OA hasta pase 3 – 5. Las células IPFP-MSC se identificaron utilizando los estándares recomendados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). A continuación, se sembraron 10^6 células $\cdot \text{Ml}^{-1}$ sobre estructuras y se incubaron durante 4 h a 37°C antes de recibir nuevos medios [(DMEM Glutamax, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina (P/S)]. Las estructuras con células se cultivaron durante 1 semana en una placa de 6 pocillos para garantizar una integración adecuada entre las células y las estructuras. Después, las estructuras se introdujeron dentro del biorreactor durante otra semana, mientras que otras estructuras de control cargadas con células se mantuvieron en la placa de pocillos esa semana. Se rastreó la actividad metabólica de todas las estructuras en los días 1,3 y 7 del tiempo experimental.

Los resultados obtenidos indicaron una respuesta diferente en el metabolismo celular en función de las tasas de flujo (Figura 4A). Siguiendo las recomendaciones de la literatura se probó un flujo continuo de $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ con resultados negativos. A continuación, se aplicó una forma discreta (1 h cada 6 h) de caudal previo para reducir el estrés de exposición sobre las células, una vez más se obtuvieron resultados negativos con una reducción dramática del metabolismo celular en el día 3. Por otro lado, una vez que se aumentó el caudal a $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ el metabolismo aumentó de manera similar con respecto a las estructuras de control. De hecho, en el día 7 en el biorreactor con $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ el metabolismo continuó su crecimiento en comparación con el resto de las condiciones, alcanzando casi el doble de tasa que el día 1. Como consecuencia, los siguientes experimentos se realizaron solo con un caudal de $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Además, se llevó a cabo la cuantificación del ADN tanto para las estructuras del biorreactor como para los controles para ver si los cambios apreciados en la actividad metabólica se asociaban con diferencias en la densidad celular. Los resultados presentados en la Figura 4B muestran una clara diferencia entre las muestras del biorreactor y las de control respecto a la cantidad de ADN, con un aumento significativo en las estructuras del biorreactor ($p < 0,001$). En relación con la síntesis de MEC, se ejerció tanto la cuantificación general de colágeno basada en el colorante Sirius Red) como la cuantificación de colágeno tipo II. En la Figura 4C se observan resultados similares con respecto al contenido de colágeno, una presencia de colágeno mucho mayor en muestras del bioreactor ($p < 0,001$). Por otro lado, se obtuvo una concentración de colágeno tipo II mucho mayor (Figura 4D) en las muestras del biorreactor en comparación con la de control (valor $p < 0,001$).

Para verificar el aumento de la cantidad de MEC en estructuras 3D incluidas en el biorreactor, se aplicaron técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) e inmunofluorescencia. En los resultados del SEM (Figura 4E), se observaron dos hechos particulares: i) las fibras de la estructura (5) en ambas muestras (estructura de control y estructura del biorreactor) estaban cubiertas por células; pero, mientras que en la estructura (5) de control había espacios vacíos entre las células, en las muestras incubadas en el biorreactor las fibras de la estructura estaban completamente cubiertas tanto por células como por MEC, asimismo, se puede apreciar la presencia de fibras más gruesas. ii) Con respecto a la morfología celular, las muestras de control presentaron una forma de las células IPFP-MSC diferente de las muestras del biorreactor donde las células mostraron una forma más circular. Sin embargo, en ambos casos, se demostró la viabilidad celular y la adecuada interacción célula-biomaterial.

Además de las imágenes de microscopía SEM, se aplicó microscopía de fuerza atómica (AFM) para caracterizar la rugosidad de la superficie de las fibras de la estructura (5) entre las células. En la Figura 4F se pueden observar imágenes de contraste mejorado de una región de interés (ROI) de ambas condiciones. Los resultados expresan un aumento observable de la rugosidad en términos de cantidad y tamaño de grano en las estructuras del biorreactor con respecto a las muestras de control. Aún más, la presencia de algunas fibrillas (colágeno) se manifiesta en los casos en los que se ha usado el biorreactor. Para cuantificar el grado de intercambio en rugosidad, se calculó el perfil de densidad espectral de potencia (PSD) del promedio entre tres muestras en la Figura 4G.

Las curvas muestran una mayor potencia de señal en las muestras del biorreactor que en las de control, lo que implica la presencia de estructuras más altas unidas a la superficie de la estructura, como se observó anteriormente en la Figura 4F. Finalmente, también se calcularon parámetros típicos de rugosidad como el gradiente cuadrático medio de la raíz (S_{qd}) y la relación interfacial desarrollada (S_{dr}) que fundan una diferencia estadística ($p < 0,001$) entre las muestras de control y la las del biorreactor, lo que implica que la rugosidad de la estructura aumentó con el flujo de perfusión ejercido (Figura 4H).

Para las imágenes de inmunofluorescencia, las Figuras 5A y 5B corresponden a imágenes con ausencia de anticuerpo primario (negativo) para verificar si el anticuerpo secundario presentaba interacciones no correspondientes. Para evitar la autofluorescencia de la estructura (5), se seleccionó Alexa Deep Red como anticuerpo secundario, por lo tanto, cada proteína de la MEC se representó por separado (Figura 5C y 5D). Los resultados expresaron claramente una presencia abundante de todas las proteínas de MEC del CA comunes y una alta viabilidad celular en las muestras del biorreactor: colágeno tipo I, colágeno tipo II y agregano. Las estructuras del biorreactor presentaron una expresión mucho mayor de colágeno tipo II y agregano, con pocas cantidades de colágeno tipo I. En contraste, las estructuras de control presentaron una cantidad mucho menor de contenido celular, sin presencia de proteínas agreganas y un contenido mucho mayor de colágeno tipo I. En conclusión, a partir de ensayos de cuantificación, de microscopía SEM e inmunofluorescencia, demostró el potencial de inducción condrogénica del biorreactor sobre células IPFP-MSCs.

Dado que los ultrasonidos son un valioso método de caracterización no invasivo, en esta investigación se emplearon ultrasonidos de pulso bajo (LIPUS; 1 MHz) para estudiar la evolución mecánica del tejido biofabricado a lo largo de una semana dentro del biorreactor. Para eliminar cualquier información del fondo, se han analizado también estructuras libres de células (en blanco) con ultrasonidos y respondiendo a las mismas condiciones que la experimentación ex vivo. En las Figuras 6A y 6B, se muestran señales arbitrarias de cada día experimental para estructuras sembradas con células y en blanco (sin células), respectivamente. En ambos casos, se observó una disminución del voltaje V_p después de 24 h de tratamiento con un retardo de señal. La presencia de este fenómeno en ambas condiciones implica un comportamiento no dependiente de células. Por otro lado, se puede observar cómo V_p aumentó del día 2 al día 7 en las

estructuras cargadas con células (de 1,3 V a 2,1 V), mientras que en estructuras en blanco no se mostró una variación sustancial (0,04 V a 0,043 V).

La figura 6C representa la evolución de las amplitudes de la señal a lo largo del tiempo.

5 En las estructuras en blanco, no se observó diferencia de significación a lo largo de una semana de experimentación. Aunque, la disminución de la amplitud del día 1 al día 3 se observó en ambos casos, sólo en las estructuras cargadas de células hubo un aumento apreciable de la amplitud. Otra consideración importante, que también se puede observar en las figuras anteriores 6A, 6B y 6C es la diferencia significativa del valor de
10 amplitud en todos los días ($p < 0,001$). La misma diferencia fue evidente con respecto a la señal de tiempo de vuelo (ToF) calculada (Figura 6D), donde las señales de estructuras en blanco fueron ligeramente más lentas que en las de carga celular ($p < 0,001$). En resumen, los resultados observados en las figuras 6C y 6D implican que las señales de ultrasonido recibidas expresan diferencias considerables cuando las células
15 se sembraron en las estructuras.

Los datos brutos registrados no ejercen una predicción completa de la tasa de síntesis de MEC. Como se explicó anteriormente, se desarrollaron modelos computacionales para describir tanto la dinámica de fluidos como los fenómenos de propagación de la
20 onda (P). Gracias a estos modelos, se puede estimar cómo el fluido podría afectar a las células si las fibras de la estructura (5) se hacen más grandes con el tiempo. La idea detrás del argumento anterior se expresa en la Figura 6E, donde se proponen tres diámetros de fibra diferentes: diámetro inicial de fibra de 200 μm , un intermedio de 250 μm y un diámetro final estimado de 300 μm (que es aproximadamente el obtenido de
25 las imágenes de microscopía SEM). Se confirma que las tensiones de cizallamiento ($\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y}$, con μ siendo la viscosidad dinámica fluida) aumentarán de forma directamente proporcional al diámetro de la fibra, en particular, hay de un rango de 4-7 mPa inicial a un final de 8-10 mPa. Pero más importante es la presencia de altas tensiones de cizallamiento en la dirección ortogonal del flujo de fluido una vez que el diámetro de la
30 fibra supera 250 μm .

La Figura 6F muestra la velocidad del flujo de salida del biorreactor, que es muy similar a la Figura 6E en que una sonda de contorno registró datos como la velocidad de flujo instantánea (en el punto de origen axial) y la magnitud de velocidad del flujo de salida.

35 Las magnitudes anteriores se compararon con un aumento estimado en los diámetros

de fibra de la estructura (FD). Se muestra que ambas magnitudes están conectadas entre sí y exhiben patrones distintos. La velocidad de salida disminuyó prácticamente linealmente para diámetros de fibra de 360 μm , aunque la velocidad inmediata aumentó de 200 a 320 μm . Para diámetros de fibra mayores que 320 μm , la velocidad del flujo de salida comenzó a disminuir ligeramente, pero a diámetros de fibra de 360 μm , hubo una fuerte caída seguida de un cambio de tendencia. Esta observación implica que cuando el diámetro de fibra excede los 340 μm , la permeabilidad de la estructura disminuye, y el canal fluido no puede cruzar la estructura, sino que pasa alrededor de sus paredes.

Más interesante es el caso del modelo de ultrasonidos y el modelo de propagación de ondas (P), donde se debe considerar el comportamiento mecánico de tres materiales diferentes (PMMA, agua y bTPUe). Por lo tanto, la señal eléctrica final que representa el pulso ultrasónico envuelve todos esos parámetros, lo que hace que sea una tarea muy compleja extraer información. Una vez más, el modelo informático se centró en los parámetros reestructivos que tenían más variabilidad a lo largo del tiempo. De este modo, para la propagación de la onda (P) se puede resaltar la ecuación de la velocidad

de propagación de onda longitudinal: $c_p = \sqrt{\frac{E(1-\nu)}{\rho(1+\nu)(1-2\nu)}} \rightarrow c_p = \sqrt{\frac{K}{\rho}}$. La ecuación anterior estima que la señal final obtenida por los transductores receptores dependerá principalmente de la velocidad del sonido en la estructura y su densidad.

Con esto en mente, se creó sintéticamente un conjunto de señales que variaban la velocidad de sonido en el dominio de la estructura (c_{SD}) de 1300 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a 1600 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ y la densidad del dominio de la estructura (ρ_{SD}) de 1000 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ a 1400 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Después, señales empíricas obtenidas de experimentos ex vivo en el biorreactor se compararon con dicho conjunto de señales. Seguidamente, cada señal empírica se correlacionó de forma cruzada, $(f \star g)(x) \stackrel{\text{def}}{=} \sum_j f_j^* g_{i+j}$, con cada señal sintética generada con el modelo computacional. Cada señal sintética se etiquetó con su correspondiente densidad ρ_{SD} y c_{SD} , entonces, se estimó que la correlación cruzada máxima (y siempre > 80%) eran los valores más aceptables de densidad y velocidad del sonido.

