

Optimización del diseño de un scaffold bioabsorbible para regeneración de nervios periféricos mediante modelización y simulación computacional

Dias, Fernando J.; Gareis, Ivan E.; Lezcano, Ma. Florencia; Pais, Carlos M.; Rufiner, Hugo L.

Autores: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial 11, km 10 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina

Contacto: ivan.gareis@uner.edu.ar

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/s4lq27u2p>

Resumen

Este proyecto desarrolló un modelo híbrido multiescala para optimizar el diseño de una estructura tridimensional que sirve como base para la proliferación celular, en adelante scaffold, bioabsorbible de polihidroxitirato (PHB) o ácido polihidroxitirato para la regeneración de nervios periféricos. Se fabricaron scaffolds con diferentes tamaños de fibra y porosidad, y se caracterizaron morfológicamente. Se realizaron ensayos con células de Schwann para evaluar viabilidad, proliferación y morfología sobre los scaffolds. Se recopiló información de la literatura sobre degradación del scaffold, liberación de factores neurotróficos, motilidad celular y ciclo celular. Se definió un modelo formal combinando un modelo de difusión-reacción para el subsistema scaffold-medio y un modelo basado en agentes para las células. Se implementó computacionalmente el modelo en Python. Se verificó y validó el modelo mediante simulaciones. Los resultados mostraron una clara relación entre el tamaño de fibra y la proliferación/migración celular, especialmente en ensayos de cierre de herida.

Palabras clave: Modelización computacional, scaffold, célula de Schwann, nervios periféricos, modelos basados en agentes

1. Objetivos propuestos y cumplidos

A continuación se enumeran los objetivos propuestos en la formulación del proyecto.

Procesar los datos recopilados durante la experimentación in vitro realizada previamente, para obtener los parámetros necesarios para la modelización. Se obtuvo el espesor de la pared, la porosidad y el diámetro de las fibras del scaffold mediante el análisis de imágenes de microscopía electrónica; la tasa de degradación del scaffold mediante el análisis de los resultados del ensayo de degradación; la tasa de liberación de factores mediante el procesamiento de los resultados del ensayo de liberación de factores; la caracterización morfométrica y funcional de las células de Schwann adheridas al scaffold. La metodología y resultados obtenidos fueron publicados en una revista internacional [6].

Definir un modelo formal combinando un modelo de difusión-reacción y un Modelo Basado en Agentes. Se obtuvo un modelo híbrido multiescala del sistema caracterizándolo mediante un diagrama de clase UML. Este modelo híbrido se definió mediante un submodelo discreto para aproximar el comportamiento de las células y un submodelo continuo para aproximar la liberación y difusión de sustancias en el medio. Lo denominamos también multiescala ya que a cada submodelo le asignamos una escala temporal diferente. El modelo continuo se resolvió utilizando un método numérico convencional sobre una escala temporal más rápida que la del modelo basado en agentes. El intercambio de información entre submodelos es posible debido a que se procuró que las escalas estén sincronizadas.

Obtener un modelo computacional a partir del modelo formal. Se implementó computacionalmente el modelo formal propuesto. Para ello se utilizó Python debido a que Repast Symphony no permite la implementación de modelos híbridos multiescala. Python no sólo nos brindó la flexibilidad necesaria para la implementación del modelo sino también herramientas para procesar y analizar los resultados. Una vez publicado el artículo descriptivo del modelo el código fuente será publicado en GitHub.

Verificar y validar el modelo computacional mediante experimentación (múltiples simulaciones). El modelo fue verificado y validado utilizando múltiples criterios. De este proceso surgieron mejoras y correcciones a los modelos conceptual, formal y computacional.

Analizar las salidas de las simulaciones obtenidas mediante el modelo computacional para determinar valores optimizados de los parámetros de diseño. Se diseñaron y ejecutaron experimentos con el modelo computacional.

2. Marco teórico y metodológico (síntesis)

Para el desarrollo, simulación y validación del modelo se han propuesto varias metodologías y secuencias de pasos diferentes, utilizando distinto vocabulario y definiciones, sin embargo en todos los casos se siguen estrategias similares. Para este proyecto se propone la metodología de trabajo presentada en la Figura 1, adaptada de las propuestas por [7] y [8].

El proceso de simulación comienza con la formulación del problema práctico a resolver. En este punto, debe entenderse el comportamiento del sistema organizando su

funcionamiento en objetos y actividades dentro de un marco experimental de interés. El siguiente paso implica el desarrollo del modelo conceptual, que consiste en una descripción de alto nivel de la estructura y comportamiento del sistema identificando todos los objetos con sus atributos e interfaces. Debe definirse cuáles son las variables de estado, como se relacionan y cuáles son importantes para el estudio.

Idealmente el proceso de recopilación de datos comienza una vez definido el modelo conceptual, lo que ayuda a seleccionar tamaños de muestra estadísticamente válidos y registrando todas las variables de nuestro interés, sin embargo en muchos casos se trabaja con conjuntos de datos previamente registrados o sobre procesos sobre los cuales no se puede realizar experimentos controlados sobre el sistema.

Posteriormente se puede pasar a la etapa de modelo formal, en la que se construye una representación detallada y unívoca basada en el modelo conceptual, que implica la descripción a través de lenguaje matemático o algún protocolo determinado. La etapa en la que se implementa el modelo computacional implica la selección e implementación del modelo formal en un lenguaje ejecutable por la computadora.

Se deben definir en esta etapa algoritmos y herramientas de simulación. Durante los pasos anteriores, se construyeron 3 modelos: el modelo conceptual (especificación), el modelo del sistema (descripción formal) y el modelo de simulación (programa ejecutable). Es necesario verificar y validar estos modelos.

La verificación está relacionada a la consistencia interna entre los tres modelos. Analizando los resultados de la simulación se corrobora que el modelo esté bien implementado. En caso de encontrar inconsistencias, se vuelve a los pasos anteriores para realizar las modificaciones que sean necesarias.

La validación hace referencia a la correspondencia entre el modelo y la realidad. Se evalúa si los resultados de la simulación son consistentes con la realidad. Se analizan los resultados obtenidos en la simulación y en el caso de encontrar inconsistencias, se vuelve a los pasos anteriores para realizar modificaciones que sean necesarias. Para completar las etapas de validación y verificación es necesaria la experimentación con el modelo computacional. Para esto se ejecuta el modelo de simulación en diferentes condiciones y se evalúan las salidas utilizando diferentes técnicas. Por último, debe realizarse un análisis de las salidas del modelo computacional para cumplir con los objetivos originales que nos llevaron a desarrollar el modelo primera instancia.

3. Síntesis de resultados y conclusiones

Recopilación de datos. Respecto a la morfología de los scaffolds, las imágenes SEM de los scaffolds (Figura 1a-f) revelaron que algunas muestras (S1, S2 y S3) presentaron fibras lisas, otras (S5 y S6) presentaron fibras rugosas y una de ellas (S4) presentó una combinación de ambas. En cuanto al espesor de las fibras (Figura 1g; Tabla 1), todos los scaffolds presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con excepción de S5 y S6, que tuvieron fibras equivalentes. En términos de tamaño de poro (Figura 1h; Tabla 1), se encontraron menos diferencias estadísticas. Se encontraron diferentes distribuciones para el tamaño de los poros en los siguientes pares de estructuras: S1-S3 ($p = 0,02$), S1-S6 ($p = 0,00$), S2-S6 ($p = 0,03$), S3-S4 ($p = 0,01$), S4-S5 ($p = 0,04$) y S4-S6 ($p = 0,00$). S6 mostró los valores más altos y la mayor variabilidad tanto para el espesor de la fibra como para el tamaño de los poros (Tabla 1).

El aumento del caudal dio como resultado fibras más gruesas, poros más grandes

y mayor variabilidad. El aumento del voltaje dio como resultado fibras más gruesas o más delgadas, dependiendo de la concentración de PHB. Lo mismo se observó con el tamaño de los poros. Al aumentar la concentración de PHB, los scaffolds comenzaron a presentar fibras rugosas y más gruesas, a veces mezcladas con fibras lisas más delgadas. Una correlación muy alta ($r = 0,85$; $p = 0,03$; Figura 2) entre el tamaño de los poros y el espesor de la fibra se obtuvo manipulando la concentración de PHB, el voltaje de electrohilado y el caudal.

Tabla 1. Espesor de fibra y tamaño de poro

Scaffold	Espesor de fibra (μm)	Tamaño de poro (μm)
S1	2.4 ± 0.4	14.2 ± 9.7
S2	3.1 ± 0.4	20.2 ± 9.4
S3	4.3 ± 0.5	21.9 ± 13.8
S4	1.8 ± 0.5	17.5 ± 6.6
S5	5.0 ± 0.8	23.3 ± 10.3
S6	5.3 ± 1.3	32.7 ± 18.5

Se analizó también la viabilidad y morfología de las células de Schwann adheridas a scaffolds con distintos espesores de fibra y tamaño de poro, para esto se seleccionaron los scaffolds S1, S2 y S3 para realizar pruebas de viabilidad celular. Estos scaffolds presentaron fibras lisas (Figura 1a-c), diferente espesor de fibra (Figura 3a) y tamaño de poro variado (Figura 3b). En cuanto al espesor de las fibras, S1 presentó fibras más delgadas que S2 ($p = 0,00$) y S3 ($p = 0,00$); asimismo, S2 presentó fibras más delgadas que S3 ($p = 0,00$). En cuanto al tamaño de los poros, S1 presentó poros más pequeños que S3 ($p = 0,00$); sin embargo, S2 y S3 no presentaron diferencias significativas. En términos de viabilidad celular, se encontraron diferencias significativas entre S1 (el andamio con las fibras más delgadas y los poros más pequeños) y el resto de andamios durante todo el período de incubación (días 1, 3 y 7; Figura 3c). Los poros más grandes y las fibras más gruesas dieron como resultado una mayor viabilidad celular. Las imágenes SEM revelaron que las células sembradas en los andamios S1, S2 y S3 penetraron la estructura porosa y se adhirieron al material. Esto resultó en la formación de una red tridimensional compuesta de fibras y células entrelazadas. La cantidad de células no cambió significativamente durante el período de cultivo y mantuvo su forma y tamaño característicos (los días 1 y 5 se muestran en la Figura 3d-i).

