

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERÍA
Y CIENCIAS APLICADAS**

**Algoritmo Genético para Maximizar el Crecimiento de
Osteoblastos Normales Humanos sobre Andamios de
Polihidroxibutirato**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS
OPCIÓN TERMINAL EN TECNOLOGÍA ELÉCTRICA**

**PRESENTA
M.I.C.A. MARAOLINA DOMÍNGUEZ DÍAZ**

**ASESOR INTERNO: DR. MARCO ANTONIO CRUZ CHÁVEZ
ASESOR EXTERNO: DR. ANGEL ROMO URIBE**

CUERNAVACA, MOR.

MAYO 2016

Resumen

En la presente tesis doctoral se diseñó un Algoritmo Genético para maximizar el crecimiento de osteoblastos sobre andamios poliméricos. Para implementar el algoritmo se diseñó un modelo de optimización, cuya función objetivo representa la capacidad de un andamio para maximizar el crecimiento de células por medio del control de la configuración del andamio, es decir de la mejora de su arquitectura y propiedades. Como parámetros pertenecientes a la arquitectura del andamio utilizamos el diámetro de poro y la porosidad, mientras que como parámetros de las propiedades del andamio utilizamos el módulo de Young y el ángulo de contacto. El modelo de optimización se adaptó específicamente a osteoblastos, debido a que por su capacidad de regeneración estas células son consideradas un paradigma de los principios básicos de la Ingeniería de Tejidos. Para el diseño del Algoritmo Genético, se utilizaron ecuaciones teóricas que nos permiten calcular la configuración de los andamios. Se decidió utilizar ecuaciones que modelan el comportamiento de la técnica de procesamiento denominada electrohilado, ya que este método es económico y de fácil aplicación, así como a que existen diversos estudios que relacionan las variables de procesamiento utilizadas en electrohilado con el diámetro de hilo de los andamios que se pueden obtener. Para decidir el polímero a utilizar se realizaron experimentos de caracterización de una serie de polihidroxibutiratos (PHBs), los cuales son biodegradables y biocompatibles. El PHB seleccionado fue el de 230 kDa, debido a que presenta características adecuadas para su uso como andamio para cultivo de células. Entre las propiedades del PHB de 230 kDa se encuentran su estabilidad térmica y temperatura de degradación por encima de 200°C, lo cual es deseable para que resista procesos de esterilización por medio de calor sin perder su forma, así como un Módulo de Young de 400 MPa, el cual se encuentra dentro de los límites deseables para cultivo de osteoblastos. Además presenta un ángulo de contacto de aproximadamente 80°, por lo cual es hidrofílico y por tanto, tiene mayor capacidad de adherencia para las células. Por medio de un proceso de recombinación

genética se obtuvo la mejor configuración de andamio para crecimiento de osteoblastos y dicha configuración se procesó experimentalmente por medio de electrohilado. Además de electrohilar la mejor configuración de andamio, también se electrohilaron una configuración con aptitud intermedia y una con aptitud baja para cultivo de osteoblastos. Las tres configuraciones de andamios electrohiladas (la mejor, la intermedia y la peor) se probaron con osteoblastos normales humanos, para determinar si los resultados del Algoritmo Genético se acercan a la realidad. Se encontró que en el andamio con mejor aptitud hubo mayor proliferación celular hasta las 72 horas de cultivo. Después de 72 horas los andamios con aptitud intermedia y peor presentaron mayor proliferación celular. Así mismo, hasta las 72 horas de cultivo celular el andamio con mejor aptitud presentó el mayor porcentaje de viabilidad celular, mientras que después de este tiempo no se observa una diferencia significativa entre los tres andamios. Lo anterior se debe a que a las 72 horas de cultivo celular se comienza a apreciar mayor degradación de los andamios, por lo cual las condiciones iniciales de los andamios cambian. Por otra parte, la viabilidad celular (cantidad de células vivas sobre muertas) es aproximadamente la misma en todos los casos y horas, excepto a las 72 horas en la cual la viabilidad celular es mayor en los pozos que contenían los andamios con mejor aptitud. De esta manera se comprueba que el modelo de optimización y el Algoritmo Genético nos pueden ayudar a maximizar el crecimiento de osteoblastos sobre andamios de PHB. Proporcionando un ambiente adecuado para el crecimiento de las células en las etapas iniciales de cultivo celular, en las cuales es primordial ya que es cuando se realiza la adherencia de las células al andamio. Este trabajo impacta en el desarrollo de nuevos métodos de estudio y generación de conocimientos en el área de Ingeniería de Tejidos. Así mismo proporciona una herramienta para el diseño de andamios, la cual ayude al ahorro de materiales, dinero y tiempo. Lo anterior repercute en el diseño de dispositivos biomédicos, como membranas para recubrimientos de heridas y andamios para reparación de cartílago o hueso.