En las figuras 6G y 6H se muestran los parámetros extraídos (ρ_{SD} y c_{SD}). La figura 6G indica dos evidencias: i) no se observó variación significativa de densidad en estructuras en blanco; ii) hubo un aumento en las densidades en el dominio de la estructura a lo largo del tiempo en estructuras sembradas con células. Una curva no promediada se calculó en estructuras sembradas de células para mostrar la capacidad de registrar

diferentes patrones de crecimiento. Por otro lado, la Figura 6H muestra las velocidades de sonido tanto de las estructuras sembradas de células como de estructuras en blanco. Los valores promedio se representan debido a una variación mucho menor ($SD < 1\%$) de este parámetro en comparación con la densidad. La figura muestra nuevamente una diferencia significativa entre las estructuras en blanco y las que contienen células ($p < 0,001$), siendo mayor la velocidad del sonido (c_{SD}) de las estructuras cargadas con células. Es importante considerar que los valores $c_{TPU} = 1740 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ y $c_{H_2O} = 1480 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ de la literatura están bastante cerca de lo obtenido en esta experimentación y modelo. Además, la relación porosa de las estructuras impresas fue de 0.3, siendo $c_{SD} = 0.3 \cdot c_{TPU} + 0.7 \cdot c_{H_2O} = 1558 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. De esto se puede deducir que los resultados obtenidos del modelo son altamente precisos, y que una mayor velocidad de sonido implica menos contenido de agua en el dominio de la estructura.

En el modelo presentado se muestran no solo las magnitudes de caudales sino también las tensiones de cizallamiento ejercidas, obtenidas gracias a los resultados de microscopía MEF (Figura 2F). Además, se modeló mediante dinámica de fluidos bifásica el llenado del biorreactor donde no aparecen turbulencias significativas. Las representaciones planas permiten identificar las regiones de mayores tensiones, lo que implica que no todas las zonas de la estructura (5) sufrirán el mismo régimen de cargas. Es una región pequeña cerca de las esquinas de los canales de entrada (6) y salida (7) la que tiene tensiones más altas, mientras que el resto de la estructura (5) sufre una estimulación más pequeña. Como resultado, no se puede asumir la presencia de estimulación homogénea (es decir, isotrópica) en toda la estructura (5) del biorreactor, como se considera en el estado del arte.

Además, el análisis MEF también mejora la comprensión global por su posibilidad de simular evoluciones. En la Figura 6E se asumió una hipótesis de aumento del diámetro de la fibra a lo largo del tiempo; viendo los gráficos, es evidente extraer que las tensiones de cizallamiento aumentan con el diámetro de las fibras de la estructura (5) (de 6 mPa a 10 mPa).

Es importante controlar con precisión la evolución de esas tensiones de cizallamiento porque pueden causar daños celulares. Por otro lado, si no se ejerce suficiente flujo de perfusión, el riesgo de un transporte deficiente de nutrientes garantizará la muerte celular como posiblemente sucede con las tasas de flujo de $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (ver Figura 4A).

Extrapolando estas observaciones y comparándolas con la simulación obtenida en la Figura 6F, se puede concluir que a medida que aumenta el diámetro de fibra el flujo a través de la estructura (5) (tejido) disminuye el flujo y, como consecuencia, disminuye la ingesta nutricional. Esta consideración está en concordancia con los resultados obtenidos por el modelo de correlación cruzada de las ondas (P) experimentales, donde se observó un límite de densidad (ρ).

En relación con los ensayos biológicos, donde se analizó el metabolismo de las estructuras dentro del biorreactor junto con su potencial condrogénico para generar estructuras similares al cartílago, se puede extraer las siguientes afirmaciones. Una vez optimizado el caudal de entrada, es decir, el flujo continuo de $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, se observó cómo el metabolismo celular aumentaba en las estructuras con células antes que en las estructuras de control, alcanzando casi el 200% de crecimiento. Igualmente, en las estructuras de control se produjo una reducción del metabolismo celular del día 3 al día 5.

El metabolismo celular está altamente determinado por el transporte de nutrientes y por los flujos de perfusión, mejorando la ingesta de metabolitos y promoviendo un aumento del metabolismo. Así, los resultados muestran que el metabolismo celular aumentó, pero también el contenido celular fue significativamente mucho mayor, lo que indica que las células se expandieron bajo el protocolo de estimulación del biorreactor. Aún más, el ensayo general de cuantificación de colágeno junto con los valores de colágeno tipo II obtenidos demuestran el potencial condrogénico de la estructura del biorreactor. Se observa, por tanto, que hay presencia de colágenos y una mayor producción de colágeno tipo II. Estos resultados indican que el biorreactor de la invención mejora drásticamente el potencial condrogénico de las estructuras cargadas con células.

Las técnicas de imagen (microscopía SEM e inmunofluorescencia) corroboraron la presencia de células adheridas a las fibras de la estructura tanto en las muestras en blanco (control) como en las del biorreactor. En las muestras de control se pudo distinguir cómo las MSC conservaron su morfología alargada y plana y también se observó la presencia de algunas células circundantes de MEC. En contraste, en las muestras del biorreactor, la morfología de las MSC se perdió, presentando una forma más redonda incrustada en una matriz con algo de cilio que es típica de la morfología similar a los condrocitos. Además, la MEC presente en las muestras del biorreactor fue considerablemente mayor en comparación con las muestras de control y las fibras de la

estructura parecen estar completamente cubiertos por dicha matriz. Los resultados obtenidos por microscopía SEM fueron confirmados por análisis de microscopía AFM, mostrando que se obtuvo una mayor rugosidad en las muestras del biorreactor y se encontró la presencia de MEC similar a la del CA junto con fibras más gruesas, que son un marcador de CA saludable.

Finalmente, se realizó inmunofluorescencia para detectar proteínas de la MEC condrogénicas típicas. Se observó la presencia tanto de colágeno tipo I, colágeno tipo II y agregano en muestras del biorreactor y de control. Para los controles se observaron cantidades mucho menores para el colágeno tipo II y el agregano y se detectó un aumento de la expresión del colágeno tipo I. En contraste, las muestras del biorreactor mostraron niveles más altos de células viables unidas a las fibras, una menor expresión de colágeno tipo I y mayores cantidades de colágeno tipo II y agregano, lo que implica condrogénesis.

Aún más, las imágenes de inmunofluorescencia mostraron cómo estas proteínas se distribuyeron entre las células a lo largo de las fibras de la estructura del biorreactor, mientras que en las muestras de control se concentran en el entrelazado de fibras. En la literatura previa se encontró cómo las MSC expresan colágeno tipo I y hialuronano, siendo un estado temprano de condensación precartilaginosa la digestión de la matriz de colágeno tipo I y la expresión de N-cadherina, tenascina-C y otras proteínas de adhesión reguladas por las vías de señalización TGF- β , Wnt/ β -catenina y Sox9. Finalmente, la MEC precartilaginosa se convierte en MEC del CA rico en colágeno tipo II y agreganos. Además, la expresión de Sox9 y Col2a1 se correlaciona en la condrogénesis con la síntesis de colágeno tipo II. En este modelo se cuantifica y observa después de la estimulación del biorreactor el aumento de los niveles de expresión de colágeno tipo II y la sobreexpresión de dichos genes.

Todos estos resultados indican que las estructuras funcionalizadas de PBA situadas en la cámara de cultivo (1) del biorreactor mejoran la proliferación celular y la condrogénesis; reduciendo los tiempos de diferenciación en comparación con el estado de la técnica y sin necesidad de un medio condrogénico adicional.

La presente invención también se refiere al desarrollo de un método de análisis del crecimiento y la diferenciación celular en tiempo real. El objetivo es obtener un sistema

autosuficiente que pueda predecir y cuantificar la viabilidad celular del tejido biofabricado antes de ser implantado.

Los sensores in situ están conectados directamente al biorreactor (invasivo), mientras
 5 que los sistemas en línea (at-line) dependen de una muestra que se extrae y evalúa en el exterior. La medición en línea de estos sensores se produce cuando los datos se capturan continuamente y el tiempo de respuesta de la señal del sensor es corto en comparación con la dinámica del proceso. Cualquier otra medición se considera fuera de línea, lo que implica un retraso temporal debido a las actividades biológicas. Aquí,
 10 nos enfocamos en sistemas en línea no invasivos debido a que evitan la contaminación, entre los que se pueden encontrar: quimio-sensores ópticos, sensores espectroscópicos, sensores de espectroscopia de impedancia, sensores ultrasónicos y sensores inalámbricos de flotación libre.

15 El biorreactor de la invención es el primer sistema ex vivo para cuantificar la condrogénesis de la estructura (5) situada en su interior en tiempo real. En este biorreactor se aplica una onda (P) excitatoria mediante transductores de ultrasonido para registrar el pulso emitido tras atravesar la estructura (5). Además, se genera un modelo MEF que predice posibles eventos físicos. En este caso, el dominio de la
 20 estructura (SD) fue considerado como un dominio homogéneo formado por la mezcla de agua y bTPUe (con células adheridas y MEC). Esta aproximación se basa en el vínculo entre el tamaño del elemento FEM a examinar y la longitud de onda de excitación, siendo su relación crucial para derivar información de la onda recibida en el campo de la evaluación no destructiva utilizando ondas ultrasónicas. Cuando la longitud
 25 de onda es mayor que el tamaño del elemento a examinar, se obtienen datos del medio, que se considera homogéneo; sin embargo, cuando la longitud de onda es menor que el tamaño del elemento a caracterizar, los datos mecánicos del elemento en cuestión se reconocen en la onda recibida. La estructura (5) ha sido tratada como un medio homogéneo sin modelarlo porque la longitud de onda de excitación (1,5 mm) es mayor
 30 que el tamaño de los poros (400 μm) o el diámetro de la fibra (200 μm).

En este caso, la interacción de la onda, junto con la suposición de la estructura (5) como medio homogéneo, resulta en la validación de la información de onda obtenida. Por lo tanto, en función de las características mecánicas del material de bioimpresión de la
 35 estructura (5) y de su porcentaje de impresión, así como de las propiedades mecánicas reconstruidas con el modelo de cultivo, se estima la velocidad de la onda para

corresponderse con el tiempo de vuelo (ToF) registrado empíricamente. Esta estimación se puede realizar en la fase de calibrado del sistema conociendo las propiedades físicas del material de la estructura (5), su disipación acústica y su densidad. Por otro lado, en el caso de la estructura (5) que alberga la fuente celular, tras la generación del modelo se puede obtener una base de datos de ondas simuladas con la que se obtiene la velocidad del sonido y densidad. Con la velocidad del sonido obtenida se puede estimar el tiempo de vuelo y se compara con el tiempo de vuelo obtenido empíricamente.

Los resultados extraídos de los ensayos en el biorreactor muestran que la amplitud de las estructuras cargadas con células era mayor que en las estructuras en blanco, lo que implica que la rigidez de las estructuras con células era mayor. Una característica compartida entre las muestras de estructuras cargadas con células y las muestras en blanco fue la disminución de la amplitud del día 1 al día 3, lo que indica una causa externa de tales fenómenos y probablemente debido a una deformación plástica de los materiales que ejercen la tensión de contacto de los transductores.

Por otro lado, el valor de tiempo de vuelo (ToF) se representa como un parámetro no adecuado para la predicción de la expansión tisular, ya que sus variaciones son mucho menores que las tasas de proliferación celular y síntesis de MEC. Más interesante es la ausencia de rebotes cercanos considerables en las muestras de estudio cuando se comparan con estructuras en blanco, lo que implica tamaños de poro más pequeños. De este modo, las señales empíricas obtenidas en este caso expresan una clara diferenciación entre medir la estructura con células unidas a su superficie y medir la estructura sin células unidas (en blanco). Así, la aplicación de un FEM para inducir herramientas de análisis de big data como correlación cruzada de señales son herramientas precisas para ampliar la información de los resultados extraídos y, en este caso, para transformar una aproximación cualitativa en una cuantitativa.

Además, dado que se obtuvo un claro aumento de la densidad del dominio de la estructura a lo largo del tiempo en el biorreactor y esto no se debió a ningún tipo de degradación del bTPUe después de 14 días, este resultado solo puede explicarse por la síntesis de MEC y la proliferación celular. Como consecuencia, se comprueba que el método de la invención puede determinar el desarrollo del tejido en tiempo real.

Además, el aumento observable de la velocidad del sonido en las estructuras con células indica también que la componente K de la ecuación de la velocidad del sonido

aumentó más que el aumento de densidad, lo que implica un módulo elástico más alto o viscosidades más bajas (v).