Respecto al análisis de la proliferación y viabilidad de células de Schwann para diferentes concentraciones de factores neurotróficos (NGF y GDNF), no se encontraron diferencias significativas (ver Figuras 6 y 7).

La Figura 6 muestra la relación entre el diámetro de la fibra y la motilidad celular. También muestra las trayectorias típicas/tipo de movimiento que puede tomar una Célula de Schwann durante su migración. Estos datos fueron extraídos de la bibliografía.

Según Freier et al. [20] el PHB pierde un 1% de su masa en 54 semanas. El porcentaje de pérdida de masa y el porcentaje de pérdida de volumen de PHB pueden considerarse iguales ya que la masa y el volumen de PHB son proporcionales durante la fase de degradación que vamos a modelar (pérdida de peso mediante la formación y disolu-

ción de oligómeros y monómeros solubles en agua). El volumen de la fibra corresponde al volumen de un cilindro muy largo. El porcentaje de cambio de volumen corresponde al porcentaje de cambio en el área del círculo transversal ($\pi D^2/4$).

$$\%masa(t) = - \frac{100 - 99}{52} t_{semanas} 100$$

$$\%V(t) = - \frac{100 - 99}{52} t_{semanas} + 100$$

$$\% \left(\frac{\pi D^2(t)}{4} \right) = - \frac{100 - 99}{52} t_{semanas} + 100$$

$$D(t) = D_{ini} \sqrt{1 - 1,14 \times 10^{-6} t_{horas}}$$

El tamaño de poro (PS) se midió en unidades lineales. Considerando al poro como un círculo de diámetro D:

$$D_{poro} = D_{poro_{ini}} + D_{fibra_{ini}} \sqrt{1 - 1,14 \times 10^{-6} t_{horas}}$$

La pérdida de volumen de PHB (que es estimada en relación al diámetro del poro) se relaciona con la porosidad.

$$porosidad = 1 - porosidad_{ini} (1 - 1,14 \times 10^{-6} t_{horas})$$

Dentro de la estructura, el peso molecular del material cambia a medida que se produce la hidrólisis de las cadenas poliméricas (Figura 7). Una cadena polimérica soluble de bajo peso molecular puede difundir a través de la membrana y desprenderse del material (degradación por corrosión).

La Figura 8 muestra la cinética de la liberación de NGF y GDNF encapsulados en el scaffold. Estos datos fueron extraídos de la bibliografía.

Las Células de Schwann liberan NGF y GDNF cuando no están formando mielina, en contacto con el nervio sano. Las tasas de liberación in vitro de estos factores neurotróficos son los siguientes [11,22]

$$NGF_{cell} = 2,3 \cdot 10^{-20} \frac{mg}{cell \cdot s}$$

$$GDNF_{cell} = 2,8 \cdot 10^{-20} \frac{mg}{cell \cdot s}$$

El NGF promueve la muerte celular en las células de Schwann [23–26]. El GDNF produce quimiotaxis en las Células de Schwann. Si bien una cantidad moderada puede promover la migración celular, una cantidad excesiva puede generar atrapamiento de nervio. Es decir, si existe demasiado GDNF en el medio durante la regeneración axonal, las Células de Schwann que dirigen la regeneración pueden quedar ancladas en un lugar produciendo la formación de un muñón y deteniendo la regeneración direccional [27].

También se utilizó información de la bibliografía para caracterizar el ciclo celular. De la hoja de datos de las células SCL 4.1/F7, se extrajo la duración del ciclo celular. La duración de cada fase del ciclo celular, se aproximó a partir de lo reportado por Cooper [28]: para una célula típica de rápida proliferación con un ciclo total de 24 horas, la fase G1 podría durar aproximadamente 11 horas, la fase S aproximadamente 8 horas, G2 aproximadamente 4 horas y M aproximadamente 1 hora. Ver Figura 9.

Después de la mitosis hay un período refractario en que no puede existir mitosis [29]. La célula puede entrar en un estado de “cell cycle arrest” en que deja de reproducirse [29].

Las células SCL 4.1/F7 presentan un comportamiento de inhibición por contacto. Esto significa que cuando llegan a la confluencia y están rodeadas de otras células, dejan de dividirse.

Durante la división celular (mitosis), las células se despegan del sustrato y pierden su motilidad (no migran) [30].

Modelo formal. En base a los datos recopilados y al modelo conceptual previamente formulado se definió un modelo formal. Como se mencionó anteriormente, se definieron dos submodelos: un modelo basado en agentes y un modelo continuo de difusión-reacción. La Figura 10 muestra el diagrama de clase.

Los modelos basados en agentes híbridos multiescala se implementan superponiendo múltiples capas de información [31]. Seguimos esta metodología y definimos dos capas: una para el medio y otra para el agente.

La capa correspondiente al medio contiene información de cada molécula extracelular que difunde (L) y está discretizada en una grilla uniforme (Δx , Δy , Δz). La grilla discreta se describe mediante los siguientes parámetros: i aumenta en la dimensión x , j aumenta en la dirección y , k aumenta en la dirección z (ver sistema de coordenadas en Figura 11). La concentración local de una molécula extracelular es L_i, j, z . La capa correspondiente al agente, también discretizada en una grilla, contiene información de los agentes, proporcionando un marco para el movimiento, comportamiento e interacción de los agentes. Los agentes de esta capa interactúan con la capa del medio extracelular entre posiciones correspondientes. Por simplicidad, hemos optado por aplicar la misma discretización espacial para ambas grillas. De esta manera se simplifica el mapeo entre ambas capas ya que no es necesario aplicar interpolación. Tamaño de celda: $32\mu\text{m}$ de lado (estimado del tamaño del pocillo + confluencia y de tamaño de células en Gnavi *et al.* [18] y Lezcano *et al.* [6]).

La Figura 12 muestra el origen de la liberación de factores neurotróficos al medio (célula y scaffold) y cómo se considera la difusión de dichos factores entre las celdas del modelo. El submodelo continuo que compone el modelo híbrido multiescala desarrollado consiste en un modelo que define la liberación y difusión de factores neurotróficos en el sistema.

Este fenómeno se define mediante la siguiente ecuación, la cual corresponde a la ley de difusión de Fick en coordenadas hexagonales (ver sistema de coordenadas hexagonales en Figura 11):

$$\frac{\partial C(x, y, z, t)}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial z^2} \right) \quad (2)$$

Para resolver la ecuación (2), aplicamos el método numérico Forward-Time Central-Space (FTCS).

En primer lugar, realizamos expansiones de Taylor:

Expansión en t:

$$C(x, y, z, t + \Delta t) = C(x, y, z, t) + \frac{\partial C(x, y, z, t)}{\partial t} \Delta t + O(\Delta t^2)$$

$$\frac{\partial C(x, y, z, t)}{\partial t} = \frac{C(x, y, z, t + \Delta t) - C(x, y, z, t)}{\Delta t} + O(\Delta t)$$

$$\left. \frac{\partial C}{\partial t} \right|_{i,j,k,n} = \frac{C_{i,j,k,n+1} - C_{i,j,k,n}}{\Delta t} + O(\Delta t) \quad (3)$$

Expansión en x:

$$C(x + \Delta x, y, z, t) = C(x, y, z, t) + \frac{\partial C(x, y, z, t)}{\partial x} \Delta x + \frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial x^2} \frac{1}{2} \Delta x^2$$

$$C(x - \Delta x, y, z, t) = C(x, y, z, t) - \frac{\partial C(x, y, z, t)}{\partial x} \Delta x + \frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial x^2} \frac{1}{2} \Delta x^2$$

$$C(x + \Delta x, y, z, t) + C(x - \Delta x, y, z, t) = 2 C(x, y, z, t) + \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \Delta x^2 + O(x^4)$$

$$\frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial x^2} = \frac{C(x + \Delta x, y, z, t) - 2C(x, y, z, t) + C(x - \Delta x, y, z, t)}{\Delta x^2} + O(\Delta x^2)$$

$$\left. \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right|_{i,j,k,n} = \frac{C_{i+1,j,k,n} - 2C_{i,j,k,n} + C_{i-1,j,k,n}}{\Delta x^2} + O(\Delta x^2) \quad (4)$$

Expansión en y (siguiendo la misma lógica que para x):

$$\left. \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right|_{i,j,k,n} = \frac{C_{i,j+1,k,n} - 2C_{i,j,k,n} + C_{i,j-1,k,n}}{\Delta y^2} + O(\Delta y^2) \quad (5)$$

Expansión en z (siguiendo la misma lógica que para x):

$$\left. \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right|_{i,j,k,n} = \frac{C_{i,j,k+1,n} - 2C_{i,j,k,n} + C_{i,j,k-1,n}}{\Delta z^2} + O(\Delta z^2) \quad (6)$$

Reemplazando (3), (4), (5) y (6) en (2):

$$\begin{aligned} \frac{C_{i,j,k,n+1} - C_{i,j,k,n}}{\Delta t} &= D \left(\frac{C_{i+1,j,k,n} - 2C_{i,j,k,n} + C_{i-1,j,k,n}}{\Delta x^2} + \frac{C_{i,j+1,k,n} - 2C_{i,j,k,n} + C_{i,j-1,k,n}}{\Delta y^2} \right. \\ &\quad \left. + \frac{C_{i,j,k+1,n} - 2C_{i,j,k,n} + C_{i,j,k-1,n}}{\Delta z^2} \right) \end{aligned} \quad (7)$$

Reordenando (7) y reemplazando Dx, Dy y Dz por DL ya que Dx = Dy = Dz:

$$\begin{aligned} C_{i,j,k,n+1} &= C_{i,j,k,n} \\ &\quad - \frac{D\Delta t}{\Delta L^2} (6C_{i,j,k,n} - C_{i+1,j,k,n} - C_{i-1,j,k,n} - C_{i,j+1,k,n} - C_{i,j-1,k,n} - C_{i,j,k+1,n} \\ &\quad - C_{i,j,k-1,n}) \end{aligned} \quad (8)$$

$$C_{i,j,k,n+1} = C_{i,j,k,n} - \frac{D\Delta t}{\Delta L^2} \sum (C_{i,j,k,n} - C_{neighbor,n}) \quad (9)$$

El método FTCS tiene una precisión temporal de $O(\Delta t)$ y una precisión espacial de $O(\Delta x^2, \Delta y^2, \Delta z^2)$, mientras que su costo computacional es de $O(n^2)$ por step [31].