Abstract

In this work a Genetic Algorithm is designed to maximize the growth of osteoblasts on polymeric scaffolds. To implement the algorithm a optimization model was designed, in which a objective function represents the ability of a scaffold to maximize cell growth by controlling the configuration of the scaffold, i.e. improving its architecture and design properties. As parameters belonging to the scaffold architecture used the pore diameter and porosity, whereas as parameters of properties used Young's modulus and the contact angle. The optimization model specifically adapted to osteoblasts, because their ability to regenerate these cells are considered a paradigm of the basic principles of Tissue Engineering. For the design of genetic algorithm, theoretical equations that allow us to calculate the configuration of the scaffolds are used. It was decided to use equations that model the behavior of the processing technique called electrospinning, as this method is inexpensive and easy to apply, and that there are several studies linking processing variables used in electrospinning with the wire diameter of the scaffolds that can be obtained. To decide the polymer characterization were performed experiments using a series of polyhydroxybutyrates (PHBs), which are biodegradable and biocompatible. The PHB selected was 230 kDa, because it has suitable for use as a scaffold for cell culture characteristics. Among the properties of PHB 230 kDa are thermal stability and degradation temperature above 200 ° C, which is desirable to withstand sterilization processes by heat without losing its shape, and a Young's modulus of 400 MPa, which is within desirable limits osteoblast culture, besides having a contact angle of about 80 °, by which is hydrophilic and therefore has higher adhesiveness to cells. Through a process of genetic recombination the best configuration for osteoblast growth scaffold and that setting is experimentally obtained by electrospinning process. Besides the best configuration electrohilar scaffold, a configuration with intermediate low fitness and ability to culture osteoblasts were also electrohilaron. The three configurations electrospun scaffolds (the best, intermediate and worst) were tested with normal human osteoblasts, to determine whether the results of genetic

algorithm approach to reality. It was found that the best cell proliferation was greater scaffold until 72 hours of culture, where the intermediate and worst scaffolds showed higher cell proliferation. In addition to 72 hours of cell culture scaffold with better fitness has the highest percentage of cell viability, whereas after this time no significant difference between the three scaffolds were observed. This is because at 72 hours cell culture begins to appreciate further degradation of the scaffolding, which initial conditions change configuration scaffolds. Moreover, cell viability (number of living cells on dead) is approximately the same in all cases and hours, except at 72 hours at which cell viability is higher in wells containing scaffolds with better fitness. Thus it is found that the optimization model and Genetic Algorithm can help us maximize the growth of osteoblasts on scaffolds of PHB. By providing a suitable environment for the growth of cells in the early stages of cell culture, which is essential as it is when adhesion of cells to the scaffold takes place. This work has an impact on the development of new methods of study and knowledge generation in the field of Tissue Engineering. It also provides a tool for designing scaffolding, which helps to save materials, money and time. This affects the design of biomedical devices, such as wound coatings membranes and scaffolds for cartilage or bone repair.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgo para realizar los estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación en Ingeniería y ciencias Aplicadas, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por brindarme el espacio para realizar mis estudios de posgrado, así como a los doctores de dicho centro que fueron mis profesores.

Al Instituto de Ciencias Físicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme un espacio para llevar a cabo experimentos de caracterización de polímeros.

A la Facultad de Farmacia, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por brindarme las facilidades para realizar ensayos de cultivo celular.

Al Instituto Nacional de Salud Pública por brindarme espacio para llevar a cabo prácticas relacionadas al área biológica y por el espacio para recibir instrucción sobre cultivo de células animales.

Al Dr. Marco Antonio Cruz Chávez, asesor del trabajo de tesis doctoral, por creer en que podría realizar un trabajo multidisciplinario como este, apoyarme en el desarrollo del proyecto y ayudarme a encontrar nuevos caminos para explorar la investigación científica.

Al Dr. Angel Romo Uribe, por ser mi coasesor de tesis, por sus enseñanzas y capacitación al respecto del área de ciencias de materiales y particularmente en polímeros.

A los integrantes de mi comité tutorial, ya sea que hayan estado a través de todo o parte del proceso de mi formación de doctorado: Dra. Margarita Tecpoyotl Torres, Dr. Daniel Genaro Segura, Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, Dr. Oscar Peralta Zaragoza, Dr. Martín Martínez Rangel, Dr. Angel Romo Uribe y Dr. Marco Antonio

Cruz Chávez. Gracias por su tiempo, consejos y enseñanzas al respecto de tan diversas áreas del conocimiento.