5 Quizás el resultado más interesante es el valor asintótico de densidad de $1300 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ obtenido para estructuras cargadas de células, lo que podría explicarse debido a una disminución en el soporte de nutrientes asociada con mayores tensiones de cizallamiento. Pero curiosamente el valor obtenido es bastante similar a los resultados de la literatura para el colágeno ($1,3 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$), lo que sugiere que la densidad final alcanzada está compuesta principalmente de colágeno.

10

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar en tiempo real el crecimiento y maduración de un tejido biológico, que comprende:
 - 5 - introducir un caudal de medio de cultivo en un biorreactor, donde el biorreactor comprende:
 - una cámara de cultivo (1) que aloja una estructura (5), la cual alberga una fuente celular,
 - un transductor en transmisión (2) y un transductor en recepción (3)
 - 10 situado enfrente al transductor en transmisión (2), y
 - un circuito fluido (4) conectado a la cámara de cultivo (1), situado entre el transductor en transmisión (2) y el transductor en recepción (3), y por el cual se introduce el caudal de medio de cultivo destinado a pasar a través de la estructura (5);
 - 15 - generar una onda ultrasónica mediante el transductor en transmisión (2) que atraviesa la cámara de cultivo (1) y la estructura (5) con la fuente celular alojada en dicha cámara de cultivo (1);
 - recibir la onda ultrasónica en el transductor en recepción (3) una vez que ha atravesado la estructura (5), generando una señal de recepción (3);
 - 20 - generar un modelo de simulación de propagación de ultrasonidos, calculando una señal simulada de recepción y fijando como variables dependientes una densidad de la estructura (5) y una velocidad del sonido en la estructura (5);
 - definir una métrica de distancia entre la señal simulada de recepción y la señal de recepción (3) de la onda ultrasónica obtenida en el transductor de
 - 25 recepción (3),
 - determinar la densidad en la estructura (5) y la velocidad del sonido en la estructura (5) que minimiza la métrica de distancia, en cada instante de tiempo; y
 - correlacionar la densidad y velocidad del sonido obtenidas con un aumento
 - 30 de rigidez y de contenido de tejido, monitorizando así el crecimiento de tejido a lo largo del tiempo.
2. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según la reivindicación 1, donde el modelo de simulación es
 - 35 generado mediante modelos de elementos finitos, diferencias finitas, método de matriz de transferencia (transfer matrix formalism) o técnicas espectrales.

3. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la métrica de distancia usada es una correlación cruzada entre las señales, una suma de las componentes del vector o una raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las componentes del vector.
4. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la etapa de determinar la densidad y la velocidad de propagación se realiza mediante un algoritmo de búsqueda que puede ser un método basado en gradiente, un algoritmo genético o una red neuronal entrenada con un conjunto de señales de ultrasonidos en recepción pre-calculadas y valores de densidad y velocidad de sonido correspondientes a dichas señales.
5. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el medio de cultivo además comprende células del sistema inmune.
6. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la fuente celular se selecciona de entre células madre y células diferenciadas.
7. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la fuente celular es de células madre seleccionadas de la lista que consiste en: células madre adultas, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas.
8. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la fuente celular es de células diferenciadas seleccionadas de la lista que consiste en fibroblastos, condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, miocardocitos, células endoteliales y miocitos.

9. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el tejido biológico se selecciona de la lista que consiste en, cartílago, hueso, músculo, tejido hepático, tejido vascular y piel.

5

10. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la estructura (5) está conformada por fibras con un diámetro de entre 50 μm y 400 μm y se representa en el modelo de simulación como una matriz de círculos.

10

11. Método para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el transductor de transmisión (2) y el transductor de recepción la estructura (5) están enfrentados y colocados perpendicularmente al circuito fluido (4).

15

12. Método de optimización de producción de tejido biológico que comprende las etapas de:

- determinar una densidad de la estructura (5) y una velocidad del sonido en la estructura (5) haciendo uso del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y
- determinar un flujo de bomba que optimiza el crecimiento y maduración de tejido mediante la expresión:

20

$$q = u \cdot \left(1 - \frac{\pi \cdot (K_4 \cdot \rho_{ECM})^2}{4 \cdot A_{total}}\right)$$

25

donde q es el flujo de bomba, u es la velocidad del flujo y es constante, K_4 es una constante que relaciona una variación en diámetro de fibras de la estructura con una densidad de matriz, ρ_{ECM} es la densidad de matriz extracelular y A_{total} es el área total de la estructura (5) en dirección perpendicular al flujo de bomba.

30

13. Método de optimización de producción de tejido de acuerdo con la reivindicación 12, donde K_4 , que relaciona una variación en diámetro de fibras de la estructura con una densidad de matriz, se obtiene por medio de la expresión:

$$K_4 = \left(K_2 + \frac{K_3}{K_1} \right)$$

donde K_4 , se obtiene de las expresiones:

$$\frac{dD_f(t)}{dt} = K_2 \cdot \rho_{ECM} + K_3 \cdot [cell] - \zeta_{material}$$

$$\rho_{ECM} = K_1[cell]$$

5

y donde K_1 es una constante previamente determinada que depende del metabolismo celular, del tipo de matriz sintetizada y de la edad de las células, $[cell]$ es la concentración de células adheridas a la estructura, D_f es el diámetro de la fibra de la estructura y varía en función de: $K_2 \cdot \rho_{ECM}$ que representa la matriz sintetizada por las células, donde K_2 es el coeficiente de incremento de diámetro en función de la cantidad de matriz, $K_3 \cdot [cell]$ que representa el número de células adheridas, donde K_3 es el coeficiente de incremento de diámetro en función de la masa celular, y $\zeta_{material}$ que representa la degradación del polímero y que se considera despreciable.

10

15

14. Biorreactor para la generación de tejido biológico, que está destinado a albergar una fuente celular y que comprende:

- una cámara de cultivo (1) de células configurada para alojar una estructura (5) para albergar la fuente celular;
- un transductor en transmisión (2) configurado para emitir una onda ultrasónica en dirección a la estructura (5);
- un transductor en recepción (3) dispuesto enfrente al transductor en transmisión (2) y configurado para recibir la onda ultrasónica una vez que ha atravesado la estructura (5);
- un circuito fluido (4) destinado a pasar a través de la estructura (5) con el fin de generar un esfuerzo cortante en la superficie de la misma para facilitar la generación y diferenciación en las células; donde el circuito fluido (4) comprende una entrada (6) y una salida (7), y una bomba peristáltica (8) configurada para generar un flujo laminar; y
- un módulo de procesamiento configurado para llevar a cabo las etapas del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y en función de la densidad en la estructura (5) y la velocidad del sonido en la estructura (5) obtenidas, controlar el flujo generado por la bomba peristáltica (8) mediante una regulación del flujo de bomba generado, de acuerdo con

20

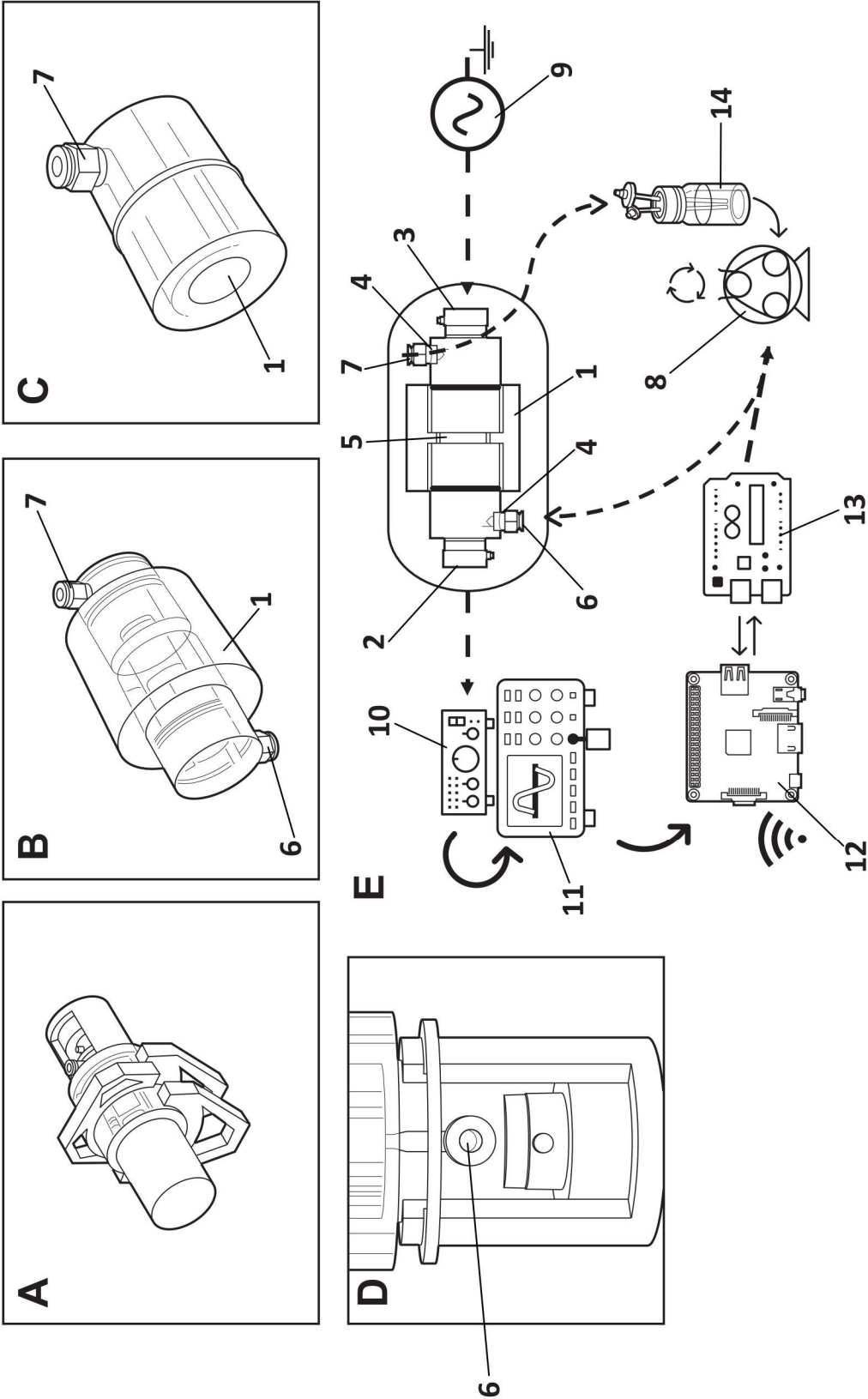
25

30

las etapas del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13.

- 5 15. Biorreactor para la generación de un tejido biológico de acuerdo con la reivindicación 14, que además comprende un generador de señales (9) conectado al transductor de transmisión (2).
- 10 16. Biorreactor para la generación de un tejido biológico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, que además comprende un amplificador (10) y un osciloscopio (11) conectados al transductor en recepción (3).
- 15 17. Biorreactor para la generación de un tejido biológico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde el módulo de procesamiento es una Raspberry PI (12) y una placa Arduino (13) conectada a la bomba peristáltica (8).
- 20 18. Biorreactor para la generación de un tejido biológico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, que además comprende un recipiente (14) destinado a almacenar el medio de cultivo y conectado a la bomba peristáltica (8), a la entrada (6) del circuito fluido (4) y a la salida (7) del circuito fluido (4).
- 25 19. Biorreactor para la generación de un tejido biológico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde la cámara de cultivo (1) está hecha de un material seleccionado de la lista que consiste en: metacrilato de polimetilo (PMMA), acero inoxidable, titanio, cristal de zafiro, platino, y cristal.
- 30 20. Sistema para la generación de un tejido biológico que comprende el biorreactor de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, y comprende además una estructura (5) situada en la cámara de cultivo (1) de células, sobre la que se dispone la fuente celular.
- 35 21. Sistema para la generación de un tejido biológico de acuerdo con la reivindicación 20, donde la estructura (5) está hecha de un polímero seleccionado de la lista que consiste en: poliuretano termoplástico 1,4-butanodiol (bTPUe), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PLC) y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

- 5
22. Sistema para la generación de un tejido biológico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, donde la estructura (5) está conformada por fibras con un diámetro de entre 50 μm y 400 μm .
- 10
23. Sistema para la generación de un tejido biológico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde la superficie de la estructura (5) está funcionalizada con péptidos Arg-Gly-Asp (RGD), con PBA, ácido acético 1-pireno (PCA) con fibronectina o con colágeno.
- 15
24. Programa de ordenador para determinación en tiempo real del crecimiento y maduración de un tejido biológico configurado para llevar a cabo las etapas del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y para optimización de producción de tejido configurado para llevar a cabo las etapas del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 haciendo uso del sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23.
- 20
25. Unidad de almacenamiento configurada para almacenar el programa de ordenador de acuerdo con la reivindicación 24.