Mediante el método de von Neumann, se obtiene el siguiente criterio de estabilidad:

$$\frac{D\Delta t}{\Delta L^2} \leq \frac{1}{6} \quad (10)$$

Valor de D: se buscó el tamaño de las moléculas de NGF y GDNF, y a partir de este valor, se calculó la constante de difusividad según Torres et al. (2012).

NGF: 26 kDa [21] → Difusividad DNGF = $1,69 \times 10^{-10}$ [m²/s] [32]
 GDNF: 24 kDa [21] → Difusividad DGNF = $1,73 \times 10^{-10}$ [m²/s] [32]

Según el criterio de von Neumann y los valores de difusividad para el NGF y el GDNF, la duración del step para la difusión deberá ser:

$$\Delta t = \frac{\Delta L^2}{6D} \Rightarrow \Delta t \cong 1s$$

(11)

La metodología para determinar Δt coincide con publicaciones previas [31,33,34] most applications have been to organisms at higher trophic levels, where the importance of population heterogeneity (intra-population variability. Ver relación entre los steps en Figura 13.

Análisis de los resultados. Se simularon las primeras 6 horas de incubación para un experimento de proliferación celular sobre scaffolds con diferente tamaño de fibra, sin factores neurotróficos, y para un scratch assay o wound healing assay (cierre de herida). Se espera, en el futuro, correr más simulaciones para analizar períodos de hasta 24 horas variando también la concentración de factores de crecimiento.

Proliferación de las células. En los resultados (Figura 14), se puede observar que no hay diferencias significativas entre las curvas de proliferación obtenidas para cada tamaño de fibra. Posiblemente, debido a la distribución aleatoria de las células inicialmente, el efecto del tamaño de fibra en la motilidad celular tiene un impacto insignificante en la proliferación.

Se utilizaron los siguientes parámetros para correr la simulación:

period = 6 # hours	captured_NGF = 0 # ug
scaffold_width = 1.512 # mm	captured_GDNF = 0 # ug
scaffold_height = 1.512 # mm	medium_level = 2 # mm
step_duration = 1 # min	porosity = 70 # %
width = int(scaffold_width * 1000 / 32) # grid cells	thickness = 100 # um
height = int(scaffold_height * 1000 / 32) # grid cells	Mw = 200 # kDa
N = int(width * height / 3)	scratch = False
pore_size = 14 # um ²	repetitions = 10
fiber_thickness = [1, 5, 10] # um	

Scratch assay. En la Figura 15 se puede observar que, en el caso del scratch assay (o ensayo wound healing, cierre de heridas), la diferencia entre los scaffolds de diferente tamaño de fibra en cuanto a proliferación celular y migración celular es notoria. Esto es de suma importancia ya que en un escenario in vivo, durante la regeneración nerviosa, las células parten de un sector y migran hacia otro. Su distribución no es aleatoria en todo el espacio como en el caso anterior, sino que inicialmente las células están concentradas en un sector y migran en una misma dirección hacia una brecha libre

de Células de Schwann. En la Figura 15 se observa la relación entre el tamaño de fibra y tanto el número de células como el área libre de células en un ensayo de cierre de herida. Este resultado se corresponde con los hallazgos in vitro.

Se utilizaron los siguientes parámetros para la simulación:

period = 6 # hours	captured_NGF = 0 # ug
scaffold_width = 1.512 # mm	captured_GDNF = 0 # ug
scaffold_height = 1.512 # mm	medium_level = 2 # mm
step_duration = 1 # min	porosity = 70 # %
width = int(scaffold_width * 1000 / 32) # grid cells	thickness = 100 # um
height = int(scaffold_height * 1000 / 32) # grid cells	Mw = 200 # kDa
pore_size = 14 # um ²	scratch = True
fiber_thickness = [1, 5, 10] # um	repetitions = 10

En los resultados se observa una clara relación tanto entre el espesor de las fibras y la proliferación celular como en el espesor de la fibra y la velocidad de cierre de la brecha en el scratch assay (cierre de herida).

Asociado al modelo, se desarrolló una interfaz gráfica que permite ingresar los valores de las variables de entrada, correr el modelo y monitorizar las salidas en tiempo real.

4. Indicadores de producción

En el periodo del trabajo se publicaron seis artículos en revistas internacionales del cuartil Q1 de Scimago Journal & Country Rank (SJR).

Apablaza, J.A.; Lezcano, M.F.; Lopez Marquez, A.; Godoy Sánchez, K.; Oporto, G.H.; Dias, F.J. Main Morphological Characteristics of Tubular Polymeric Scaffolds to Promote Peripheral Nerve Regeneration—A Scoping Review. *Polymers* 2021, 13, 2563. <https://doi.org/10.3390/polym13152563>

Lopez Marquez, A.; Gareis, I.E.; Dias, F.J.; Gerhard, C.; Lezcano, M.F. How Fiber Surface Topography Affects Interactions between Cells and Electrospun Scaffolds: A Systematic Review. *Polymers* 2022, 14, 209. <https://doi.org/10.3390/polym14010209>

Lezcano, M.F.; Álvarez, G.; Chuhuaicura, P.; Godoy, K.; Alarcón, J.; Acevedo, F.; Gareis, I.; Dias, F.J. Polyhydroxybutyrate (PHB) Scaffolds for Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review of Animal Models. *Biology* 2022, 11, 706. <https://doi.org/10.3390/biology11050706>

Lopez Marquez, A.; Gareis, I.E.; Dias, F.J.; Gerhard, C.; Lezcano, M.F. Methods to Characterize Electrospun Scaffold Morphology: A Critical Review. *Polymers* 2022, 14, 467. <https://doi.org/10.3390/polym14030467>

Alarcón Apablaza, J.; Lezcano, M.F.; Godoy Sánchez, K.; Oporto, G.H.; Dias, F.J. Optimal Morphometric Characteristics of a Tubular Polymeric Scaffold to Promote Peripheral Nerve Regeneration: A Scoping Review. *Polymers* 2022, 14, 397. <https://doi.org/10.3390/polym14030397>

Lezcano, M.F.; Martínez-Rodríguez, P.; Godoy, K.; Hermosilla, J.; Acevedo, F.; Gareis, I.E.; Dias, F.J. Exploring Schwann Cell Behavior on Electrospun Polyhydroxybutyrate Scaffolds with Varied Pore Sizes and Fiber Thicknesses: Implications for Neural Tissue Engineering. *Polymers* 2023, 15, 4625. <https://doi.org/10.3390/polym15244625>

5. Bibliografía

1. Apablaza, J.A.; Lezcano, M.F.; Lopez Marquez, A.; Godoy Sánchez, K.; Oporto, G.H.; Dias, F.J. Main Morphological Characteristics of Tubular Polymeric Scaffolds to Promote Peripheral Nerve Regeneration—A Scoping Review. *Polymers (Basel)*. 2021, 13, doi:10.3390/polym13152563.
2. Lopez Marquez, A.; Gareis, I.E.; Dias, F.J.; Gerhard, C.; Lezcano, M.F. How Fiber Surface Topography Affects Interactions between Cells and Electrospun Scaffolds: A Systematic Review. *Polymers (Basel)*. 2022, 14, doi:10.3390/polym14010209.
3. Marquez, A.L.; Gareis, I.E.; Dias, F.J.; Gerhard, C.; Lezcano, M.F. Methods to Characterize Electrospun Scaffold Morphology: A Critical Review. *Polymers (Basel)*. 2022, 14, 1–22, doi:10.3390/polym14030467.
4. Alarcón, J.A.; Lezcano, M.F.; Sánchez, K.G.; Oporto, G.H.; Dias, F.J. Optimal Morphometric Characteristics of a Tubular Polymeric Scaffold to Promote Peripheral Nerve Regeneration: A Scoping Review. *Polymers (Basel)*. 2022, 14, doi:10.3390/polym14030397.
5. Lezcano, M.F.; Álvarez, G.; Chuhuaicura, P.; Godoy, K.; Alarcón, J.; Acevedo, F.; Gareis, I.; Dias, F.J. Polyhydroxybutyrate (PHB) Scaffolds for Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review of Animal Models. *Biology (Basel)*. 2022, 11, 1–17, doi:10.3390/biology11050706.
6. Lezcano, M.F.; Martínez-Rodríguez, P.; Godoy, K.; Hermosilla, J.; Acevedo, F.; Gareis, I.E.; Dias, F.J. Exploring Schwann Cell Behavior on Electrospun Polyhydroxybutyrate Scaffolds with Varied Pore Sizes and Fiber Thicknesses: Implications for Neural Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2023, 15, doi:10.3390/polym15244625.
7. Wainer, G.A. *Discrete-Event Modeling and A Practitioner ' s Approach*; CRC Press, 2017; ISBN 9781420053364.
8. Haefner, J.W. *Modeling Biological Systems: Principles and Applications*; Springer, 2005; ISBN 9780387250120.
9. Acevedo, F.; Villegas, P.; Urtuvia, V.; Hermosilla, J.; Navia, R.; Seeger, M. Bacterial Polyhydroxybutyrate for Electrospun Fiber Production. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 106, 692–697, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.066.
10. Sanhueza, C.; Hermosilla, J.; Bugallo-Casal, A.; Da Silva-Candal, A.; Taboada, C.; Millán, R.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Acevedo, F. One-Step Electrospun Scaffold of Dual-Sized Gelatin/Poly-3-Hydroxybutyrate Nano/Microfibers for Skin Regeneration in Diabetic Wound. *Mater. Sci. Eng. C* 2021, 119, 111602, doi:10.1016/j.msec.2020.111602.
11. Rutkowski, G.E.; Heath, C.A. Reaction - Diffusion Model. 2002, 362–372.
12. Rutkowski, G.E.; Heath, C.A. Development of a Bioartificial Nerve Graft . II . Nerve Regeneration in Vitro. 2002, 373–379.
13. Truskey, G. *Transport Phenomena in Biological Systems* 2004.
14. Grimm, V.; Berger, U.; Deangelis, D.L.; Polhill, J.G.; Giske, J.; Railsback, S.F. The ODD Protocol : A Review and First Update. 2010, 221, 2760–2768, doi:10.1016/j.ecolmodel.2010.08.019.
15. Bersini, H. UML for ABM. *J. Artif. Soc. Soc. Simul.* 2015, 15, 1–9.
16. Wen, X.; Tresco, P.A. Effect of Filament Diameter and Extracellular Matrix Molecule Precoating on Neurite Outgrowth and Schwann Cell Behavior on Multifilament Entubulation Bridging Device in Vitro. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2006, 76, 626–637, doi:10.1002/jbm.a.30520.

