

TÉCNICAS DE ULTRASONIDO: UNA HERRAMIENTA POTENCIAL PARA LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Irastorza R.M.^{1,2}, Achilli M.³, Amadei M.³, Blangino E.⁴, Drouin B.³ y Mantovani D.³

¹ Grupo de Aplicaciones Matemáticas y Estadísticas de la Facultad de Ingeniería (GAMEFI), Área Básica, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata. E-mail: rirastorza@iflysib.unlp.edu.ar.

² Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB), CCT-CONICET-La Plata.

³ Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Department of Materials Engineering, Laval University & University Hospital Research Center, Quebec City, G1K 7P4, Canada.

⁴ Laboratorio de Biomecánica, Departamento de Ingeniería Mecánica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires.

Palabras claves: geles de colágeno, ultrasonido, ensayos mecánicos, scaffolds, biomateriales.

Resumen. El objetivo de este trabajo es desarrollar dos montajes experimentales para la evaluación de las propiedades acústicas de hidrogeles de colágeno y para estudiar su correlación con las propiedades mecánicas. El primero permite estimar la velocidad del sonido, atenuación e impedancia acústica de las muestras manejando la temperatura. En el segundo, la configuración anterior se combina con un ensayo mecánico de compresión, lo que permite interrogar al mismo tiempo, tanto propiedades acústicas como mecánicas de la muestra. Se observan las propiedades acústicas y mecánicas de los geles de colágeno preparados de acuerdo a diferentes condiciones experimentales: pH y la concentración de colágeno. La variación de estos parámetros permite modificar las condiciones mecánicas de la matriz.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la ingeniería de tejidos está siendo aplicada para su utilización en el reemplazo de arterias de bajo calibre [1]. Básicamente se busca "crecer" en bioreactores el tejido de interés utilizando células sembradas en una matriz (scaffold). El material elegido para las matrices se selecciona de tal manera que constituya un ambiente amigable para las células. El polímero natural mayormente utilizado es el colágeno [2]. Para la fabricación de estas matrices es habitual utilizar hidrogeles con bajo contenido de colágeno [3]. Estos hidrogeles, si bien mantienen una afinidad biológica con las células, pierden las propiedades mecánicas del tejido de donde fue extraído (i.e. tendones de colas de rata, tendón de aquiles bovino). Por esta razón se busca mejorar las propiedades mecánicas mediante diferentes métodos: generando crosslinking (i.e.: rayos UV [4] o mediante el uso de glutaraldehído), variando la concentración de colágeno o el pH de la solución, entre otros[3]. La evaluación de las propiedades mecánicas de tales matrices altamente hidratadas es un desafío porque implica métodos invasivos y finalmente destructivos. Esto, naturalmente, no permite su aplicación en bioreactores, con lo cual no es posible monitorear una evolución in vitro. Los ensayos basados en ultrasonido pueden representar una de las herramientas adecuadas para investigar las propiedades mecánicas de estos materiales.

Los aportes de la comunidad científica al estudio de las propiedades acústicas del colágeno provienen mayormente del estudio de gelatinas animales. Un gran número de mediciones en fantasmas de gelatinas en diferentes concentraciones y mezclados con dispersores (para su uso en elastografía y sistemas médicos de ultrasonido) han sido ampliamente desarrollados y caracterizados[5]. Por el contrario, el colágeno en geles a nuestro conocimiento, no ha sido caracterizado aún.

En este trabajo se busca, en primera instancia, caracterizar acústicamente los geles de colágeno con diferentes propiedades mecánicas, esto se logra utilizando distintas concentraciones y usando soluciones con diferente pH (ver sección 2.1). Por esta razón, en