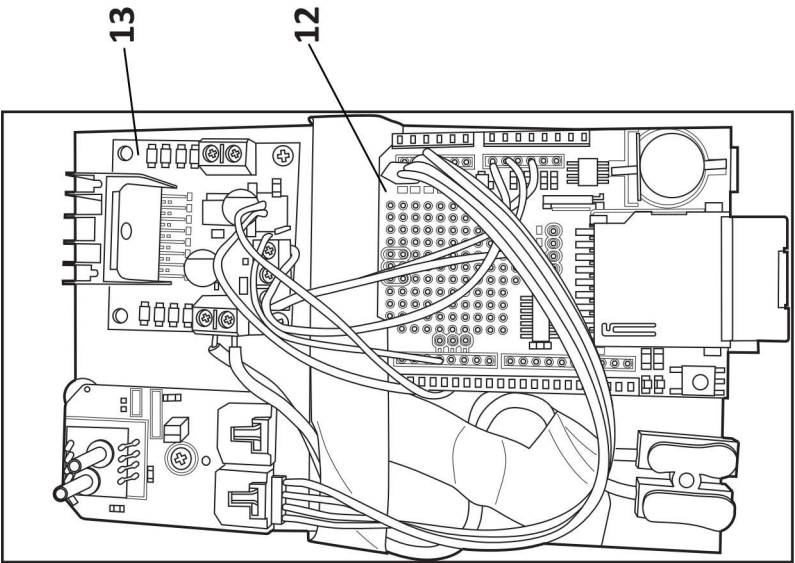


FIG. 2B

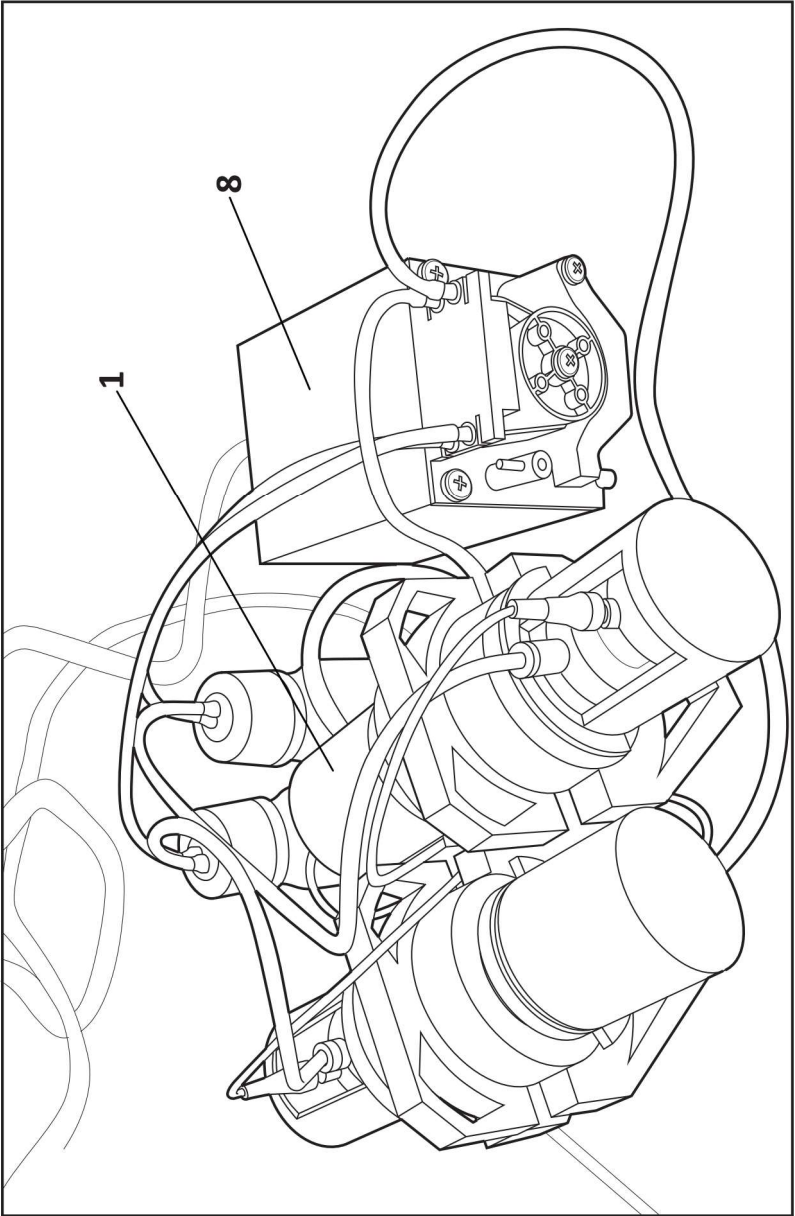


FIG. 2A

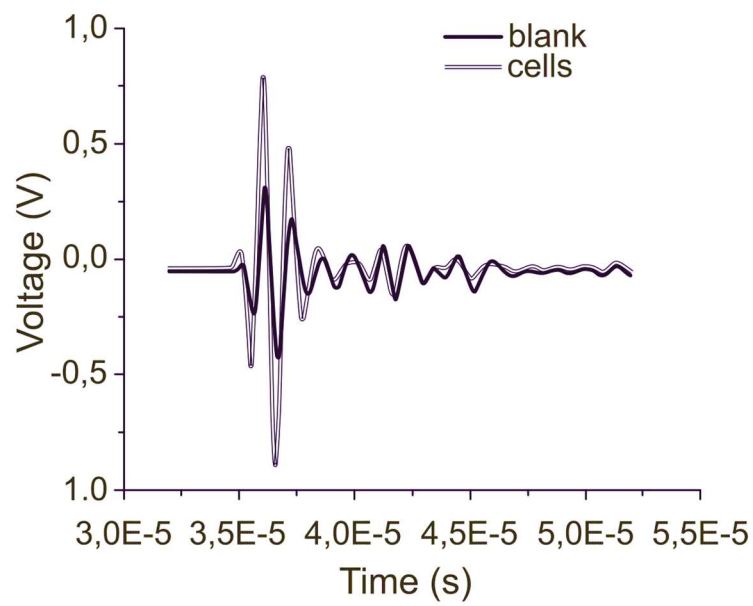


FIG. 2C

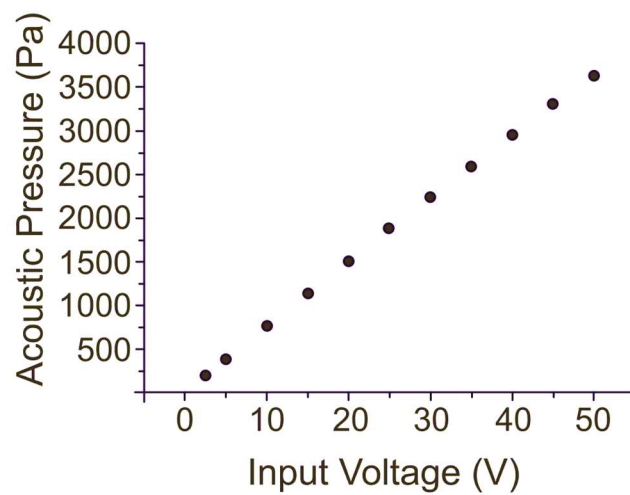


FIG. 2D

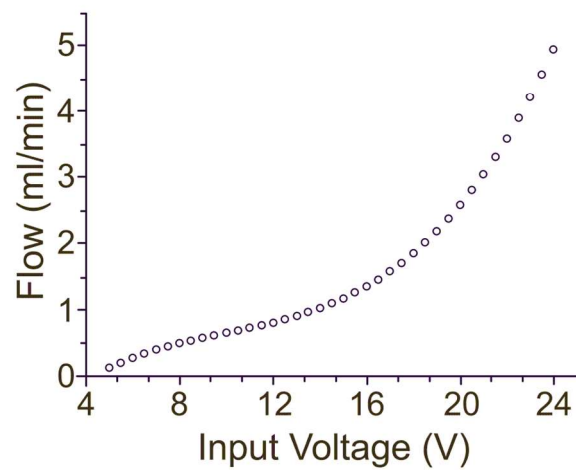


FIG. 2E

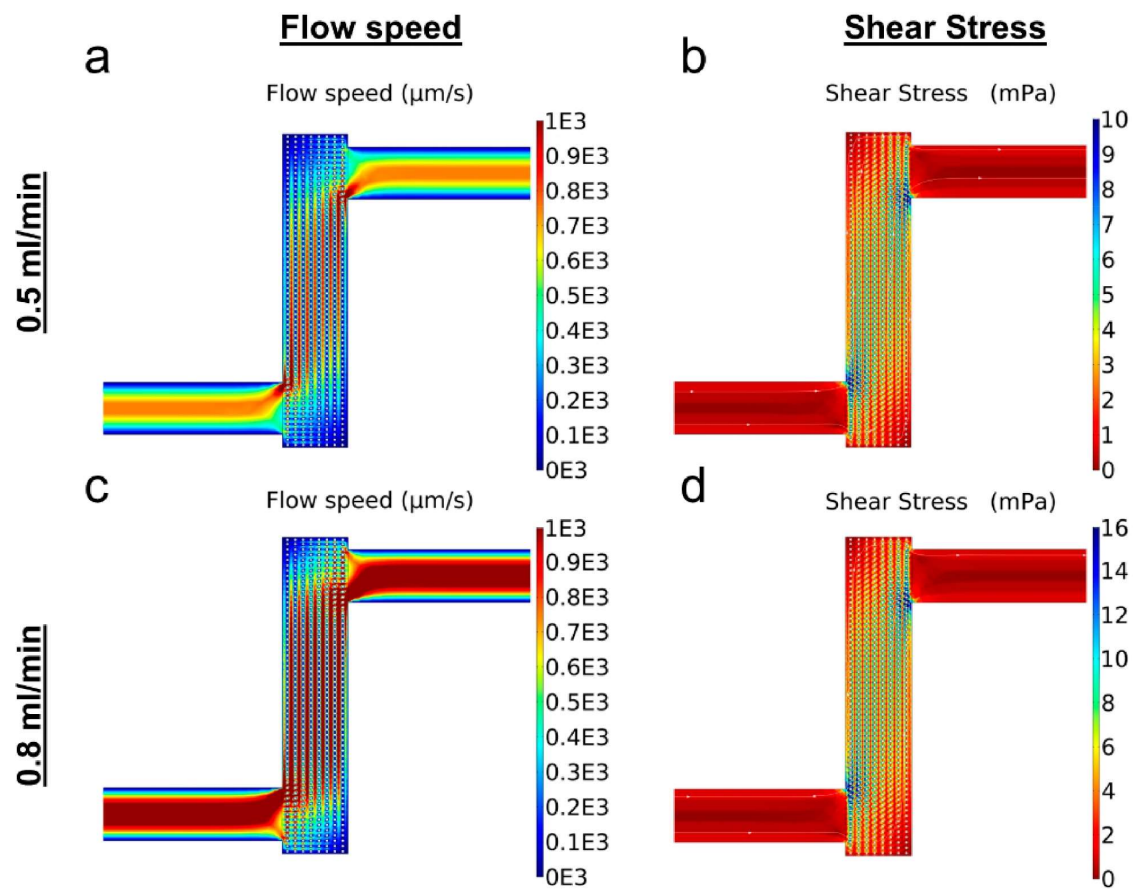


FIG. 2F

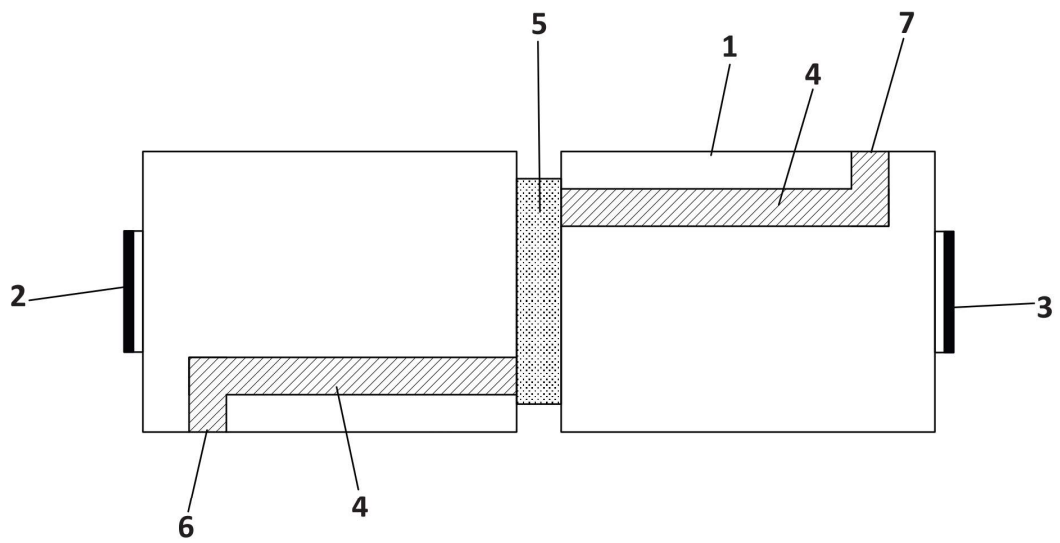