A los integrantes de mi comité revisor de tesis: Dra. Margarita Tecpoyotl Torres, Dr. Álvaro Zamudio Lara, Dr. Rosenberg Romero Domínguez, Dr. Oscar Peralta Zaragoza, Dr. Martín Martínez Rangel, Dr. Angel Romo Uribe y Dr. Marco Antonio Cruz Chávez.

Al Dr. Daniel Genero Segura y el Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, por donar los PHBs de origen bacterial usados en la presente tesis y por su apertura a seguirme asesorando aún sin no ser mis tutores. Así como también a sus estudiantes que han colaborado en la producción de los PHBs, principalmente a Silvia Lizbeth Herrera López, Modesto Millan Ponce y Miguel Mejia.

A la Dra. Angélica Meneses Acosta por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la UAEM, por su ayuda, asesoría y cursos con respecto a cultivo de células animales. Así como también a Ana Laura Nuñez por brindarme su apoyo en mi capacitación en cultivo de células, y el apoyo técnico de Lorena Uribe Toledo, así como el apoyo de los estudiantes del grupo de la Dra. Meneses y por permitirme escuchar sus avances de tesis con respecto a cultivo de células y biofármacos, de los cuales he aprendido muchas cosas interesantes.

Al Dr. José Escorcía García por su ayuda en el diseño y construcción del equipo de electrohilado utilizado en la presente tesis para procesar los andamios.

Al Mtro. José Campos del Instituto de Energías Renovables por la adquisición de las imágenes de alta resolución en un equipo de SEM que se encuentran en la presente tesis.

Al Dr. Bernardo Campillo, al Dr. Osvaldo Flores y al Dr. Horacio Martínez del ICF-UNAM, por su ayuda y consejos.

Al Dr. Víctor Bermúdez del Instituto Nacional de Salud Pública por las clases impartidas sobre cultivo de células y a la técnico Geny Fierros, quien me ayudó en capacitación de cultivo celular.

Al grupo del Dr. Marco Antonio Cruz Chávez y el Cuerpo Académico de Optimización y Software por compartir tantos temas diferentes sobre el área de cómputo, por sus comentarios y preguntas. Entre mis compañeros de grupo a Alina Martínez Oropeza, especialmente porque gracias a ella conocí el área de optimización y software, a Jazmín Chávez, Carmen Peralta, Ariadna Huerta, Beatriz Martínez, Pedro Moreno, Alfonso D'Granda, Juana Enriquez, Yainier Labrada, y más compañeros que me han escuchado en mis avances de tesis y me han dado sus opiniones y consejos.

A todos mis profesores durante el doctorado, que han compartido su conocimiento y tiempo conmigo, el cual no he podido aprovechar al máximo debido a que son varios temas de estudio pero espero poder seguir profundizando en todos ellos en mi vida profesional.

Dedicatorias

A Dios.

A mis padres Rafael Domínguez y Mabel Díaz, y a mi esposo José Escorcía. Así como a mis hermanos y mis sobrinos.

A mis asesores, tutores y maestros.

A mis amigos.

Contenido

Resumen	II
Abstract	III
Agradecimientos	V
Dedicatorias	VIII
Contenido	IX
Índice de Figuras	XVI
Índice de Tablas	XXI
Prefacio	XXII

<i>Capítulo 1. Introducción</i>	2
1.1. Planteamiento del problema	5
1.2. Preguntas de investigación	6
1.3. Hipótesis	7
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo principal	7
1.4.2. Objetivos secundarios	7
1.5. Justificación	8
1.6. Contribución de la tesis	10
1.7. Alcance de la tesis	11
1.8. Contenido de la tesis	12
<i>Capítulo 2. Marco Teórico</i>	13
2.1. Dificultades que se pueden presentar al tratar de resolver problemas del mundo real	14

2.1.1. El tamaño del espacio de búsqueda	15
2.1.2. El modelado del problema	16
2.1.3. Restricciones	17
2.1.4. El cambio sobre el tiempo	17
2.2. Optimización combinatoria	18
2.3. Complejidad algorítmica	19
2.4. Complejidad de los problemas	22
2.5. Técnicas de búsqueda	26
2.6. Heurísticas y metaheurísticas	27
2.7. Antecedentes de la investigación	31