la sección 2.2 se desarrolla un experimento a temperatura controlada en el cual se determinan los parámetros acústicos de los geles estudiados. En la sección 2.3 se describe un experimento que intenta echar luz al segundo objetivo de este trabajo: el estudio de las correlaciones entre la velocidad del sonido y los parámetros mecánicos de éstos geles. En ambos experimentos se realizan los análisis estadísticos pertinentes. En la sección 3 se discuten los resultados en cada uno de los experimentos. Finalmente, en la sección 4 se comentan las conclusiones y algunos trabajos futuros en relación a esta línea de investigación.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Preparación de muestras. Una solución de colágeno tipo I (4 g /L) y 0.02 M de ácido acético se obtuvieron de tendones de colas de rata (de sus siglas en inglés, rat tails tendon RTTs) de acuerdo con el procedimiento publicado en [6]. Los geles de colágeno fueron preparados con dos diferentes pH finales (7, 10) y con tres diferentes concentraciones de colágeno (1.6, 2, 2.4 g/L, se denominaron C_1 , C_2 , C_3 , respectivamente) de acuerdo con un plan factorial. La solución de colágeno (ácida) fue mezclada con una solución 4M de NaCl y 1M de NaOH con diferentes proporciones de tal manera de obtener soluciones de colágeno a pH 10 con las tres diferentes concentraciones de colágeno. Para todas estas soluciones de colágeno las concentraciones finales de NaCl fue 130mM. Las soluciones de colágeno a pH 7 se obtuvieron agregando 1M de una solución tampón (denominada HEPES). En este caso, la concentración final de HEPES fue 20mM. El volumen final fue ajustado con agua desionizada.

Las soluciones de colágeno fueron vertidas en recipientes tipo Petri (35 x 10 mm², Cell Culture Dishes, Corning Inc., Wilkes Barre, PA, USA), inmediatamente después las muestras fueron refrigeradas a 4°C durante 45 minutos a partir de los cuales se dejó a temperatura ambiente para permitir el proceso de gelificación.

Las muestras resultantes se caracterizaron con dos procedimientos diferentes: ensayos mecánicos de compresión y ensayos de ultrasonido.

Además, se prepararon algunas soluciones de NaCl y muestras de gelatina animal tipo A para la validación del setup experimental, estos datos no serán mostrados en este trabajo.

2.2 Experimento 1: caracterización de propiedades acústicas de los geles. Las muestras gelificadas (n=3 para cada concentración y pH) en forma de disco de 35mm de diámetro y altura variable (<10mm) fueron depositadas cuidadosamente en un recipiente (celda) controlado térmicamente para su caracterización acústica. Se midió de a una muestra por vez con intervalos de 5 minutos entre medición. La medición se realizó luego de estabilizar la temperatura a 20°C (aproximadamente 5 minutos).

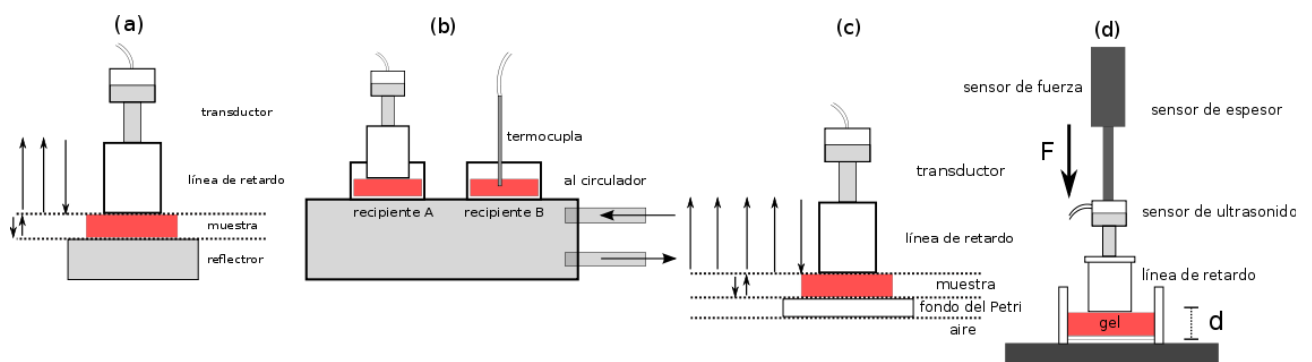


Figura 1: (a) Experimento 1. Arreglo experimental de ultrasonido: transductor, línea de retardo y reflector. (b) Arreglo experimental de ultrasonido, control de temperatura y celda de medición. (c) Experimento 2 Ecos en el recipiente Petri. (d) Mediciones mecánicas y de ultrasonido realizadas simultáneamente.