FIG. 3A

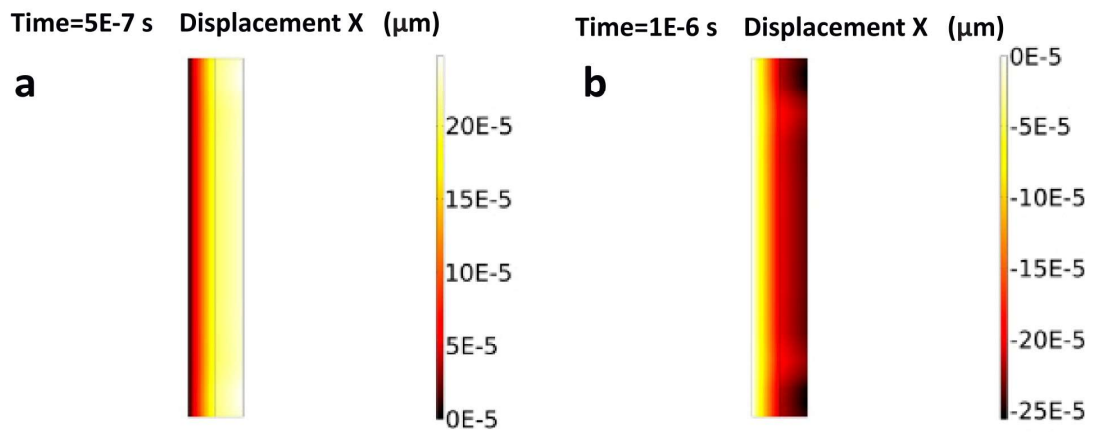


FIG. 3B

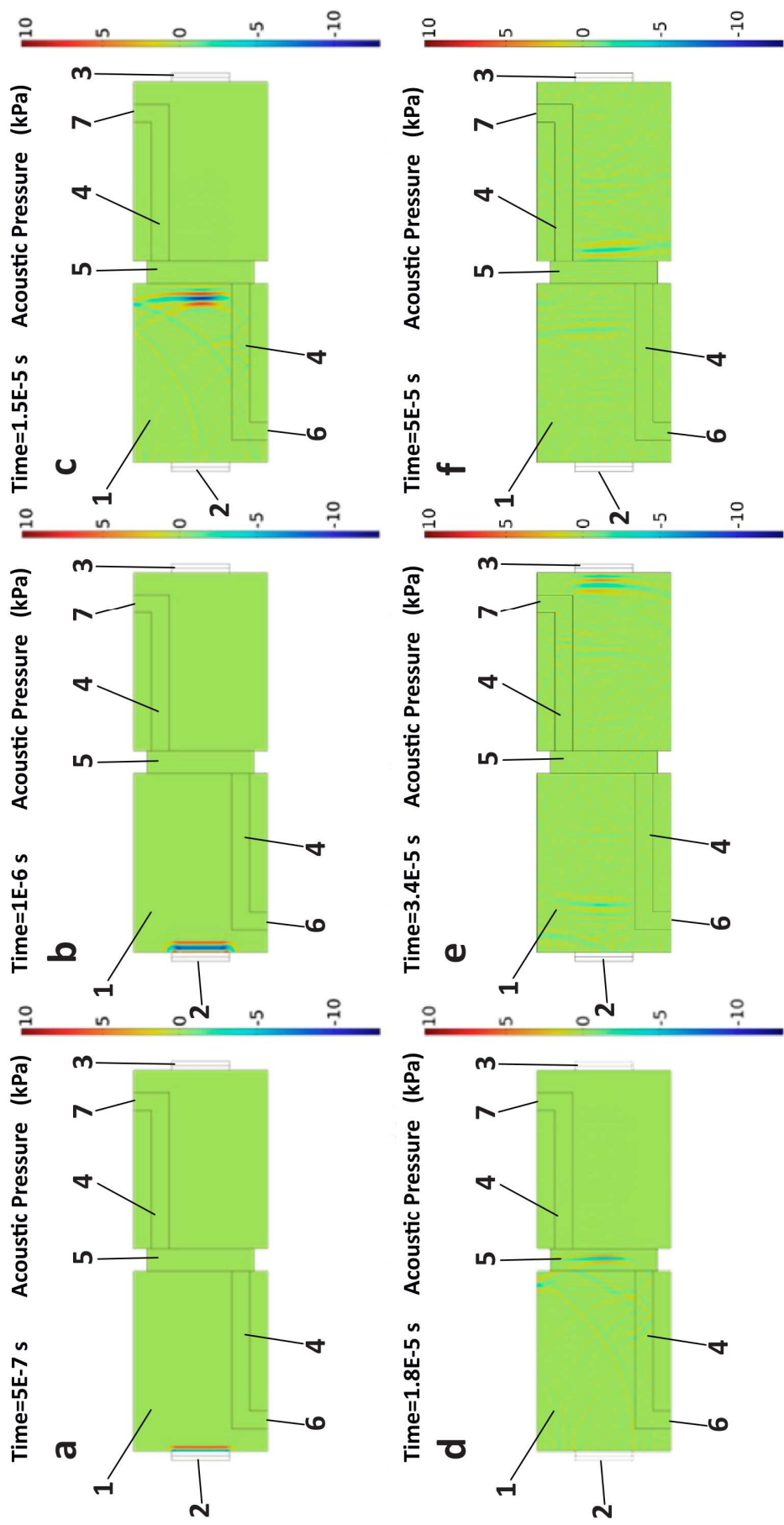


FIG. 3C

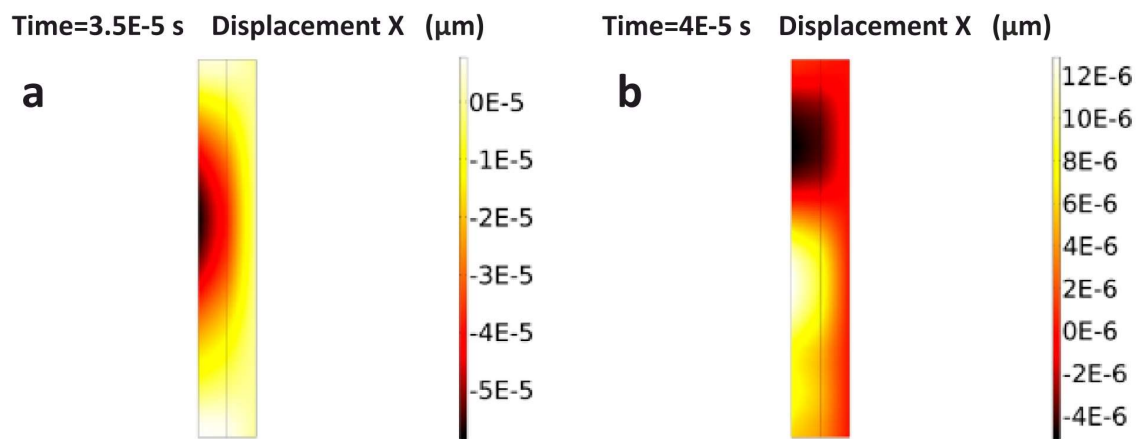


FIG. 3D

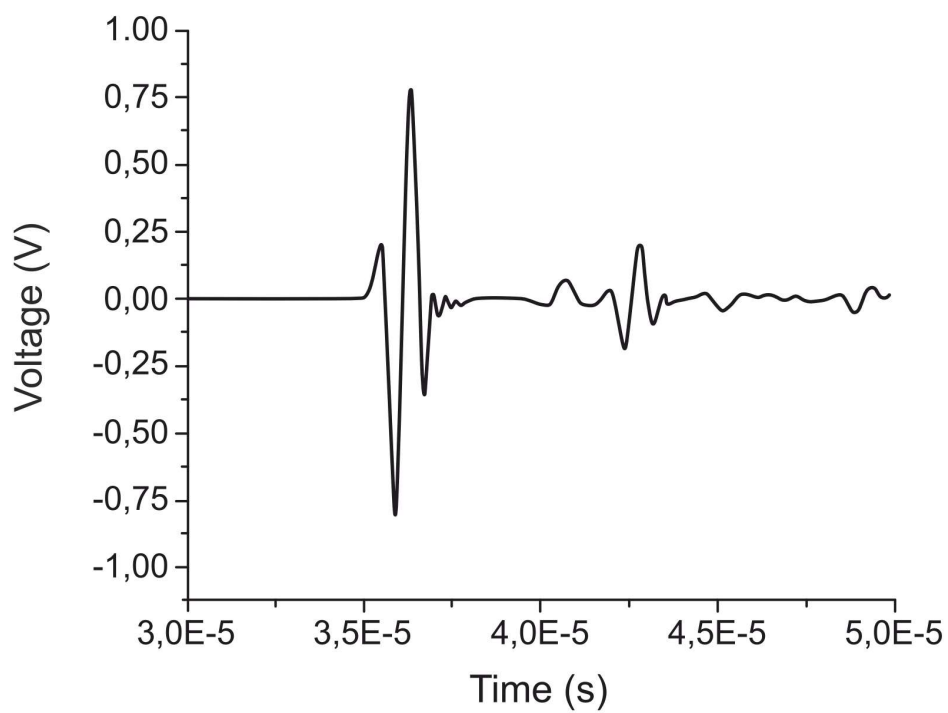


FIG. 3E

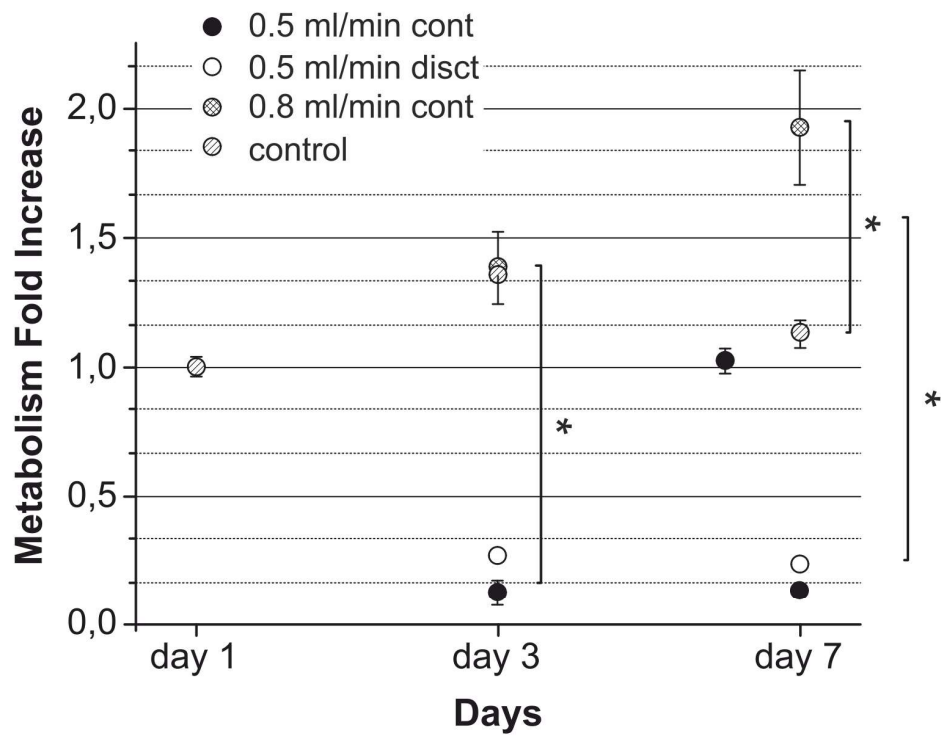


FIG. 4A

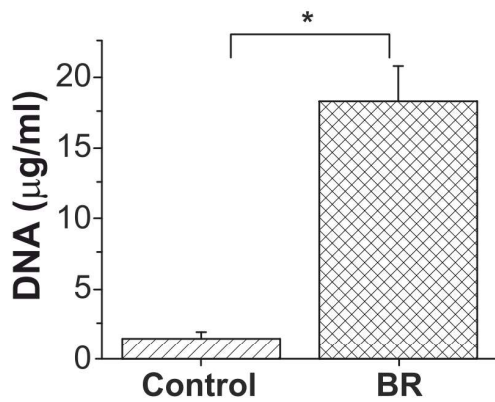


FIG. 4B