17. Wang, H.B.; Mullins, M.E.; Cregg, J.M.; McCarthy, C.W.; Gilbert, R.J. Varying the Diameter of Aligned Electrospun Fibers Alters Neurite Outgrowth and Schwann Cell Migration. *Acta Biomater.* 2010, 6, 2970–2978, doi:10.1016/j.actbio.2010.02.020.
18. Gnani, S.; Fornasari, B.E.; Tonda-Turo, C.; Ciardelli, G.; Zanetti, M.; Geuna, S.; Perroteau, I. The Influence of Electrospun Fibre Size on Schwann Cell Behaviour and Axonal Outgrowth. *Mater. Sci. Eng. C* 2015, 48, 620–631, doi:10.1016/j.msec.2014.12.055.
19. Gisbert Roca, F.; André, F.M.; Más Estellés, J.; Monleón Pradas, M.; Mir, L.M.; Martínez-Ramos, C. BDNF-Gene Transfected Schwann Cell-Assisted Axonal Extension and Sprouting on New PLA-PPy Microfiber Substrates. *Macromol. Biosci.* 2021, 21, 1–13, doi:10.1002/mabi.202000391.
20. Freier, T.; Kunze, C.; Nischan, C.; Kramer, S.; Sternberg, K.; Saß, M.; Hopt, U.T.; Schmitz, K.P. In Vitro and in Vivo Degradation Studies for Development of a Biodegradable Patch Based on Poly(3-Hydroxybutyrate). *Biomaterials* 2002, 23, 2649–2657, doi:10.1016/S0142-9612(01)00405-7.
21. Lackington, W.A.; Kočí, Z.; Alekseeva, T.; Hibbitts, A.J.; Kneafsey, S.L.; Chen, G.; O'Brien, F.J. Controlling the Dose-Dependent, Synergistic and Temporal Effects of NGF and GDNF by Encapsulation in PLGA Microparticles for Use in Nerve Guidance Conduits for the Repair of Large Peripheral Nerve Defects. *J. Control. Release* 2019, 304, 51–64, doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.001.
22. Kim, H.S.; Lee, J.; Lee, D.Y.; Kim, Y.D.; Kim, J.Y.; Lim, H.J.; Lim, S.; Cho, Y.S. Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair. *Stem Cell Reports* 2017, 8, 1714–1726, doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.011.
23. Jessen, K.R.; Mirsky, R. Signals That Determine Schwann Cell Identity. *J. Anat.* 2002, 200, 367–376, doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00046.x.
24. Soilu-Hänninen, M.; Ekert, P.; Bucci, T.; Syroid, D.; Bartlett, P.F.; Kilpatrick, T.J. Nerve Growth Factor Signaling through P75 Induces Apoptosis in Schwann Cells via a Bcl-2-Independent Pathway. *J. Neurosci.* 1999, 19, 4828–4838, doi:10.1523/jneurosci.19-12-04828.1999.
25. Petratos, S.; Butzkueven, H.; Shipham, K.; Cooper, H.; Bucci, T.; Reid, K.; Lopes, E.; Emery, B.; Cheema, S.S.; Kilpatrick, T.J. Schwann Cell Apoptosis in the Postnatal Axotomized Sciatic Nerve Is Mediated via NGF through the Low-Affinity Neurotrophin Receptor. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003, 62, 398–411, doi:10.1093/jnen/62.4.398.
26. Syroid, D.E.; Maycox, P.J.; Soilu-Hänninen, M.; Petratos, S.; Bucci, T.; Burrola, P.; Murray, S.; Cheema, S.; Lee, K.F.; Lemke, G.; et al. Induction of Postnatal Schwann Cell Death by the Low-Affinity Neurotrophin Receptor in Vitro and after Axotomy. *J. Neurosci.* 2000, 20, 5741–5747, doi:10.1523/jneurosci.20-15-05741.2000.
27. Cornejo, M.; Nambi, D.; Walheim, C.; Somerville, M.; Walker, J.; Kim, L.; Ollison, L.; Diamante, G.; Gdnf, N.G.F.Á.; Cell, Á. Effect of NRG1, GDNF, EGF and NGF in the Migration of a Schwann Cell Precursor Line. 2010, 1643–1651, doi:10.1007/s11064-010-0225-0.
28. Cooper, G. The Eukaryotic Cell Cycle. *The Cell: A Molecular Approach*; 2nd ed.; 2000;
29. Stallaert, W.; Kedziora, K.M.; Taylor, C.D.; Zikry, T.M.; Ranek, J.S.; Sobon, H.K.; Taylor, S.R.; Young, C.L.; Cook, J.G.; Purvis, J.E. The Structure of the Human Cell Cycle. *Cell Syst.* 2022, 13, 230-240.e3, doi:10.1016/j.cels.2021.10.007.
30. Dubois-Dalcq, M.; Rentier, B.; Baron, A.; Evercooren, N. Van; Burge, B.W. STRUCTURE AND BEHAVIOR SCHWANN OF RAT PRIMARY IN VITRO AND SECONDARY Rat Schwann Cells (SC), the Myelin-Form- Ing Cells of the Peripheral Nervous System

- , Can Now Be Cultured in Isolation by Using Two Different Techniques [l-3]. In the First, Rat Dor. 1981.
31. Cilfone, N.A.; Kirschner, D.E.; Linderman, J.J. Strategies for Efficient Numerical Implementation of Hybrid Multi-Scale Agent-Based Models to Describe Biological Systems. *Cell. Mol. Bioeng.* 2015, 8, 119–136, doi:10.1007/s12195-014-0363-6.
 32. Torres, J.F.; Komiya, A.; Okajima, J.; Shigenao, M. Measurement of the Molecular Mass Dependence of the Mass Diffusion Coefficient in Protein Aqueous Solutions. *Defect Diffus. Forum* 2012, 326–328, 452–458, doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.326-328.452.
 33. Hellweger, F.L.; Bucci, V. A Bunch of Tiny Individuals-Individual-Based Modeling for Microbes. *Ecol. Modell.* 2009, 220, 8–22, doi:10.1016/j.ecolmodel.2008.09.004.
 34. Azimi, M.; Jamali, Y.; Mofrad, M.R.K. Accounting for Diffusion in Agent Based Models of Reaction-Diffusion Systems with Application to Cytoskeletal Diffusion. *PLoS One* 2011, 6, doi:10.1371/journal.pone.0025306.

6. Figuras

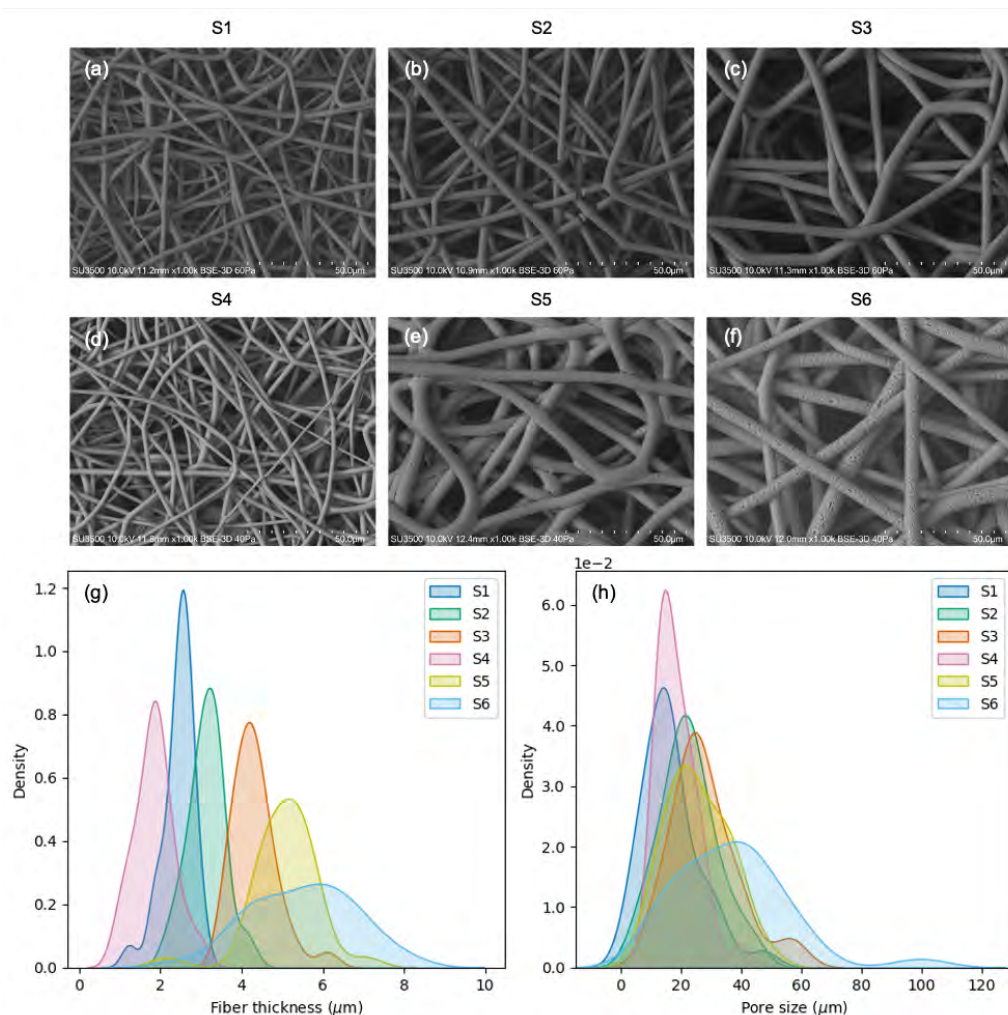


Figura 1. Caracterización morfológica de los scaffolds: (a-f) Imágenes SEM de todos los scaffolds electrohilados obtenidos; (g) *Kernel density estimate plots* para el espesor de la fibra; (h) *Kernel density estimate plots* para el tamaño de los poros.