El experimento se basa en el trabajo de McClements y Fairley [7]. Brevemente, la medición se realizó en una configuración del tipo pulso-eco con una línea de retardo de características

acústicas conocidas. El arreglo experimental consistió en un transductor sintonizado de ultrasonido (Ultran LRD25-10, con frecuencia central 10 MHz) seguido de una línea de retardo (longitud 16mm y diámetro 15.6mm ver la Fig.1 (a)). El transductor fue excitado con un generador de onda (Ultran) en modo reflexión. Las señales provenientes de la muestra fueron analizadas usando un osciloscopio digital HP 54616B 500MHz 2 GMuestras/seg). Se adquirió un total de 5000 puntos por señal que se enviaron a una computadora mediante la interfase serie utilizando una rutina escrita en Matlab.

Una vez que las señales fueron digitalizadas se estimaron los siguientes parámetros acústicos: velocidad del sonido (SOS), atenuación (α_s) e impedancia acústica (Z_s). SOS se obtuvo fijando el ancho de la muestra a $D=5\text{mm}$ y midiendo la diferencia de tiempo entre el primer y segundo eco. El primer eco se debe a la interface línea de retardo / muestra y el segundo a muestra / superficie reflectora metálica (fondo del recipiente A, reflector total). La impedancia acústica fue calculada usando un medio de referencia (agua desionizada $Z_w=1.4796 \times 10^6 \text{ kgm}^{-2}\text{seg}^{-1}$ a 20°C ver referencia [7]). Este parámetro fue utilizado para calcular la atenuación, de esta manera, las mediciones de impedancia acústica y atenuación están referenciadas a los parámetros del agua desionizada.

El control de la temperatura fue implementado mediante un crióstato (circulador) y una celda especialmente diseñada. La celda tiene dos recipientes (ver Fig.1 (b)): en el primero se midieron las propiedades acústicas y en el segundo la temperatura mediante una termocupla (OMEGA, conectada a un i-Series 1/32 Programmable Temperature/Process Meters). Los datos se adquirieron mediante una interface serie también con una rutina en Matlab.

2.3 Experimento 2: Propiedades acústicas y mecánicas en compresión. El objetivo de este experimento fue monitorear la velocidad de sonido en la muestra durante un ensayo mecánico de compresión, midiendo simultáneamente propiedades mecánicas y acústicas en la misma muestra [8]. Las muestras en forma de disco mencionadas previamente se ensayaron mecánicamente en un test de compresión mientras en la misma celda de fuerza se colocó el transductor de ultrasonido. El plato de compresión consistió en el transductor de ultrasonido unido a la línea de retardo, mencionado en la subsección anterior. En consecuencia, el plato de compresión en contacto con la muestra fue circular y de diámetro 15.6mm (ver Fig.1 (c) y (d)). Se utilizó una celda de carga de 5N y un equipo Instron Microtester (Instron 5848 Microtester, Instron Corporation, Norwood, MA, USA) para registrar el ensayo. Las mediciones fueron adquiridas con matlab.

Mediciones acústicas. Básicamente fue utilizada la misma metodología explicada en la sección 2.2. En este caso los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente (25°C) y la muestra fue ensayada directamente en el recipiente Petri. Una imagen de los ecos que aparecen en una configuración de este tipo es mostrada en la Fig.1 (c): retardo/muestra, muestra/primer capa del Petri, primer capa del Petri/ fondo del Petri y las reflexiones sucesivas.