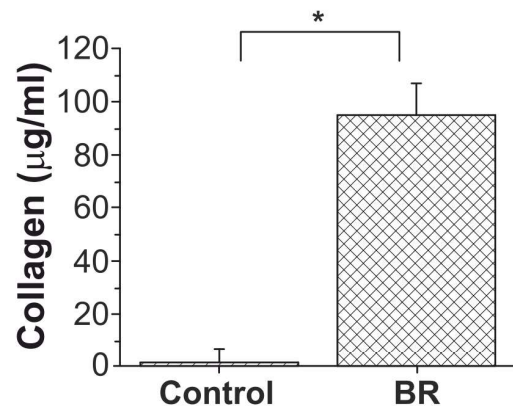


FIG. 4C

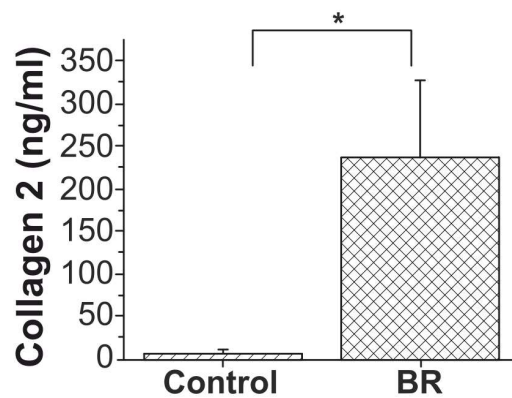


FIG. 4D

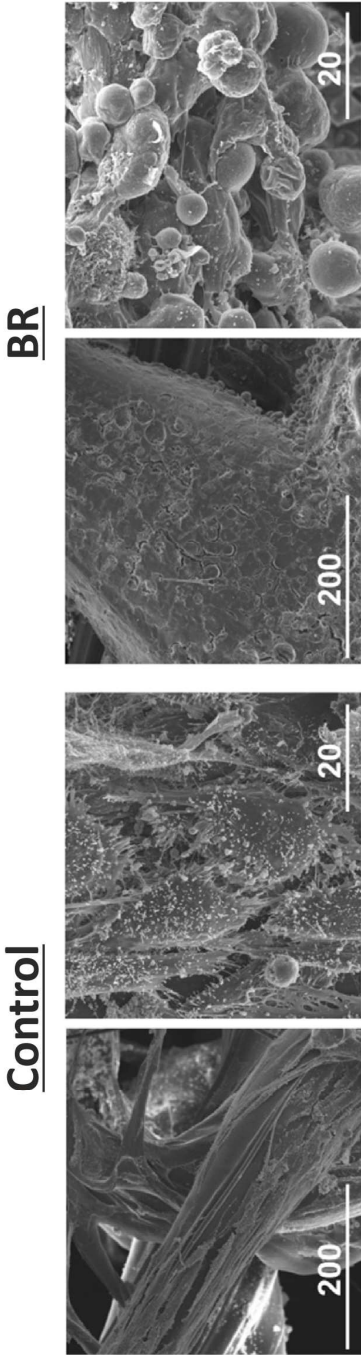


FIG. 4E

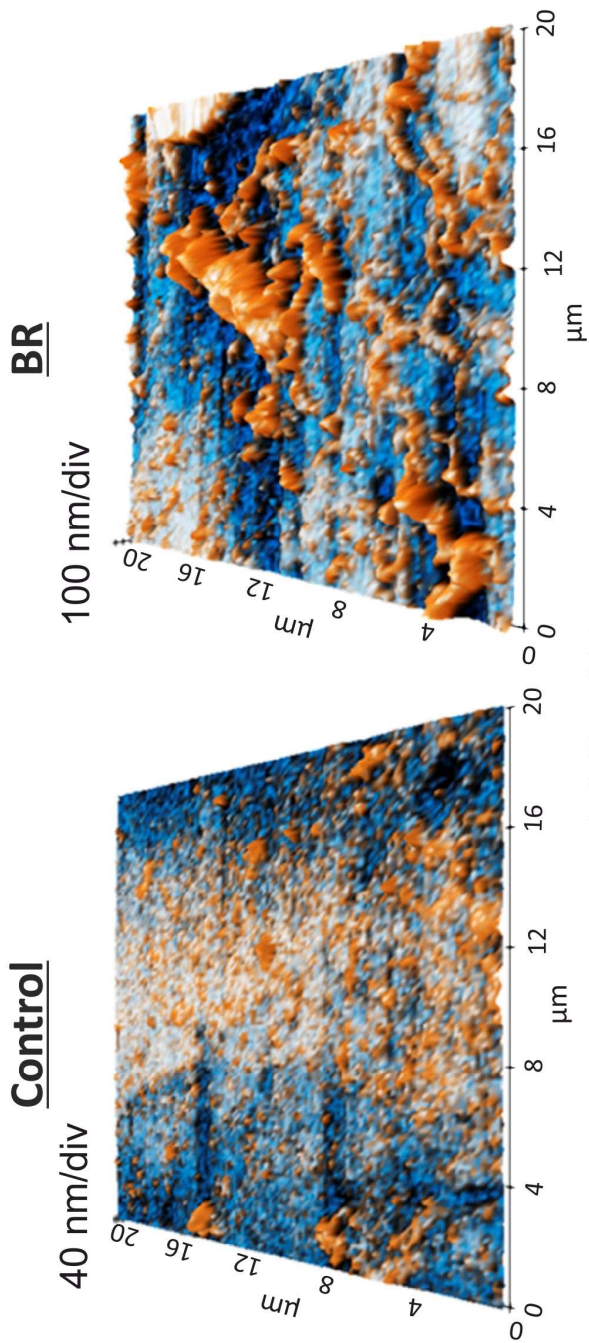


FIG. 4F

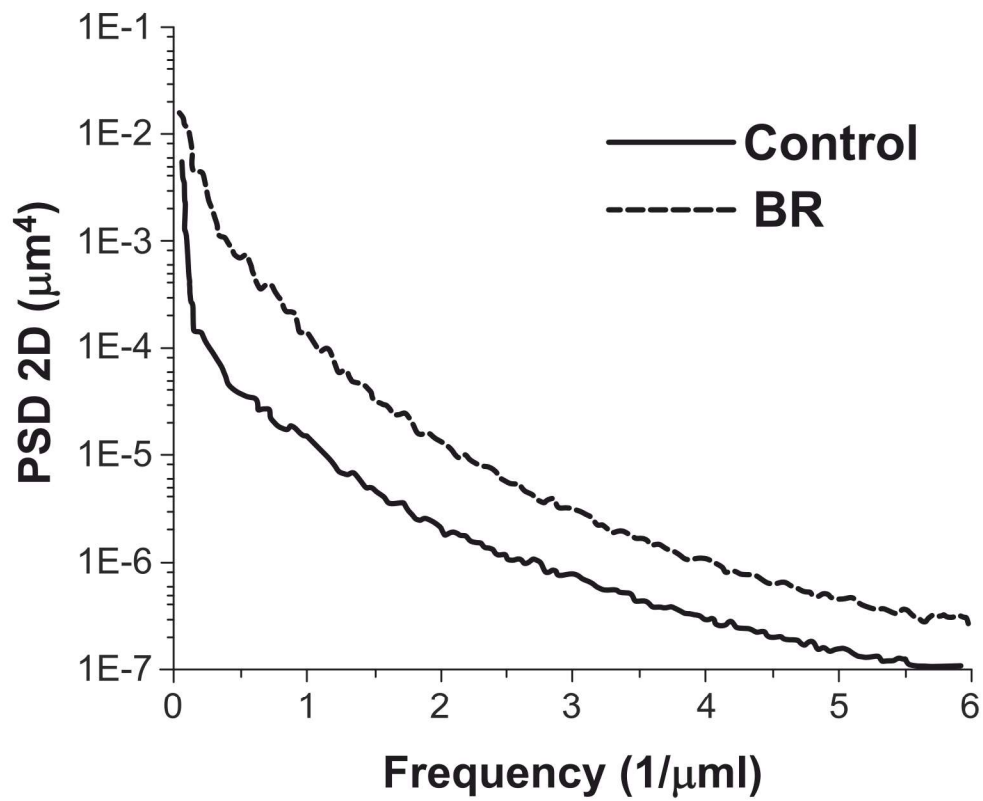


FIG. 4G

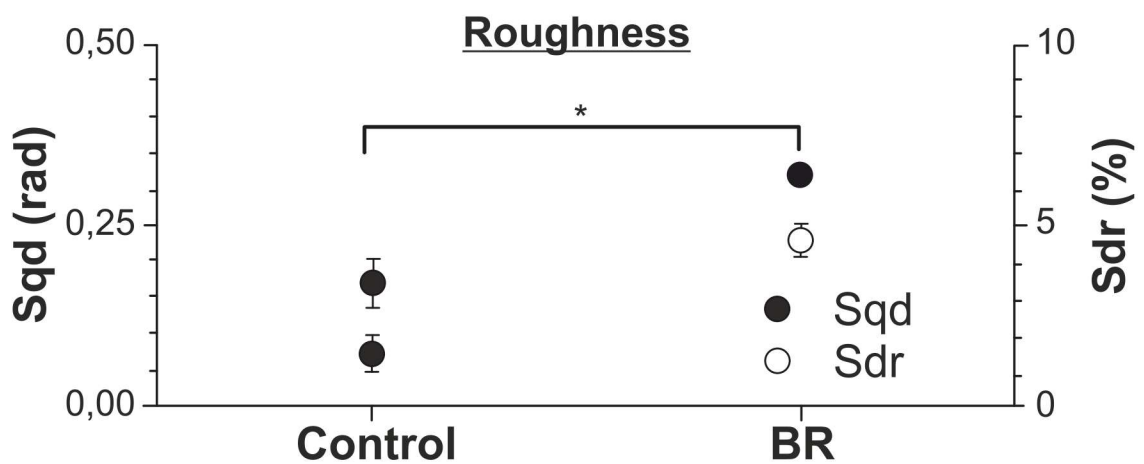


FIG. 4H

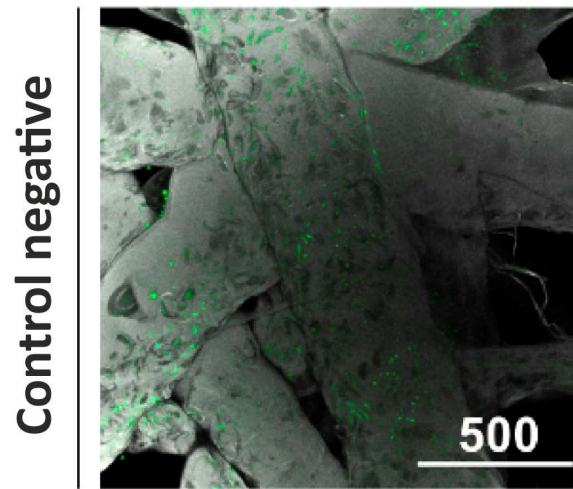