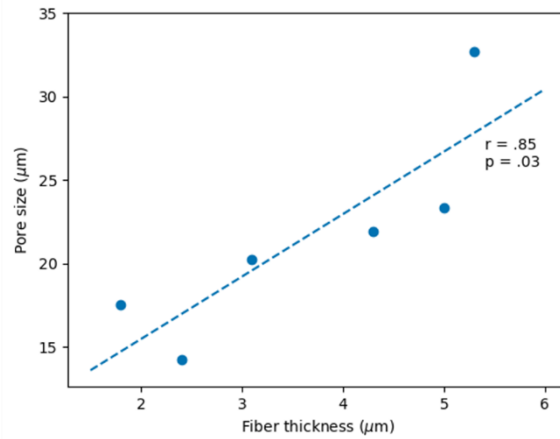


Figura 2. Correlación de Pearson correlation entre el tamaño de poro y el espesor de fibra ($r = .85$, $p = .03$).

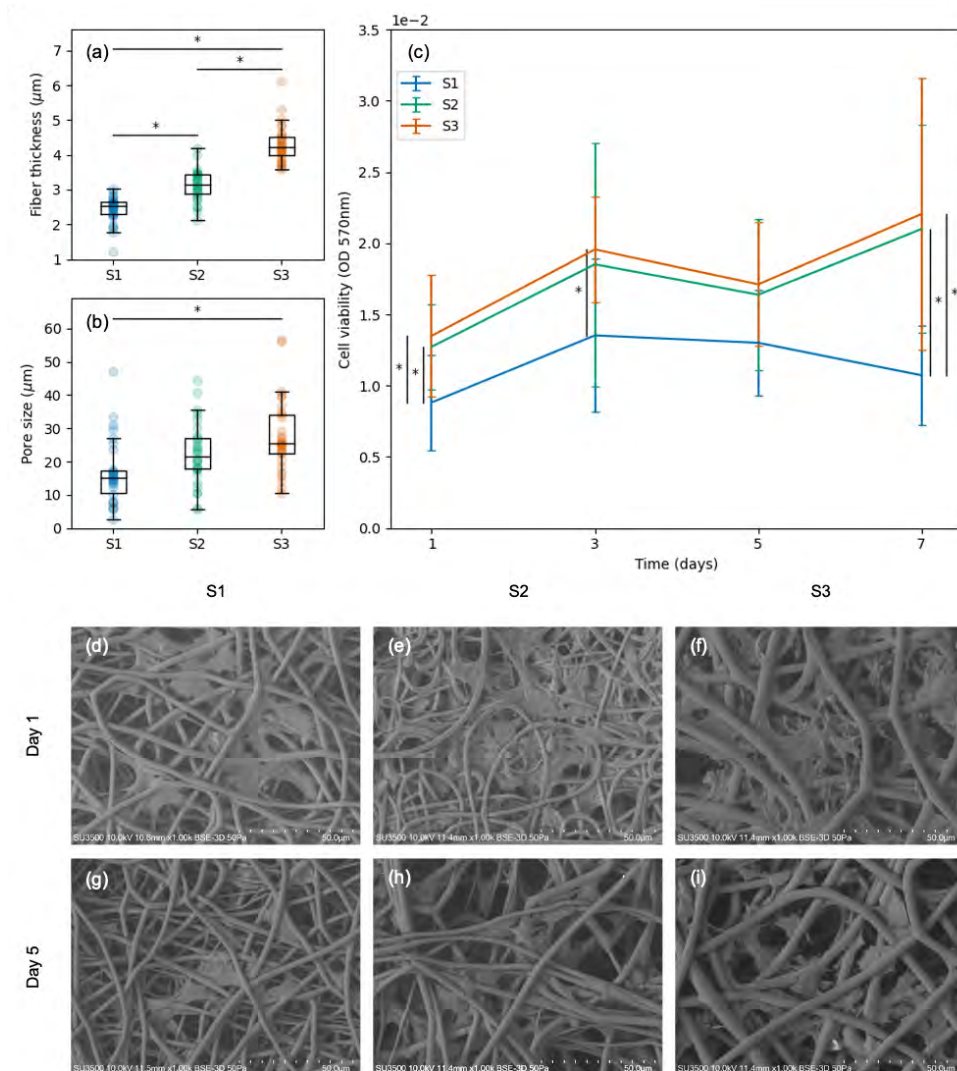


Figura 3. Células de Schwann cultivadas en tres scaffolds diferentes (S1, S2 y S3): (a) Distribución del espesor de la fibra de cada scaffold; (b) Distribución del tamaño de poro de cada scaffold; (c) Evaluación de la viabilidad celular (densidad óptica a 570nm) en los días 1, 3, 5 y 7; (d-f) Células adheridas a S1, S2 y S3 el día 1; (g-i) Células adheridas a S1, S2 y S3 el día 5. Las diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) están marcadas con*.

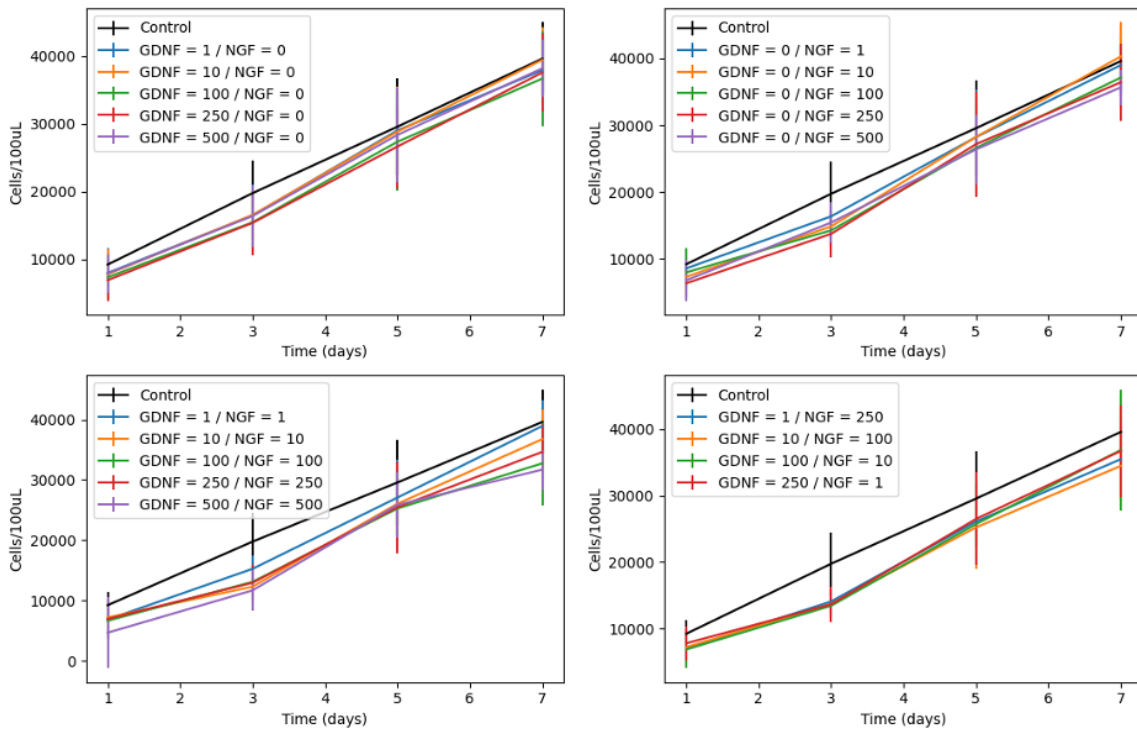


Figura 4. Ensayo de proliferación de células de Schwann para diferentes concentraciones y combinaciones de factores neurotróficos. (a) GDNF únicamente. (b) NGF únicamente. (c) Cantidades iguales de GDNF y NGF. (d) Diferentes cantidades de GDNF y NGF.