Capítulo 3. Metodología de Investigación **35**

3.1. Esquema metodológico general	36
3.1.1. Diseño del Modelo de Optimización y del Algoritmo Genético	36
3.1.2. Caracterización y selección del PHB	37
3.1.3. Optimización de andamios para crecimiento de osteoblastos	38
3.1.4. Prueba de resultados de los andamios obtenidos por medio del GA	39
3.2. Materiales para el constructo de Ingeniería de Tejidos	40
3.2.1. Polihidroxibutirato	41
3.2.2. Osteoblastos	42
3.3. Métodos	43
3.3.1. Métodos computacionales	44
3.3.1.1. Algoritmo Genético	44
3.3.1.2. Análisis de sensibilidad del algoritmo	48
3.3.2. Método de procesado del andamio (electrohilado)	51
3.3.3. Métodos de caracterización de materiales	53

3.3.3.1. Determinación de peso molecular	53
3.3.3.2. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier	54
3.3.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	56
3.3.3.4. Microscopía óptica con polarizadores cruzados	57
3.3.3.5. Dispersión de luz a ángulo pequeño (SALS)	58
3.3.3.6. Tensiómetro digital	59
3.3.3.7. Técnica de la gota sésil	60
3.3.3.8. Microscopía Electrónica de Barrido	63
3.3.4. Ensayos biológicos	64
3.3.4.1. Cultivo celular	64
3.3.4.2. Conteo celular por azul tripano	65
3.3.4.3. Microscopia de epifluorescencia	66

Capítulo 4. Diseño del modelo de optimización y del Algoritmo Genético **68**

4.1. Diseño del modelo de optimización	69
4.1.1. Análisis del Problema	69
4.1.1.1. El constructo de ingeniería de tejidos	70
4.1.1.2. Optimización del crecimiento de células sobre un andamio	71
4.1.1.3. Dificultad de coordinar las diferentes propiedades de un andamio	74
4.2. Construcción del modelo de optimización	74
4.2.1. Elementos a considerar para modelar el problema	75
4.2.2. Modelo de optimización para maximizar el crecimiento de células en un andamio	76
4.3. Diseño del Algoritmo Genético	78
4.3.1. Representación simbólica del andamio	79
4.3.2. Diseño de los operadores genéticos	81

4.3.2.1. Operador de selección	81
4.3.2.2. Operador de cruzamiento	82
4.3.2.3. Operador de mutación	83
4.3.2.4. Operador de copia o reemplazo	84
4.3.3. Funcionamiento del Algoritmo Genético	84
4.4. Modelos utilizados para la programación del Algoritmo Genético	86
4.4.1. Modelos para generar la arquitectura del andamio	86
4.4.1.1. Generación del diámetro de hilo de un andamio obtenido a través de parámetros de procesado por medio de electrohilado	86
4.4.1.2. Generación de la arquitectura de un andamio	87
4.4.1.3. Generación de propiedades del andamio	90
4.4.1.3.1. Modulo de Young	91
4.4.1.3.2. Ángulo de contacto	92
4.5. Conclusiones del diseño del Modelo de Optimización y del GA	92
Capítulo 5. Resultados y análisis de resultados	95
5.1. Caracterización del polihidroxitirato	95
5.1.1. Determinación de peso molecular	97
5.1.1.1. Protocolo experimental	97
5.1.1.2. Resultados y análisis de resultados	98
5.1.2. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier	99
5.1.2.1. Protocolo experimental	99
5.1.2.2. Resultados y análisis de resultados	99
5.1.3. Análisis de las temperaturas de descomposición de los PHBs	101
5.1.3.1. Protocolo experimental	102
5.1.3.2. Resultados y análisis de resultados	102

5.1.4. Análisis de las temperaturas de transición térmica de los PHBs	103
5.1.4.1. Protocolo experimental	104
5.1.4.2. Resultados y análisis de resultados	104
5.1.5. Microscopía óptica con polarizadores cruzados	110
5.1.5.1. Protocolo experimental	111
5.1.5.2. Resultados y análisis de resultados	111
5.1.6. Dispersión de luz a ángulo pequeño	112
5.1.6.1. Protocolo experimental	112
5.1.6.2. Resultados y análisis de resultados	112
5.1.7. Propiedades mecánicas de los PHBs	115
5.1.7.1. Protocolo experimental	115
5.1.7.2. Resultados y análisis de resultados	115
5.1.8. Medición de ángulo de contacto	117
5.1.8.1. Protocolo experimental	117
5.1.8.2. Resultados y análisis de resultados	118
5.1.9. PHB elegido	119
5.2. Optimización de andamios para crecimiento de osteoblastos	120
5.2.1. Modelo de optimización para crecimiento de osteoblastos	121
5.2.2. Rangos e intervalos para el funcionamiento del algoritmo	124
5.2.3. Algoritmo iterativo para generar las propiedades de un andamio	126
5.2.4. Generación de soluciones de manera aleatoria	127
5.2.4.1. Relación entre los parámetros de procesado y la arquitectura obtenida	127
5.2.4.2. Relación entre la arquitectura y propiedades del andamio	129
5.2.5. El espacio de búsqueda del problema	130
5.2.6. Algoritmo Genético (GA)	133
5.2.7. Análisis de sensibilidad del GA	136