FIG. 5A

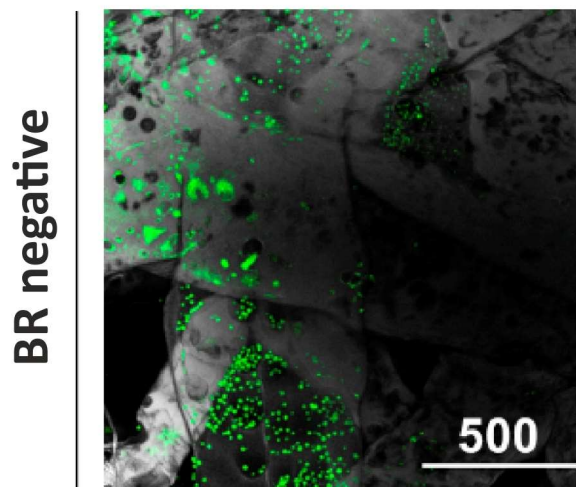


FIG. 5B

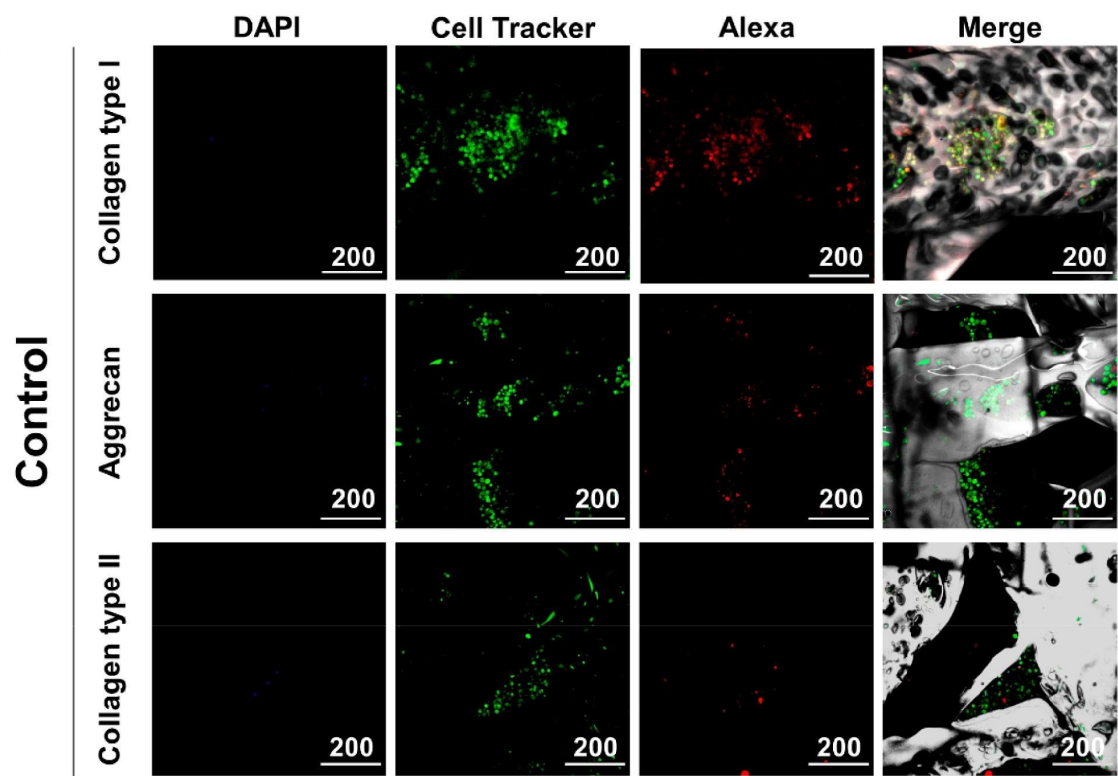


FIG. 5C

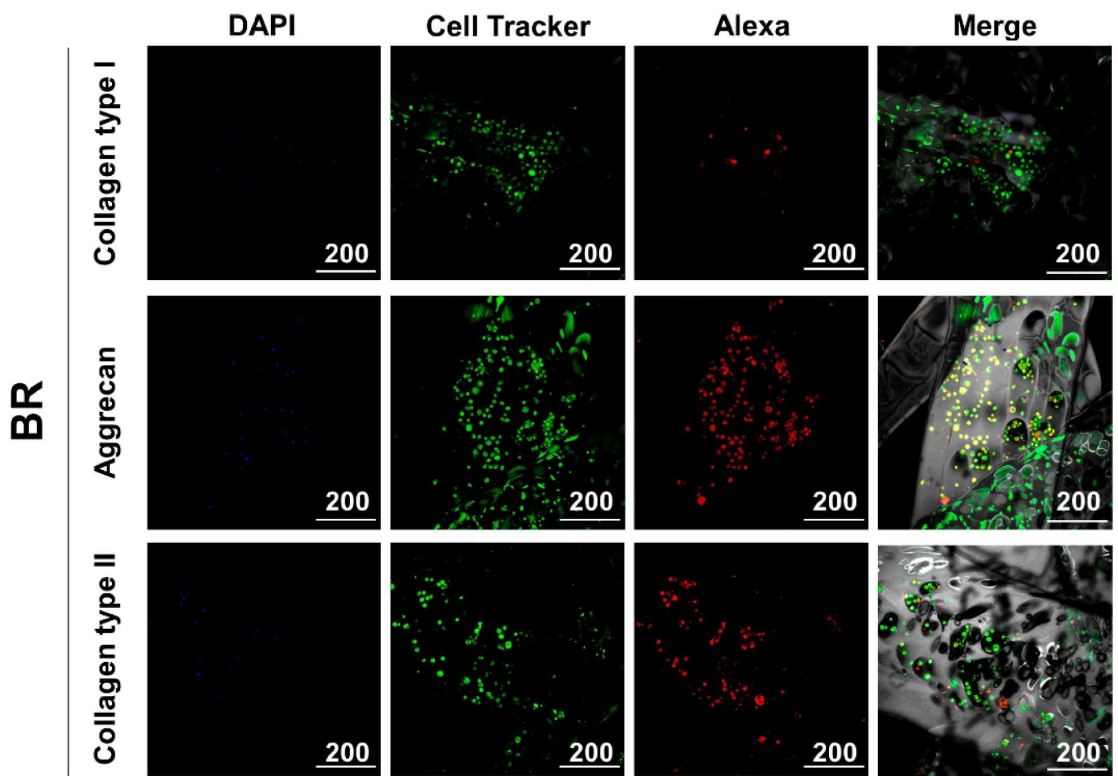
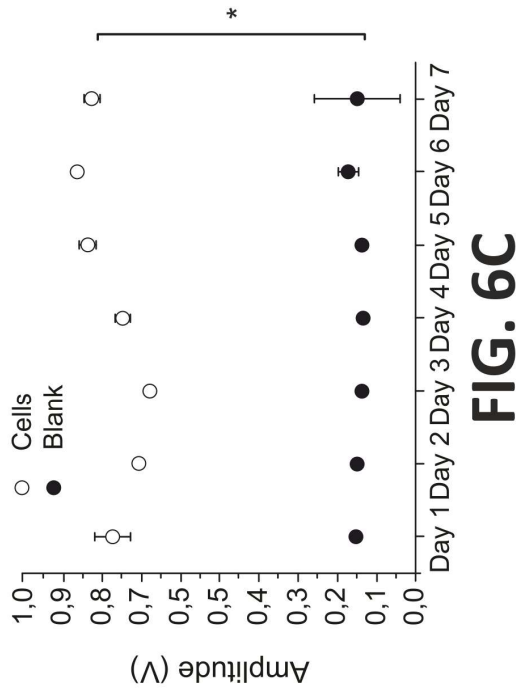
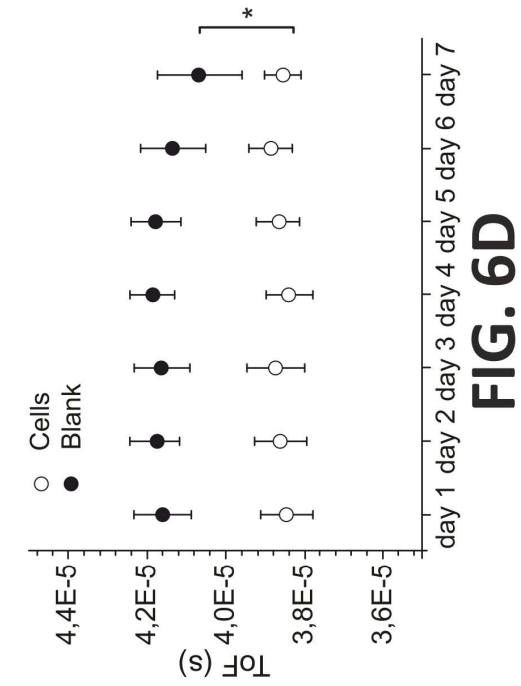
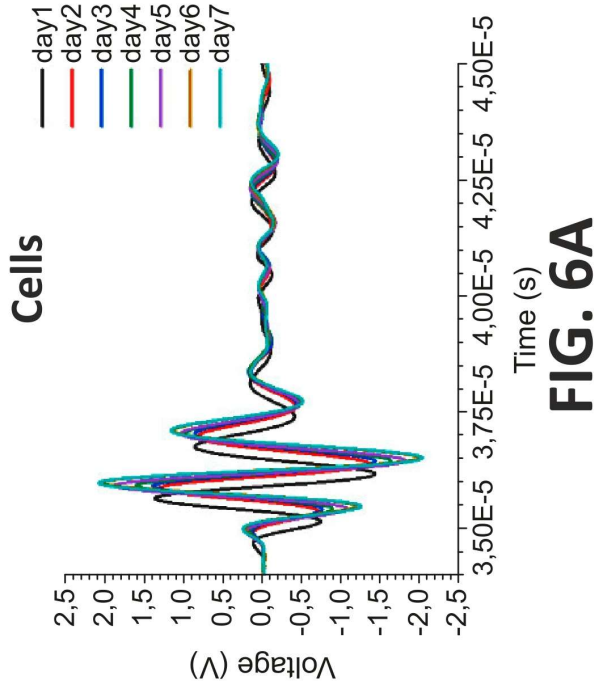
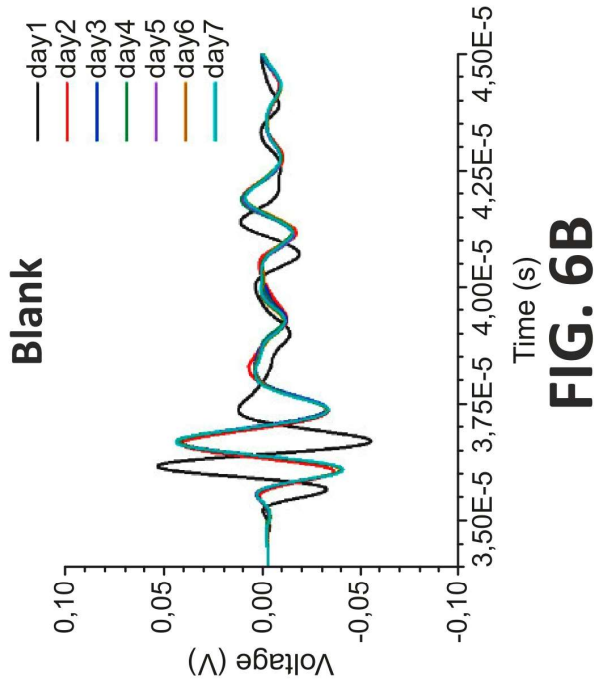