Mediante la diferencia de tiempo entre el primer eco (retardo/muestra) y el segundo (muestra/fondo de Petri) se calculó el tiempo de vuelo de la señal en la muestra. El ancho de la muestra fue extraído de la Instron, cuyas mediciones incrementales son muy precisas. A partir de estas mediciones se aplicó el siguiente procedimiento. Si se toman por ejemplo dos mediciones de ultrasonido en dos posiciones diferentes de la celda de carga, por ejemplo posición 2 (p_2), con un ancho de muestra $x_0 - \Delta x_2$ en un instante de tiempo del segundo eco t_2 , y otra medición en una posición posición 3 (p_3), se tiene:

$$\begin{aligned} 2(x_0 - \Delta x_2) &= SOS(t_2 - t_0) \\ 2(x_0 - \Delta x_3) &= SOS(t_3 - t_0) \\ &\vdots \end{aligned} \tag{1}$$

donde x_0 es el ancho inicial de la muestra, Δx_i es el desplazamiento incremental de la celda de carga, t_0 es el tiempo de arribo del primer eco y t_2 es el del segundo eco

pertenciente a la señal p_2 . El valor t_3 es el instante de tiempo en que arriva el segundo eco de la señal p_3 . De esta manera, se puede estimar la velocidad del sonido tomando la minimización de mínimos cuadrados de la forma matricial de la Ec.1), usando tantas posiciones de la celda de carga como sea posible:

$$SOS = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y \quad (2)$$

donde X es el vector que contiene las diferencias $t_{i+1} - t_i$ e Y contiene las diferencias $\Delta x_{i+1} - \Delta x_i$. Es importante remarcar que en este caso sólo se tomaron mediciones de velocidad del sonido.

Mediciones mecánicas. Las muestras fueron ensayadas con un preacondicionamiento de velocidad 0.02mm/seg y amplitud 0% a 2%. La velocidad del ensayo también fue de 0.02mm/seg. La curva de rigidez se obtuvo derivando un polinomio de orden 5 interpolado en la curva de compresión. Debido al comportamiento elasto-plástico (cambio en la pendiente de la curva de compresión) en la curva de tensión-deformación se definieron dos regiones y se estimaron dos pendientes (parámetros): E_{R_I} y $E_{R_{II}}$ en las regiones R_I y R_{II} , respectivamente. La deformación alcanzada en la región R_I fue $\varepsilon \approx 0.08$ y entre $0.16 < \varepsilon < 0.33$ en la R_{II} , este en general, fue el comportamiento observado en todas las muestras. Las estimas de estas pendientes fueron obtenidas por dos métodos: el primero promediando la rigidez interpolada con el polinomio de orden 5 en la region correspondiente (se denomina $E_{diff_{R_i}}$) y el segundo tomando la pendiente de un polinomio lineal en cada región (se denomina $E_{interp_{R_i}}$). En consecuencia, se obtuvieron dos estimas de cada región (dos E_{R_I} y dos para $E_{R_{II}}$).

2.4 Análisis estadístico. Se midieron tres repeticiones de cada muestra de las enumeradas en la sección 2.1 para el experimento 1 y otras tres para el experimento 2. Se aplicó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) para evaluar el efecto del pH y la concentración de colágeno. En todas las figuras se representa la media \pm desviación standard. Los coeficientes de correlación lineal entre los parámetros mecánicos y la SOS fueron determinados utilizando un análisis de correlación de Pearson. En todos los tests mencionados los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para $p - valores < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante remarcar que se tuvo especial cuidado al momento de medir este tipo de hidrogeles por dos factores importantes. El primero, es el referente al contenido de burbujas de aire. Si el proceso de gelificación se da demasiado rápido es posible que algunas burbujas permanezcan dentro del gel, afectando así sus propiedades acústicas. Por esta razón, se retardó la gelificación disminuyendo la temperatura de la solución (sin gelificar) a 4°C, permitiendo así la desgasificación luego de ello se llevó a temperatura ambiente. El otro factor es el referente al contenido de NaCl. Es sabido que la velocidad del sonido aumenta con el contenido de sal, como la intención en este trabajo no es medir el cambio de contenido salino sino el cambio en las propiedades mecánicas, entonces se realizaron todas las muestras con el mismo contenido de NaCl (concentraciones finales de 130mM).

El objetivo principal del experimento 1 fue obtener los valores medios de los parámetros acústicos en geles de colágeno dado que, a nuestro conocimiento, no existen datos en literatura. Los parámetros medidos se resumen en la Tabla I. La atenuación e impedancia, tal como se mencionó previamente, se muestran referenciados a los valores en agua desionizada.