5.2.7.1. Condiciones de realización del análisis de sensibilidad del GA	136
5.2.7.1.1. Parámetros de control del GA	136
5.2.7.1.2. Arquitectura computacional y lenguaje de programación	136
5.2.7.1.3. Proceso de sintonización del GA	138
5.2.7.2. Resultados del análisis de sensibilidad del GA	139
5.2.7.3. Resultados y análisis de convergencia del GA	144
5.2.7.4. Análisis de sensibilidad del GA con parámetros de electrohilado modificados	148
5.2.7.4.1. Cambio del rango de las restricciones	148
5.2.7.4.2. Resultados del análisis de sensibilidad del GA obtenidos con los nuevos rangos de procesado	148
5.2.7.5. Resultados y análisis de la convergencia del GA con parámetros de electrohilado modificados	149
5.2.7.6. Análisis de resultados de los andamios obtenidos por medio del GA	153
5.2.8. Cálculo de la complejidad algorítmica del GA	154
5.2.9. Conclusiones del GA	154
5.3. Prueba de resultados de los andamios obtenidos por medio del GA	155
5.3.1. Electrohilado de andamios de PHB	155
5.3.1.1. Protocolo de electrohilado de andamios	153
5.3.1.2. Análisis de andamios electrohilados por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	156
5.3.1.2.1. Protocolo de SEM	156
5.3.1.2.2. Resultados del análisis de las imágenes de SEM de los andamios	156
5.3.2. Prueba de resultados de la <i>Aptitud</i> de los andamios para crecimiento de osteoblastos	158
5.3.2.1. Protocolo de cultivo celular de la línea NHOst	159
5.3.2.2. Mantenimiento y proliferación de las NHOst	159
5.3.2.3. Pruebas biológicas implementadas para evaluar el crecimiento de las NHOst en los andamios	160

5.3.2.4. Resultados de las pruebas con las NHOst	161
5.3.2.4.1. Observación del crecimiento de las NHOst por Microscopia Óptica	162
5.3.2.4.1.2. Protocolo experimental de Microscopia Óptica	162
5.3.2.4.1.3. Resultados de Microscopia Óptica	162
5.3.2.4.2. Conteo celular con azul tripano	164
5.3.2.4.2.1. Protocolo de conteo celular	164
5.3.2.4.2.2. Resultados de conteo celular	164
5.3.2.4.3. Microscopia de epifluorescencia	166
5.3.2.4.3.1. Protocolo de Microscopia de epifluorescencia	166
5.3.2.4.3.2. Resultados de Microscopia de epifluorescencia	166
5.3.3. Conclusiones de la prueba de cultivo de NHOst en andamios	168
<i>Capítulo 6. Conclusiones y trabajo futuro</i>	169
6.1. Conclusiones	170
6.2. Trabajo futuro	172
Referencias	174
Apéndices	187
A. Glosario	187
B. Protocolos de cultivo de bacterias productoras de PHB y de células NHOst	191
C. Código fuente del Algoritmo	199

Índice de Figuras

Figura 1.1. Interrelación de la ingeniería de tejidos en diversos campos (imagen basada en Zilberman, 2011)	2
Figura 2.1. TSP simétrico simple de 20 ciudades (modificado de Michalewicz & Fogel, 2004)	15
Figura 2.2. Clases de problemas (a) si como se conoce actualmente $P \neq NP$ y (b) si se prueba que $P = NP$ (diseñado a partir de Salazar, 2001)	25
Figura 2.3. Técnicas de búsqueda para resolver problemas de optimización (Sivanandam & Deepa, 2008)	27
Figura 2.4. Clasificaciones comunes de metaheurísticas	30
Figura 3.1. Etapa de diseño del modelo de optimización y del Algoritmo Genético	37
Figura 3.2. Etapa de caracterización y selección del PHB	38
Figura 3.3. Etapa de optimización de andamios por medio del modelo de optimización y el Algoritmo Genético	39
Figura 3.4. Etapa de prueba de los resultados del Algoritmo	40
Figura 3.5. Microscopía electrónica de transmisión de inclusiones de polidroxibutirato dentro de bacteria <i>Azotobacter chroococcum</i> (Bonartsev <i>et al.</i> 2007)	42
Figura 3.6. Microscopia óptica de osteoblastos normales humanos (NH0st) a 72 horas de crecimiento en caja de cultivo T-25	43
Figura 3.7. Funcionamiento básico de un Algoritmo Genético	46
Figura 3.8. Partes principales de un sistema de electrohilado (Modificado de Theron <i>et al.</i> 2004)	52
Figura 3.9. (a) Viscosímetro capilar Ubbelohde utilizado para determinar el peso molecular, (b) rectas de las viscosidades reducida o de la inherente	54
Figura 3.10. FTIR del Nylon 6,6 y sus componentes (Ndukwe M, 2016)	55
Figura 3.11. (a) Esquema del equipo de DSC, (b) ejemplo de temperaturas de transición obtenidas por DSC (Schick, 2009)	56
Figura 3.12. Equipo de microscopia óptica con polarizadores (modificado de	58