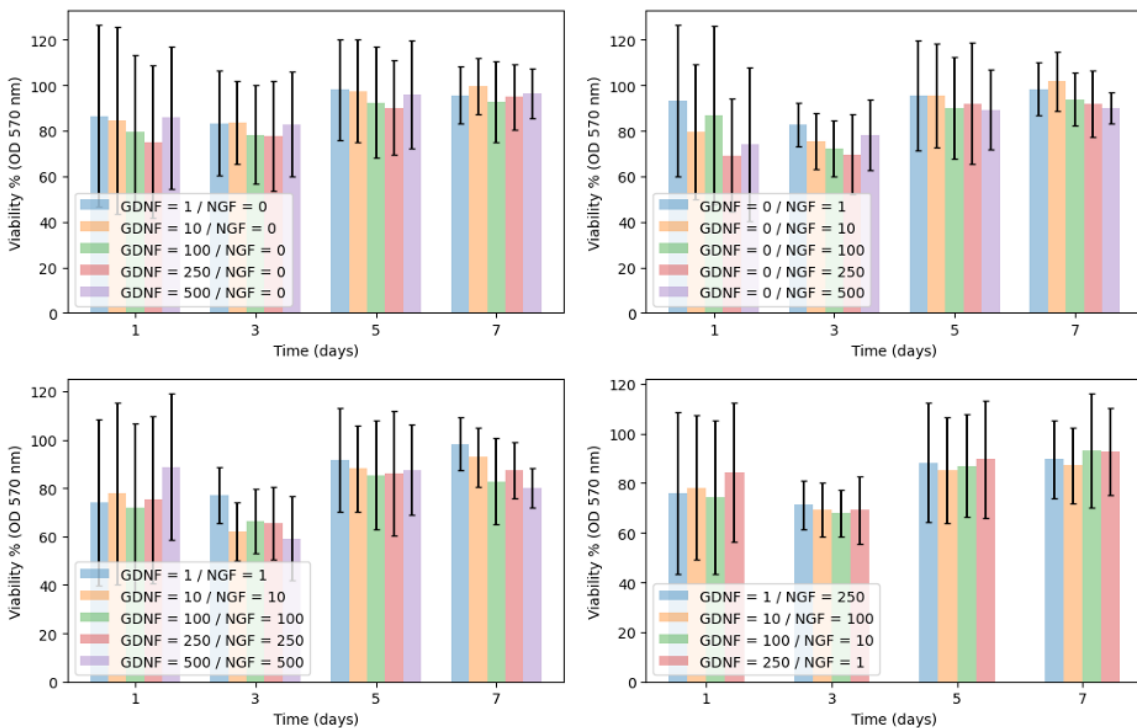


Figura 5. Ensayo de viabilidad de células de Schwann para diferentes concentraciones y combinaciones de factores neurotróficos. (a) GDNF únicamente. (b) NGF únicamente. (c) Cantidades iguales de GDNF y NGF. (d) Diferentes cantidades de GDNF y NGF.

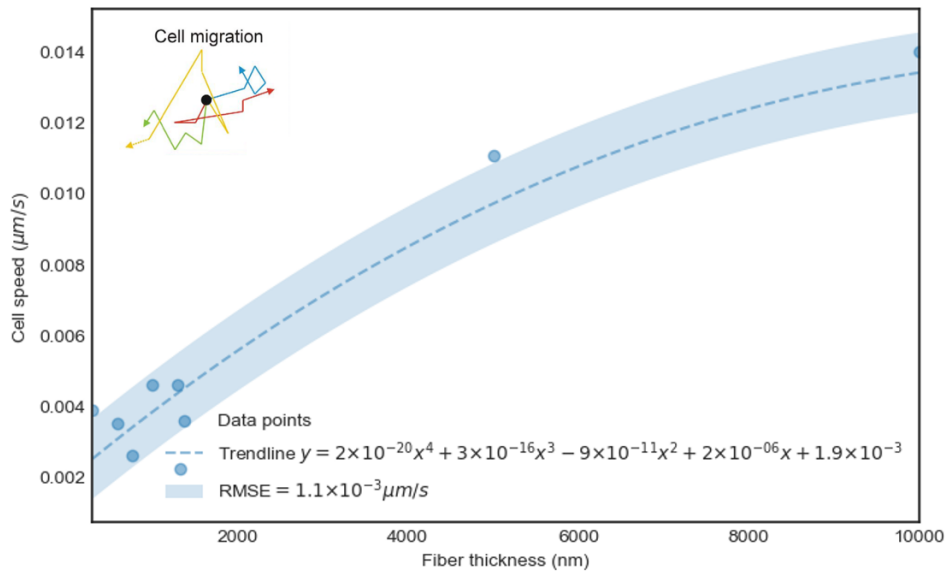


Figura 6. Generada con datos extraídos de [16–19] a number of studies suggest that a tremendous potential exists for developing biomaterial based therapies. In particular, biomaterials in the form of bridging substrates have been shown to support at least some level of axonal regeneration across the lesion site, but display a limited capacity for directing axons toward their targets. To improve the directionality and outgrowth rate of the axonal regeneration process, filaments and tubes appear promising, but the technology is far from optimized. As a step toward optimization, the influence of filament diameter and various extracellular matrix coatings on nerve regeneration was evaluated in this article using a dorsal root ganglion (DRG). Aproximación polinómica $R^2 = 0.9155$.

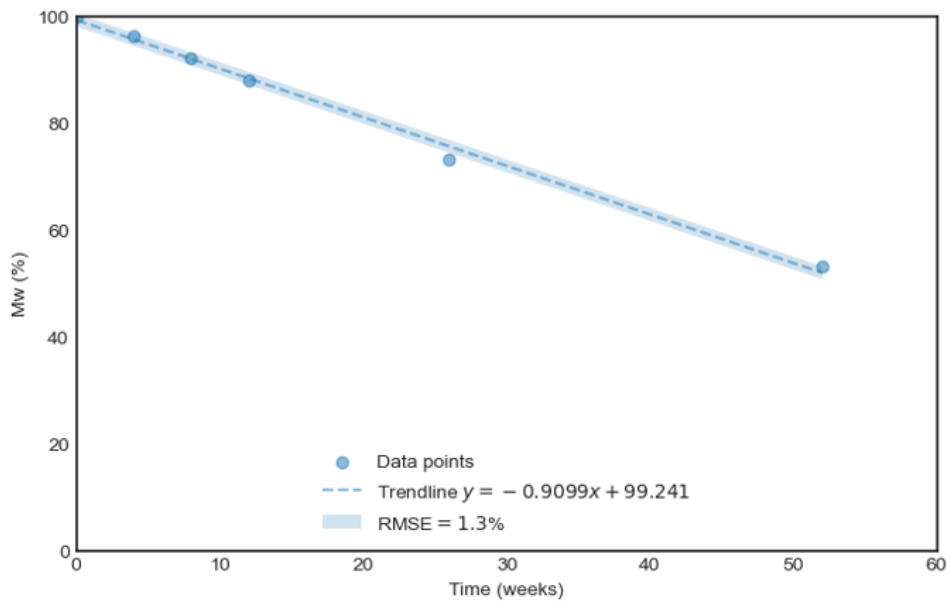


Figura 7. Evolución del peso molecular de la estructura de PHB (datos de Freier et al. [20]).

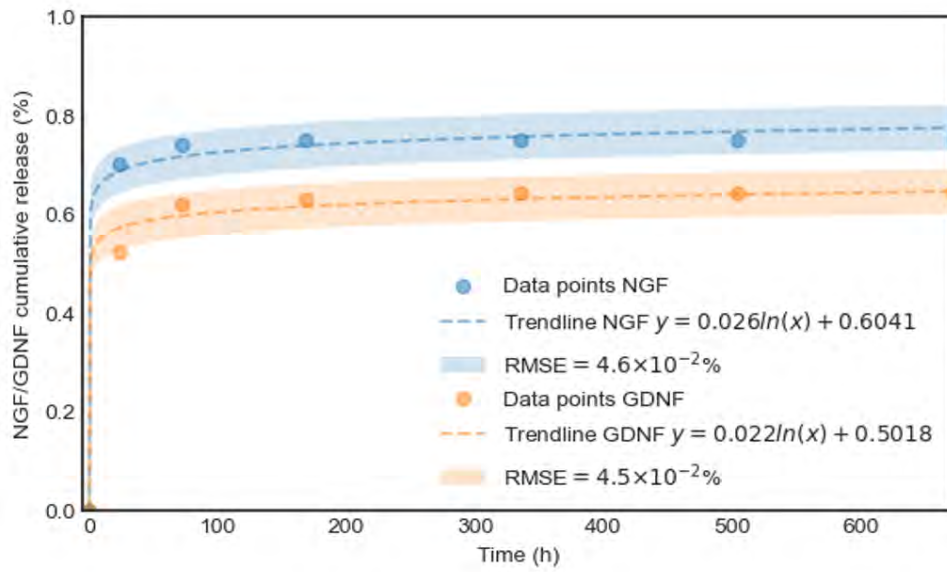


Figura 8. Liberación acumulativa de NGF y GDNF por polímeros cargados con factores no encapsulados [21]

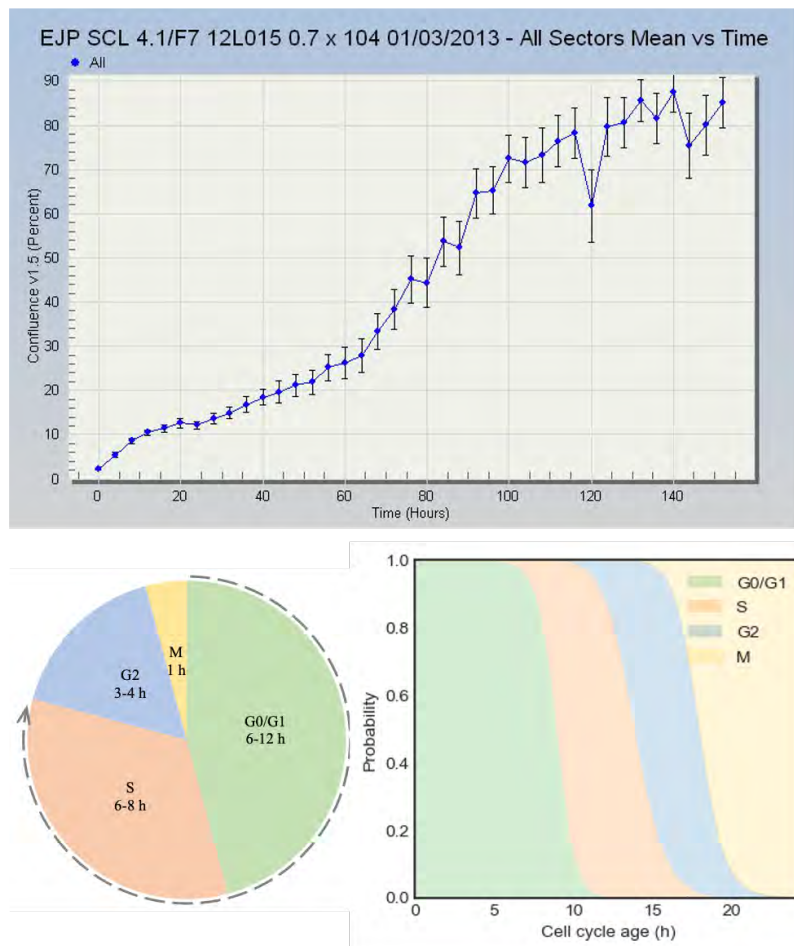


Figura 9. Arriba, curva de proliferación de las células SCL 4.1/F7, donde, en la parte recta de su evolución, se observa que el ciclo celular dura aproximadamente 24h. Abajo, aproximación de la duración de cada fase del ciclo celular según la hoja de datos de las SCL 4.1/F7 y Cooper [28].