Observando la SOS en estos geles, los ANOVA mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras C_1-C_2 y entre C_1-C_3 (mayor la concentración de colágeno

mayor la velocidad del sonido) aunque la diferencia entre C_2 - C_3 no fue estadísticamente significativa. También se observó que cuanto más alto el pH más baja fue la SOS. La impedancia acústica no mostró una diferencia significativa relevante entre las concentraciones de colágeno y tampoco con el pH. Por otro lado, para la atenuación no hubo diferencias con el pH, aunque con la concentración de colágeno C_3 mostró los valores más altos si se comparan con C_1 y C_2 ($p < 0.05$).

Tabla I. Valores medios (\pm desviación standard) de las propiedades acústicas de gelatina al 5% p/p y geles de colágeno a 20°C.

Muestra (n=3)	SOS [m/s]	Atenuación (α_s / α_w)	$Z_s [10^6 \text{ kgm}^{-2}\text{seg}^{-1}]$
C_1 pH=7	1492.6 \pm 0.54	1.10 \pm 0.04	1.512 \pm 0.011
C_1 pH=10	1490.8 \pm 0.50	1.15 \pm 0.03	1.510 \pm 0.007
C_2 pH=7	1497.2 \pm 0.43	1.08 \pm 0.02	1.516 \pm 0.006
C_2 pH=10	1495.3 \pm 0.37	1.13 \pm 0.01	1.514 \pm 0.002
C_3 pH=7	1495.8 \pm 0.18	1.15 \pm 0.04	1.519 \pm 0.007
C_3 pH=10	1494.2 \pm 0.21	1.18 \pm 0.06	1.518 \pm 0.016

En la Fig.2 se muestra un ejemplo de una medición tipo del experimento 2 con sus dos regiones definidas en el ensayo de compresión (muestra C_2 con pH 10). En la Fig.2 (a) se muestra el ensayo de compresión (ϵ es la deformación normalizada). Los registros de las señales de ultrasonido fueron adquiridos en intervalos de 10 segundos aproximadamente, lo que equivale a las deformaciones marcadas con una "x" en la Fig.2 (a). La duración de un registro de la señal de ultrasonido (por ejemplo p_2 , ver Fig.2 (b)) es 10 μ seg, en consecuencia, es razonable suponer que el material no se comprimió durante la adquisición del mismo.

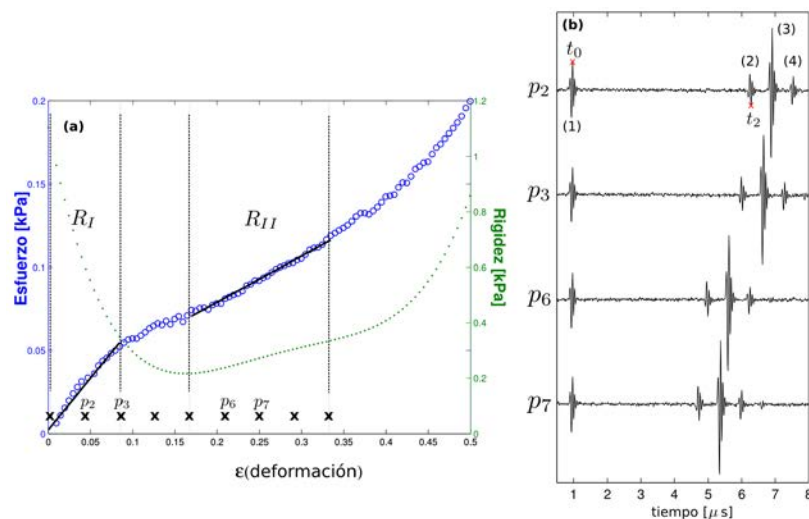


Figura 2: (a) Ensayo mecánico de compresión tipo en gel de colágeno. Los círculos abiertos representan el esfuerzo (normalizado, eje izquierdo) y la línea punteada la rigidez (eje derecho). Las "x" representan las deformaciones a las cuales se tomaron las mediciones de ultrasonido. (b) Mediciones de ultrasonido a cuatro diferentes deformaciones: posiciones i (p_i). Los números (i) indican los diferentes ecos.