Robinson & Davidson, 2015)

Figura 3.13. Componentes del equipo de SALS: láser (L), colimador (PH), filtro de densidad neutra (D), polarizador (P), Analizador (A), muestra (S), cámara (CCD), lente de enfoque (FC), computadora (CPU) con la imagen de una esferulita en la pantalla (modificado de Romo-Uribe <i>et al.</i> 2010)	59
Figura 3.14. Tensiómetro digital	60
Figura 3.15. Ángulo de contacto del polímero PHB en forma de (a) película que presenta comportamiento hidrofílico ($<90^\circ$, (c)), y (b) andamio con comportamiento hidrofóbico ($>90^\circ$, (d))	61
Figura 3.16. Modelos de ángulos de contacto sobre superficies: (a) hidrofílica, (b) hidrofóbica, y (c) superhidrofóbica (modificada de Arkles, 2006).	62
Figura 3.17. Una gota de agua sobre (a) la superficie de una hoja de loto, (b) la superficie de las alas de una mariposa (modificada de Choi <i>et al.</i> 2009).	62
Figura 3.18. Componentes básicos del dispositivo de Microscopia Electronica de Barrido (Imagen modificada de Nessler, 2016)	63
Figura 3.19. Cajas para cultivo celular (a) T-25 con 25 cm^2 de área, (b) T-75 con 75 cm^2 de área, (c) cajas de 24 pozos	65
Figura 3.20. (a) Diseño de la cámara Neubauer, (b) región cuadrículada del hemocitómetro donde en las áreas con (1) se cuentan las células, además también se puede utilizar el área del centro de la cuadrícula, pero se considera que contar 4 cuadrantes da una buena medida del número de células (modificada de Bastidas, 2016)	66
Figura 3.21. Componentes del microscopio de epifluorescencia	67
Figura 4.1. Constructo de Ingeniería de tejidos	70
Figura 4.2. Impacto de la arquitectura de un andamio sobre el comportamiento de la célula (adaptado de Lim, 2014)	71
Figura 4.3. Los andamios son dispositivos capaces de activar el grupo de células madre que los acoge, en donde los factores de crecimiento activan el grupo de células madre e inducen su migración hacia el andamio (adaptado de Hoffman & García-Fuentes, 2011)	72
Figura 4.4. La diferenciación celular y la deposición de la matriz extracelular pueden ser afectadas por diferentes señales, por ejemplo la mecanotransducción o señalización celular (adaptado de Hoffman &	73

García-Fuentes, 2011)

Figura 4.5. Representación simbólica del individuo del GA, la cual contiene los parámetros de entrada y salida de una determinada configuración de andamio	80
Figura 4.6. Funcionamiento de los operadores de cruzamiento	82
Figura 4.7. Funcionamiento del operador de mutación	83
Figura 4.8. Algoritmo genético general para optimizar la configuración (arquitectura y propiedades) de un andamio	85
Figura 4.9. Imágenes de redes fibrosas obtenidas de un proceso de electrohilado (imagen de la izquierda), un papel (imagen de en medio) y modelado de este tipo de estructuras (imagen de la derecha). La escala para la estructura modelada es a lo mucho de 20 fibras (20ω)	88
Figura 5.1. Espectro de FTIR de PHBs de diferentes pesos moleculares	100
Figura 5.2. Región de $1800-1200\text{ cm}^{-1}$ de los PHBs de diferentes pesos moleculares	101
Figura 5.3. Pérdida de masa de PHBs de (a) 160 kDa, (b) 230 kDa, (c) 500 kDa, (d) 640 kDa y (e) 1400 kDa	102
Figura 5.4. Derivadas de la pérdida de masa de PHBs de (a) 160 kDa, (b) 230 kDa, (c) 500 kDa, (d) 640 kDa y (e) 1400 kDa	103
Figura 5.5. Temperaturas de fusión de PHBs de diferentes pesos moleculares	105
Figura 5.6. Cristalización en frío de PHBs de alto peso molecular	106
Figura 5.7. Temperaturas de cristalización de PHBs	107
Figura 5.8. Temperaturas de cristalización de PHBs de alto peso molecular	108
Figura 5.9. Influencia del peso molecular promedio sobre las transiciones térmicas de PHB (a) T_m y (b) T_c	108
Figura 5.10. Micrografías ópticas polarizadas de películas de PHB recrystalizadas: (a) 260 kDa, (b) 460 kDa, (c) 500 kDa, (d) 1400 kDa	111
Figura 5.11. Patrones de dispersión de luz a ángulo pequeño (SALS) de PHBs de (a) 260 kDa y (b) 460 kDa	113
Figura 5.12. Modulo de Young E (■) y grado de cristalinidad χ (○) como	116