FIG. 5D



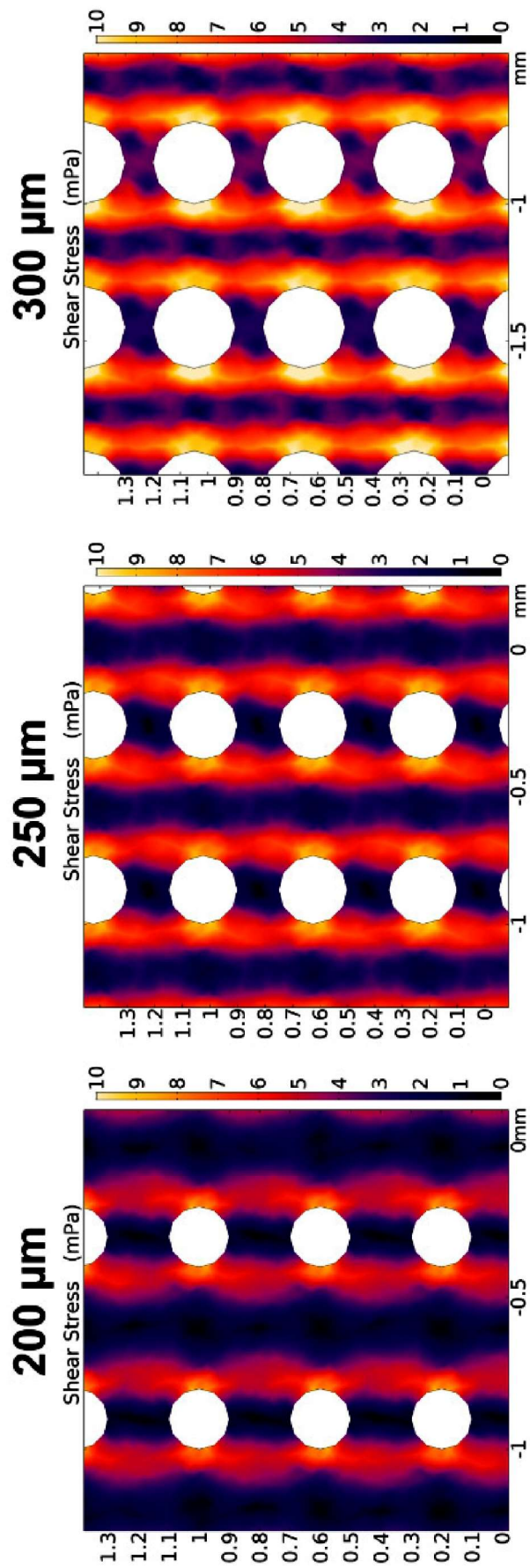
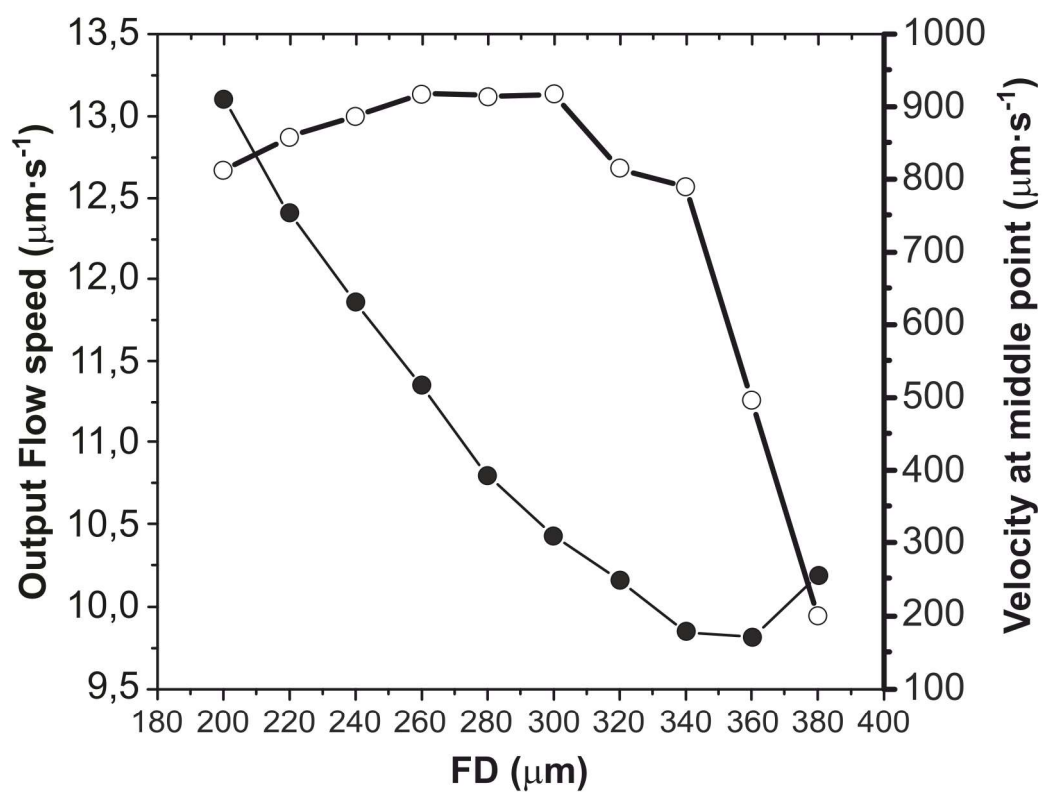
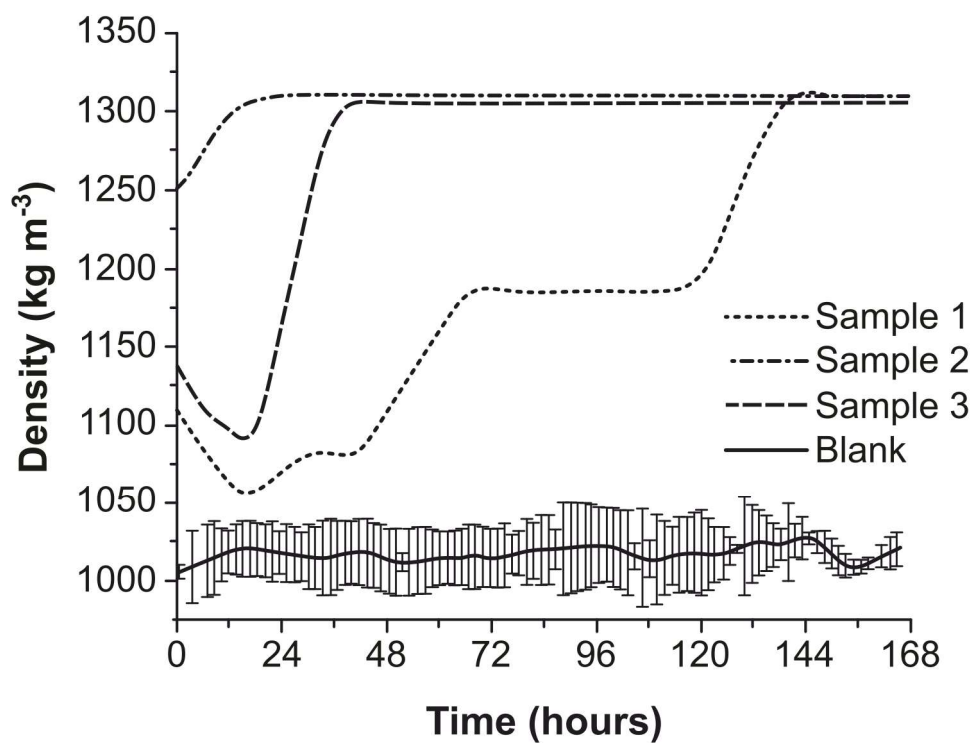


FIG. 6E

**FIG. 6F****FIG. 6G**

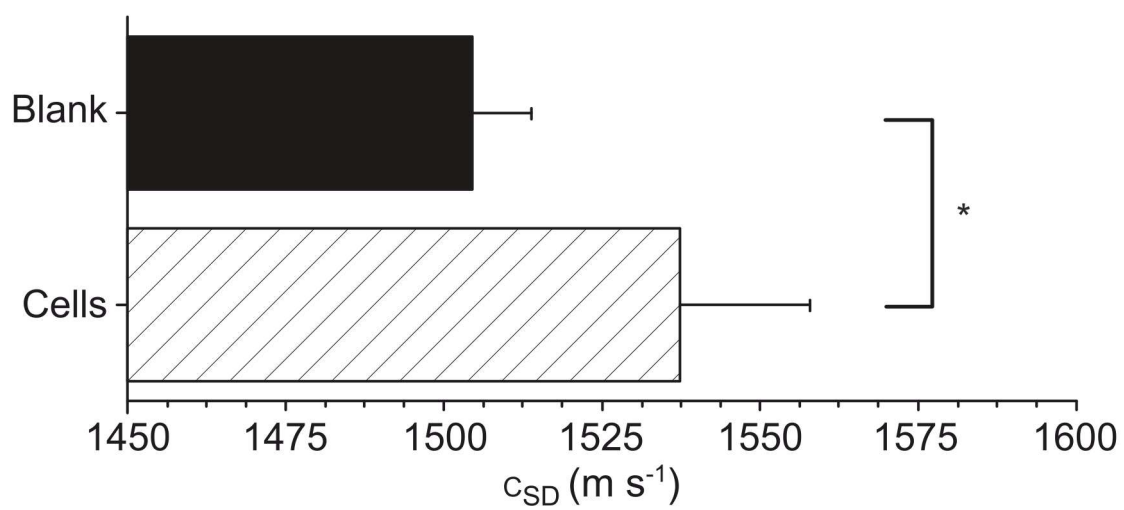


FIG. 6H



- ②① N.º solicitud: 202330648
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.07.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	RULAND, A. et al.: "Quantitative ultrasound imaging of cell-laden hydrogels and printed constructs". Acta Biomaterialia June 2019 Elsevier B.V. Netherlands, 31/05/2019, Vol. 91, Páginas 173 - 185, ISSN 1742-7061 (print), <DOI: 10.1016/j.actbio.2019.04.055>.	1-11
Y	RICE, M. A.; WATERS, K. R.; ANSETH, K. S.: "Ultrasound monitoring of cartilaginous matrix evolution in degradable PEG hydrogels". Acta Biomaterialia, 20090101 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, 01/01/2009, Vol. 5, páginas 152-161, ISSN 1742-7061, <DOI: 10.1016/j.actbio.2008.07.036>.	1-11
A	NICOLAS BOCHUD et al.: "Probabilistic inverse problem to characterize tissue-equivalent material mechanical properties". IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, 20120701 IEEE, USA, 01/07/2012, Vol. 59, páginas 1443 - 1456, ISSN 0885-3010, <DOI: 10.1109/TUFFC.2012.2345>.	1-25
A	KIM, K. et al.: "Non-invasive monitoring of tissue scaffold degradation using ultrasound elasticity imaging". Acta Biomaterialia, 20080701 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Kilian Kristopher; Moghe Prabhas, 01/07/2008, Vol. 4, páginas 783 - 790, ISSN 1742-7061, <DOI: 10.1016/j.actbio.2008.02.010>.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.03.2024

Examinador
J. Botella Maldonado

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12M3/00 (2006.01)

G01N33/483 (2006.01)

A61B8/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12M, G01N, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP, XPAIP, XPI3E, INSPEC.