En la Fig.2 (a) se muestran también las dos regiones definidas: R_I abarca tres mediciones de ultrasonido, mientras que R_{II} se encuentra entre el quinto y noveno registro. En cada una de las regiones la SOS es calculada mediante la Ec.2 usando como mínimo tres posiciones. Entonces se obtuvieron dos velocidades del sonido SOS_{R_I} y $SOS_{R_{II}}$, asociadas a la Región I y II, respectivamente. Promediando todas las posiciones se definió otro parámetro SOS_{MEAN} .

La Fig.3 (a-f) muestra los resultados en los parámetros mecánicos y la velocidad del sonido para el contenido de colágeno, separando los datos en las dos regiones definidas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la SOS_{R_I} y SOS_{MEAN} entre C_1-C_2 y C_1-C_3 pero no para C_2-C_3 . Cuanto mayor fue la concentración de colágeno mayor fue la SOS. Este comportamiento no es observado en la R_{II} , por el contrario los resultados en esta región concuerdan con el experimento 1 o al menos no existe una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones (ver Fig.3 (f)). Con respecto a las propiedades mecánicas, en la región I se observaron fuertes diferencias entre los parámetros E_{R_I} (para ambas estimas $E_{diff_{R_I}}$ y $E_{interp_{R_I}}$) y la concentración de colágeno para C_1-C_2 y C_1-C_3 pero no para C_2-C_3 . Este comportamiento es similar a los resultados encontrados para la SOS en esta región. Las Figs. 3 (d) y (e) muestran un incremento estadísticamente significativo en $E_{R_{II}}$ para las concentraciones 1 a 3 y 2 a 3, aunque no de 1 a 2.

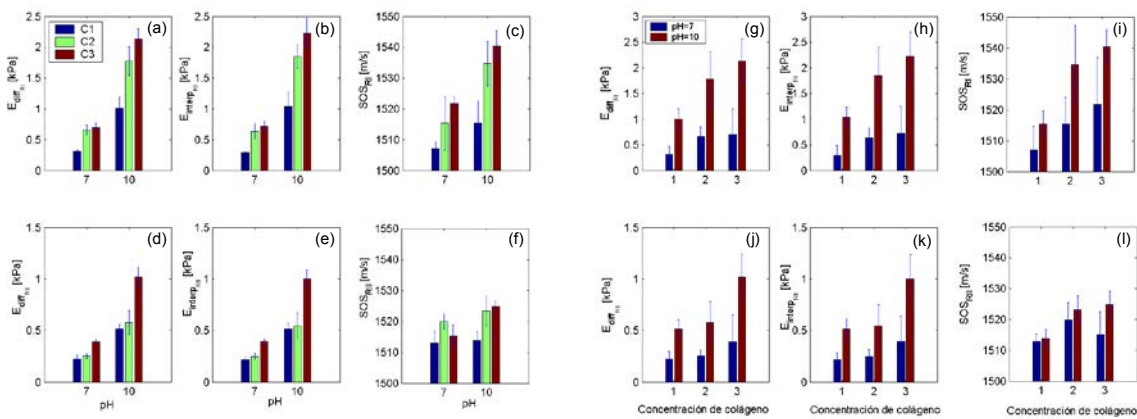


Figura 3: Resultados en geles de colágeno. (a-f) Parámetros mecánicos y velocidad del sonido y sus relaciones con la concentración de colágeno. (g-l) Parámetros mecánicos y de velocidad del sonido y sus relaciones con el pH.

En la Fig.3 (g-l), se muestran los mismos datos pero graficados con respecto al pH. La SOS en la region I y SOS_{MEAN} se incrementó con el factor pH. Las propiedades mecánicas mostraron un comportamiento similar al observado por Achilli y otros [3]. En la región I y en la II se observaron fuertes diferencias para el parámetro E_{R_I} para ambas estimas. Un incremento en el pH de 7 a 10 se correspondió con un valor más alto de E_{R_I} . Este no es el caso de la SOS en la región II, en el que no se encontró una diferencia significativa.