función del peso molecular de los PHBs	
Figura 5.13. Deformación a la fractura ϵ_f como función del peso molecular de los PHBs	116
Figura 5.14. Ángulo de contacto de los PHBs de origen bacteriano	117
Figura 5.15. Morfología de PHBs vistos por medio de SEM de (a) 160 kDa, (b) 500 kDa y (c) 1660 kDa	119
Figura 5.16. Pseudocódigo general del algoritmo iterativo para calcular la configuración de un andamio	126
Figura 5.17. Cambio del diámetro de hilo de 100 soluciones a 5 cm de distancia y concentraciones de (a) 1 % peso/volumen, (b) 5% peso/volumen, con los parámetros de electrohilado de flujo (Q) y voltaje (V) generados de manera aleatoria	128
Figura 5.18. Relación de (a) el diámetro de poro contra el diámetro de hilo, (b) la porosidad contra el diámetro de poro	130
Figura 5.19. Espacio de búsqueda del problema con 100000 soluciones aleatorias	132
Figura 5.20. Espacio de búsqueda del problema con 10000 soluciones aleatorias	133
Figura 5.21. Funcionamiento básico del Algoritmo Genético para buscar la mejor configuración de un andamio para cultivo de osteoblastos	135
Figura 5.22. El tamaño de la población en los algoritmos genéticos, (a) demasiado pequeña y el usuario paga una multa de calidad, (b) demasiado grande y el usuario paga una penalización de tiempo, (c) tamaño óptimo de la población (modificado de Lobo <i>et al.</i> , 2004)	138
Figura 5.23. Aptitud del primer tipo de cruzamiento ($Pc1$) con el segundo tipo de cruzamiento ($Pc2$) a (a) 10 %, (b) 20 %, (c) 30 %, (d) 40 %, (e) 50 %, (f) 60 %, y con mutación del 10%	140
Figura 5.24. Aptitud del segundo tipo de cruzamiento ($Pc2$) con el primer tipo de cruzamiento ($Pc1$) a (a) 10 %, (b) 20 %, (c) 30 %, (d) 40 %, (e) 50 %, (f) 60 %, y con mutación del 10%	141
Figura 5.25. Resultados de sintonización con $Pc1$ de 10 a 80 % y (a) $Pc2 = 10\%$ y $Pm = 20\%$, (b) $Pc2 = 10\%$ y $Pm = 30\%$, (c) $Pc2 = 20\%$ y $Pm = 20\%$, (d) $Pc2 = 20\%$ y $Pm = 30\%$, (e) $Pc2 = 30\%$ y $Pm = 20\%$, (d) $Pc2 = 30\%$ y $Pm = 30\%$	142

Figura 5.26. Resultados de sintonización del tamaño de la población (<i>Tp</i>)	143
Figura 5.27. Resultados de sintonización del máximo número de generaciones (<i>MáxGen</i>)	144
Figura 5.28. Convergencia el Algoritmo Genético (30 pruebas)	145
Figura 5.29. Aptitud del primer tipo de cruzamiento (<i>Pc1</i>) con el segundo tipo de cruzamiento (<i>Pc2</i>) a (a) 10 %, (b) 20 %, (c) 30 %, y con mutación del 10%	149
Figura 5.30. Resultados de sintonización del porcentaje de mutación (<i>pm</i>)	150
Figura 5.31. Resultados de sintonización del tamaño de la población (<i>Tp</i>)	151
Figura 5.32. Resultados de sintonización del máximo número de generaciones (<i>MáxGen</i>)	151
Figura 5.33. Resultados de la convergencia del Algoritmo Genético (30 pruebas)	152
Figura 5.34. Microscopia óptica de barrido de los andamios con (a) mejor, (b) intermedia, (c) peor aptitud	157
Figura 5.35. Mantenimiento y proliferación de las NHOst por 168 horas	160
Figura 5.36. Estrategia de comprobación de los resultados del GA	161
Figura 5.37. Las diferentes condiciones experimentales (control, con andamios: mejor, intermedias y peores) de los osteoblastos humanos normales en cajas de 24 pozos a las 24, 96 y 148 horas	163
Figura 5.38. Resultados del conteo celular de las NHOst (a) células/ml, (b) % viabilidad celular	165
Figura 5.39. Andamios de PHB con aptitudes (a) mejor, (b) intermedia, (c) peor, después de cultivo con NHOst por 148 horas vistas en microscopio de epifluorescencia	167