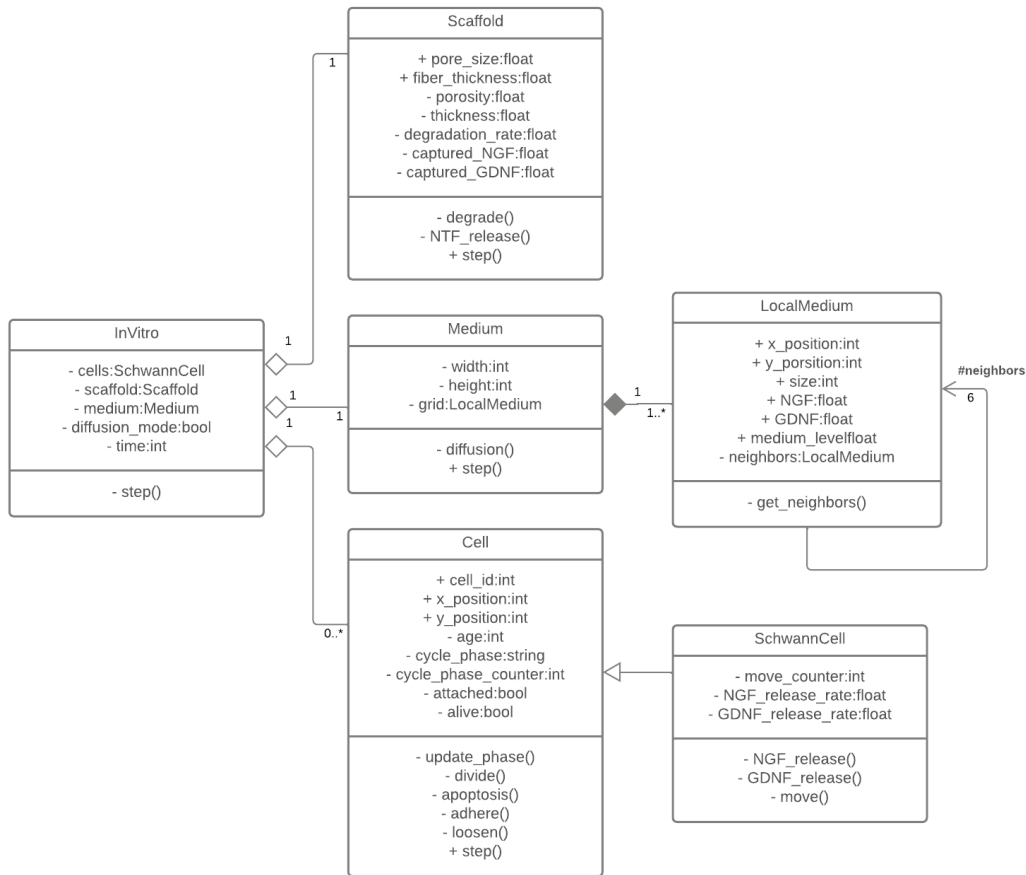


Figura 10. Diagrama de clase modelo híbrido multiescala.

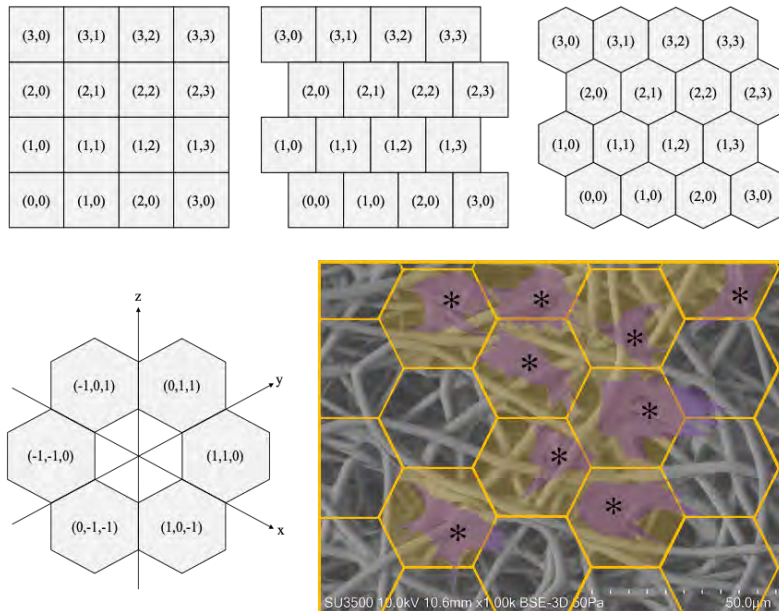


Figura 11. Arriba, relación entre grilla cuadrada y hexagonal. Abajo, sistema de coordenadas y superposición de grilla (a escala) sobre imagen SEM de células sobre scaffold: las células se marcan en color morado y con un asterisco, las celdas ocupadas por células están sombreadas con amarillo.

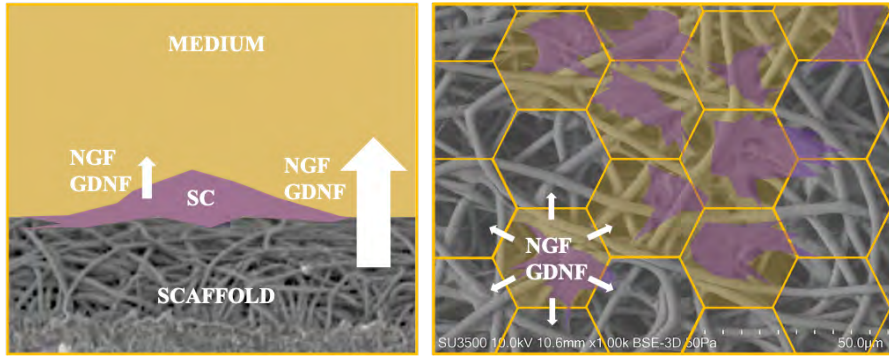


Figura 12. Izquierda, sistema scaffold-medio-célula y liberación de factores neurotróficos (NGF, GDNF) por parte del scaffold y de la célula. Derecha, difusión de factores neurotróficos a través del medio atravesando los límites de las celdas del modelo.

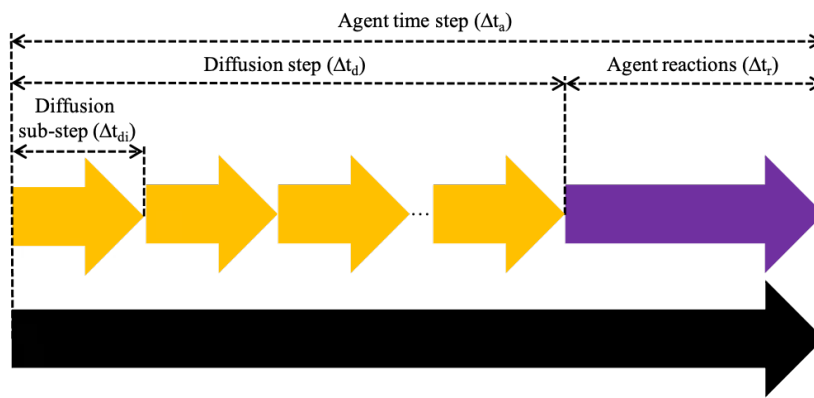


Figura 13. Time steps del modelo. En este esquema puede observarse claramente la condición multiescala del modelo.