La Figura 4 muestra un análisis de correlación entre SOS y los parámetros mecánicos ($E_{interp_{R_I}}$ y $E_{interp_{R_{II}}}$). Se encontró una correlación lineal significativa entre SOS_{R_I} y $E_{interp_{R_I}}$ ($r^2 = 0.79$ y $p < 0.01$) (ver Fig.4 (a)). Este comportamiento se observó también con SOS_{Mean} y $E_{interp_{R_I}}$ ($r^2 = 0.78$ y $p < 0.01$, Fig.4 (e)) y relativamente en SOS_{R_I} y $E_{interp_{R_{II}}}$ ($r^2 = 0.64$ y $p < 0.01$). Una correlación débil aunque estadísticamente significativa se encontró entre SOS_{Mean} and $E_{interp_{R_{II}}}$ ($r^2 = 0.52$ and $p < 0.01$). Las regresiones usando

el parámetro $SOS_{R_{II}}$ fueron siempre predictores pobres de $E_{interp_{R_I}}$ ($r^2 = 0.49$ y $p < 0.01$) y $E_{interp_{R_{II}}}$ ($r^2 = 0.27$ y $p < 0.05$). Este último mostró los menores valores de correlación.

Con respecto a la Fig.4 se debe remarcar que el material ensayado tuvo diferentes condiciones siempre (contenido de colágeno y pH), por esta razón los resultados deben ser tomados con cautela. Como un comportamiento general podría ser señalado que los parámetros mecánicos definidos son bien predichos por cualquiera; SOS_{R_I} y SOS_{Mean} .

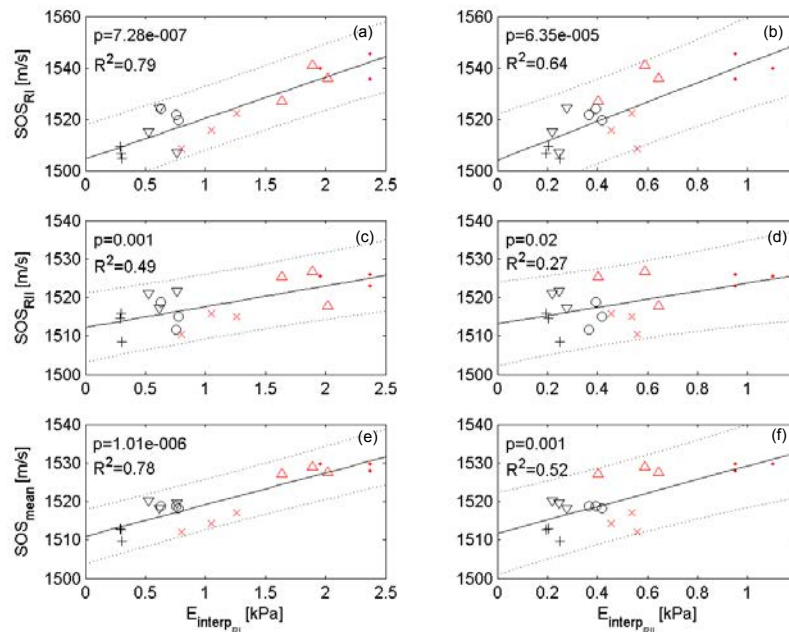


Figura 4: Correlación lineal entre los parámetros mecánicos ($E_{interp_{R_I}}$ y $E_{interp_{R_{II}}}$) y la velocidad del sonido (SOS_{R_I} , $SOS_{R_{II}}$ y SOS_{MEAN}). Concentraciones de colágeno 1.6/2.0/2.4 gr/L en + y x / triángulo hacia abajo y hacia arriba / círculo y punto, respectivamente. Las muestras con pH10 fueron marcadas en rojo y en negro las de pH 7.

Para comparar los resultados de ambos experimentos (1 y 2) se debe aclarar que en el primero las muestras en forma de disco fueron extraídas del Petri e introducidas en la celda termalizada. Luego de esto la muestra es presionada cuidadosamente hasta lograr el espesor de 5mm y, consecuentemente, fijar el ancho de las mismas. Este protocolo genera dos procesos en la muestra: la pérdida de líquido y posteriormente la aplicación de una deformación no controlada (todas las muestras no poseen el mismo espesor inicial). Es altamente probable que las muestras se encuentren en una deformación en la región II ($0.16 < \varepsilon < 0.33$) o mayor. Teniendo en cuenta esto los resultados están en acuerdo.