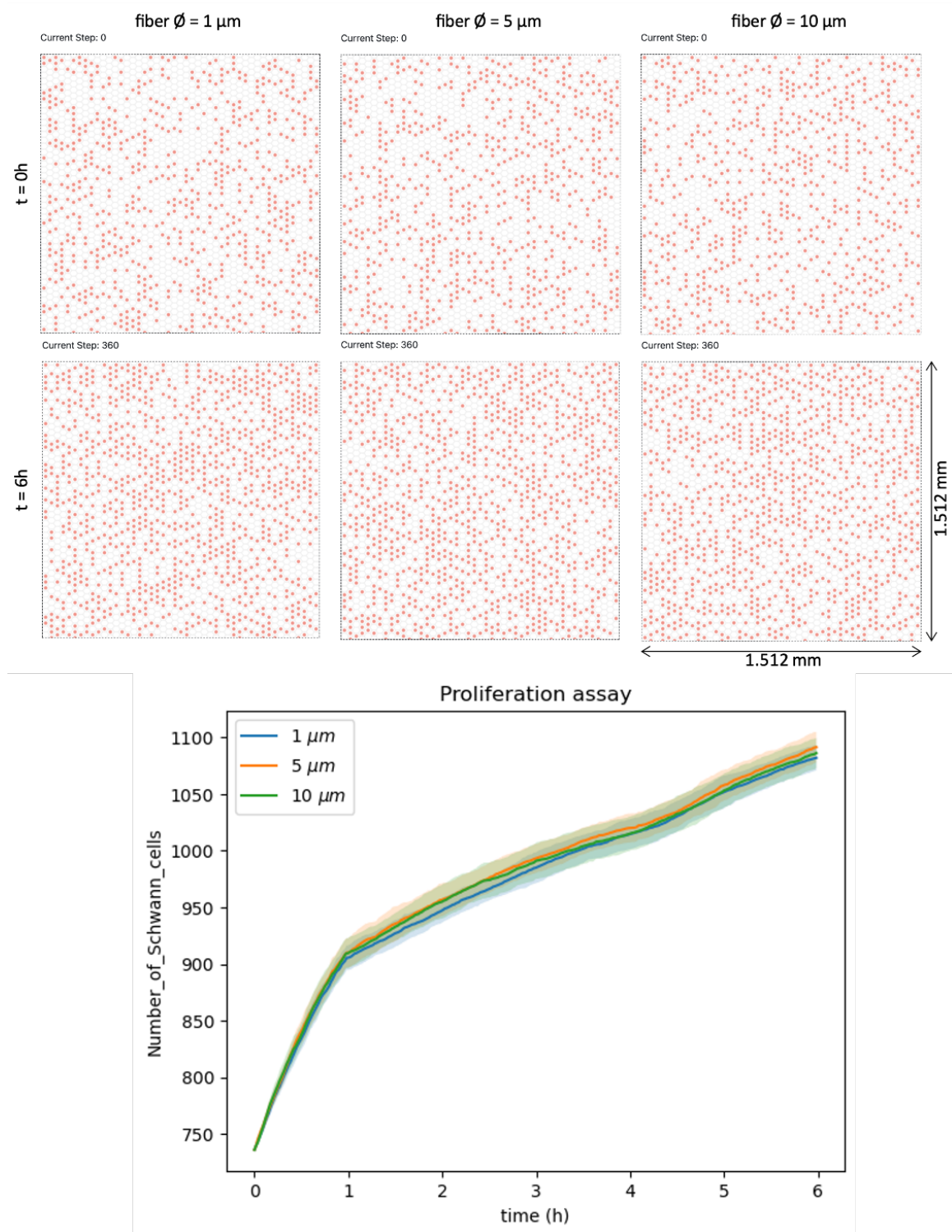


Figura 14. Arriba, condición inicial (t=0) y final (t=6h) de las células sobre tres scaffolds con diferente tamaño de fibra (1μm, 5μm y 10μm). Abajo, evolución del número de células para cada tamaño de fibra.

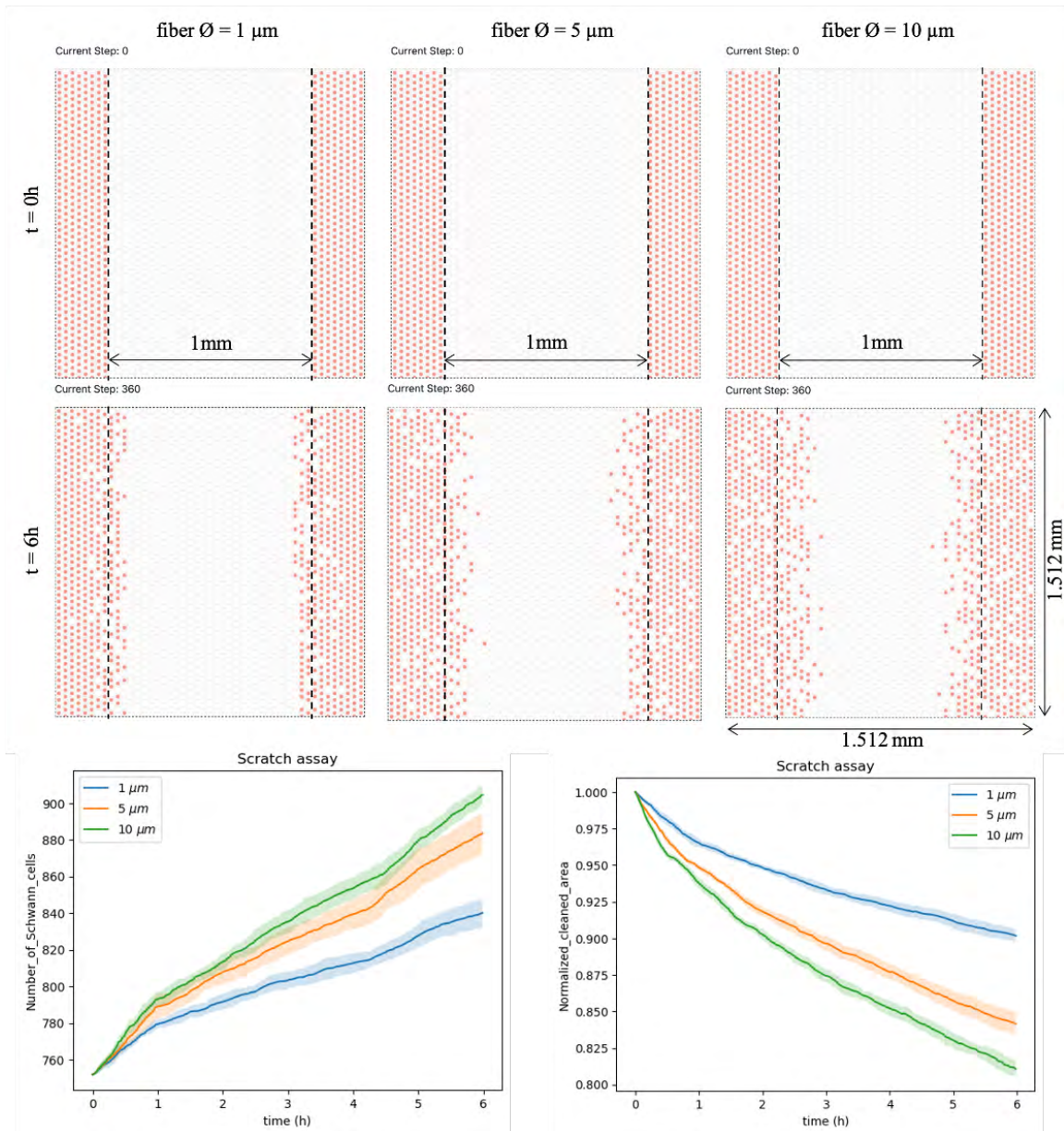


Figura 15. Arriba, condición inicial ($t=0$) y final ($t=6h$) de las células sobre tres scaffolds con diferente tamaño de fibra durante un scratch assay. Abajo, evolución del número de células y del área libre de células para los diferentes tamaños de fibra.

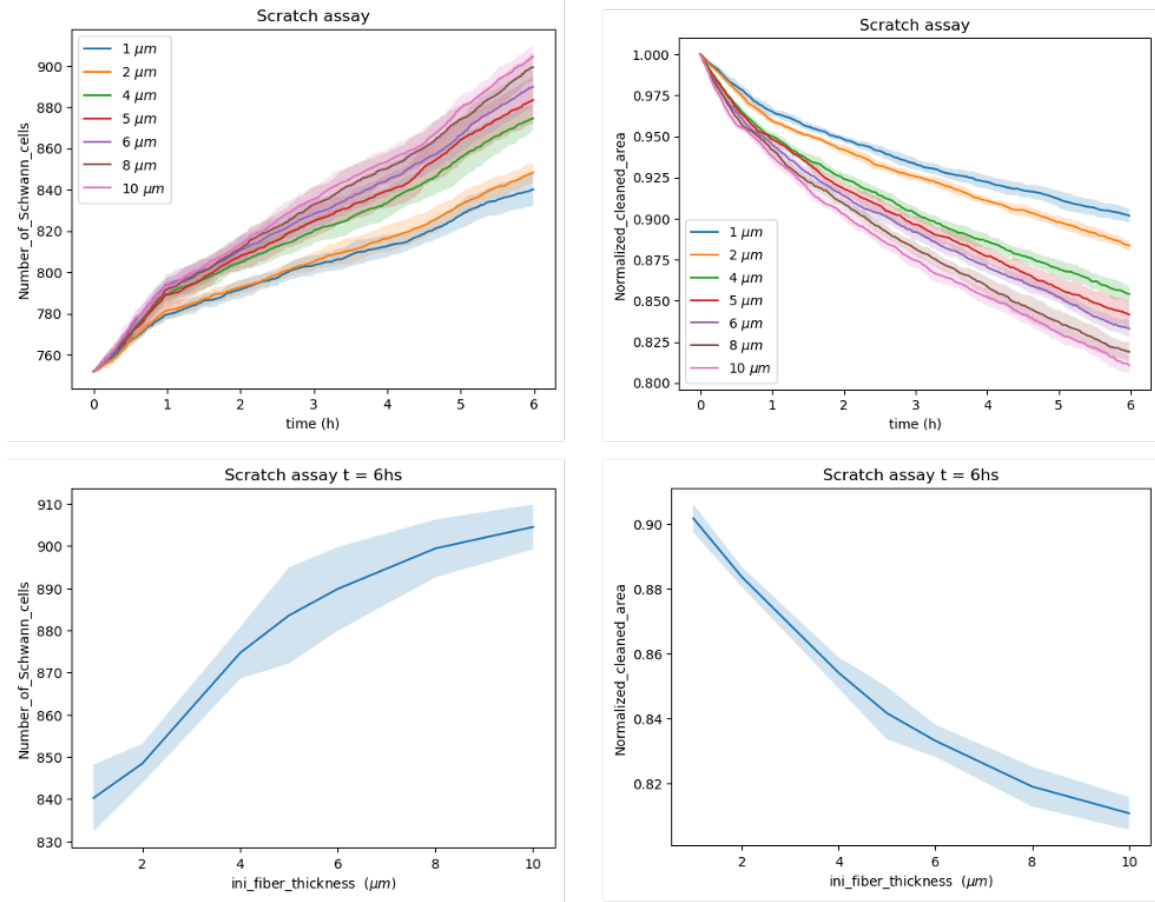


Figura 16. Arriba, evolución del número de células y del área libre en un scratch assay sobre células sembradas en scaffolds con diferente tamaño de fibra. Abajo, relación entre el tamaño de la fibra y tanto el número de células como el área libre de células en un scratch assay.

PID 6213

Denominación del Proyecto

Optimización del diseño de un scaffold bioabsorbible para regeneración de nervios periféricos mediante modelización y simulación computacional

Director

Gareis, Ivan Emilio

Codirector

Rufiner, Hugo Leonardo

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería

Contacto

ivan.gareis@uner.edu.ar

Cátedra/s, área o disciplina científica

Laboratorio de Cibernética. Disciplina Modelización de Sistemas.

Instituciones intervinientes públicas o privadas:

Universidad de la Frontera (Chile)

Integrantes del proyecto

Docentes UNER: Pais, Carlos Marcelo, Lezcano, María Florencia. Integrante externo: Dias, Fernando José (Universidad de la Frontera - Chile)

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

02/03/2020 y 22/01/2024

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 112/24 (26-04-2024)