Según se muestra en las Figs. 3-4, el contenido líquido (además de la concentración de colágeno y el pH) en este tipo de matrices juega un rol preponderante. Al parecer en la región I el parámetro mecánico obtenido es el de la matriz con todo el fluido en equilibrio. En la región II, en cambio, la parte líquida de la matriz estaría fluyendo hacia afuera. En definitiva la muestra se modificó en el ensayo y se estaría midiendo otro tipo de material. Es importante remarcar que este fenómeno también se observa en la velocidad del sonido.

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollaron dos experimentos de ultrasonido que permitieron interrogar; primero las propiedades acústicas de geles de colágeno altamente hidratados, y en segunda instancia observar su correlación con algunos parámetros mecánicos.

En cuanto a la atenuación en estos geles se obtuvieron valores del orden del agua desionizada. Esto parecería indicar que a 10MHz (frecuencia central del transductor) la dispersión en la muestra es baja. Los valores de impedancia acústica son más elevados comparados con el agua desionizada, estimamos que esta diferencia se debe al contenido salino de los mismos. Hay que destacar que estos parámetros se obtuvieron con la muestra en la región II, es decir, con una deformación relativa entre $0.16 < \varepsilon < 0.33$. La velocidad del sonido es un parámetro que, según se observó, es sensible a esta deformación.

Si bien el modelo mecánico de estos geles no es del todo comprendido (ver [9]), se pudo apreciar un cambio en el comportamiento de la matriz en las regiones definidas como I y II. Al parecer esto se debe a que en la primera el fluido está en equilibrio y en la región II el fluido está saliendo de la matriz. Este comportamiento también fue observado en la velocidad del sonido.

Los parámetros mecánicos estimados en los ensayos de compresión poseen una alta correlación con la velocidad del sonido, motivo por el cual sería interesante estudiar rigurosamente este fenómeno.

Con estos datos se busca construir un modelo mecánico teórico que permita, entre otras cosas, desarrollar estrategias de control y predicción en biorreactores.

Bibliografía

- [1] Niklason L. E., Gao J., Abbott W. M., Hirschi K. K., Houser S., Marini R. and Langer R. "Functional Arteries Grown in Vitro", Science 16 April 1999, Vol. 284 no. 5413 pp. 489-493.
- [2] "Collagen: Structure and Mechanics", editado por Peter Fratzl., Springer, 2008, XVIII, 506 p. 180 illus., ISBN: 978-0-387-73905-2.
- [3] Achilli M. and Lagueur J. and Mantovani D., "On the effects of UV-C and pH on the mechanical behavior, molecular conformation and cell viability of collagen-based scaffold for vascular tissue engineering", Macromolecular Bioscience, 307-316, 10, (2010).
- [4] Sionkowska, A. and Kaminska, K., "Thermal helix-coil transition in UV irradiated collagen from rat tail tendon", Int. J. of Biological Macromolecules 12 (199) 337-340.
- [5] Hall T. J., Bilgen M., Insana M. F. and Krouskop T. A., "Phantom Materials for Elastography", IEEE trans. on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control, 44, 6, (1997).
- [6] Rajan N. and Habermehl J. Coté M.F. Doillon C.J. and Mantovani D., "Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications", Nature Protocols, 2753-2758, 1, (2006).
- [7] McClements D.J. and Fairley P., "Ultrasonic pulse echo reflectometer", Ultrasonics, 58-62, 29, (1991).
- [8] Insana M.F. and Hall T.J. and Chaturvedi P. and Kargel Ch., "Ultrasonic properties of random media under uniaxial loading", Journal of the Acoustical Society of America, 3243-3251, 110, 6, (2001).
- [9] Pryse, K., Nekouzadeh, A., Genin, G., Elson, E., Zahalak, G., "Incremental Mechanics of Collagen Gels: New experiments and a New Viscoelastic Model", Annals of Biomechanical Engineering, Vol. 31, pp. 1287-1298 (2003).