Índice de tablas

Tabla 1.1. Ejemplos de complejidades comunes de algunos problemas (modificada de Karabed & Yu, 2014)	21
Tabla 3.1. Ventajas y desventajas de los GAs	48
Tabla 4.1. Relación de la arquitectura y propiedades de un andamio con las células (Domínguez-Díaz & Cruz-Chávez, 2015)	76
Tabla 5.1. Condiciones de síntesis bacteriana de una serie de PHBs y pesos moleculares promedio de cada uno de ellos	98
Tabla 5.2. Bandas de PHB de diferentes pesos moleculares	100
Tabla 5.3. Propiedades térmicas y cristalinidad de PHBs	110
Tabla 5.4. Condiciones en que mejora el crecimiento de los osteoblastos	122
Tabla 5.5. Rangos e intervalos de parámetros de electrohilado considerados para implementar el algoritmo	125
Tabla 5.6. Parámetros, rangos e intervalos a sintonizar del Algoritmo Genético	137
Tabla 5.7. Resultados obtenidos del Algoritmo Genético de los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud, ^a son los parámetros de procesado para realizar el andamio por medio de electrohilado, ^b son parte de la arquitectura del material y ^c son parte de las propiedades del materia. La <i>Aptitud</i> es la capacidad teórica que tiene cada uno de estos andamios para el crecimiento de osteoblastos	146
Tabla 5.8. Rangos de parámetros de electrohilado modificados para la implementación del Algoritmo Genético	147
Tabla 5.7. Resultados obtenidos del Algoritmo Genético de los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud, ^a son los parámetros de procesado para realizar el andamio por medio de electrohilado, ^b son parte de la arquitectura del material y ^c son parte de las propiedades del materia. La <i>Aptitud</i> es la capacidad teórica que tiene cada uno de estos andamios para el crecimiento de osteoblastos	153
Tabla 5.8. Resultados teóricos y experimentales del diámetro de hilo y del diámetro de poro de los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud	158

Prefacio

El tema del que trata la presente tesis doctoral incluye diversos aspectos de diferentes áreas del conocimiento. Si bien conozco el hecho de que se puede explorar este tema a mayor profundidad en cada uno de los campos tratados, también considero que se ha logrado un estudio armónico y completo hasta donde los objetivos del trabajo pretendían llegar. En el siglo pasado Erwin Schrödinger escribía lo siguiente en el prefacio de su libro “¿Qué es la vida?” (Schrödinger, 1944):

El científico debe poseer un conocimiento completo y profundo, de primera mano, de ciertos campos del conocimiento. En consecuencia, por lo general, se espera que no escriba sobre tema alguno en el cual no sea experto, siguiendo una conducta de *noblesse oblige*. Sin embargo, por esta vez, pido poder renunciar a la <<nobleza>> y quedar dispensado de las consiguientes obligaciones. Mi excusa es ésta: Hemos heredado de nuestros antepasados el anhelo profundo de un conocimiento unificado y universal. El mismo nombre, dado a las más altas instituciones de enseñanza, nos recuerda que, desde la Antigüedad y a través de los siglos, el aspecto *universal* de la ciencia ha sido el único que ha merecido un crédito absoluto. Pero la propagación, tanto en profundidad como en amplitud, de las múltiples ramas del conocimiento humano durante los últimos cien años nos ha enfrentado con un singular dilema. Por un lado, sentimos con claridad que sólo ahora estamos empezando a adquirir material de confianza para lograr soldar en un todo indiviso la suma de los conocimientos actuales. Pero, por el otro, se ha hecho poco menos que imposible para un solo cerebro dominar completamente más que una pequeña parte especializada del mismo. Yo no veo otra escapatoria frente a ese dilema (si queremos que nuestro verdadero objetivo no se pierda para siempre) que la de proponer que algunos de nosotros se aventuren a emprender una tarea sintetizadora de hechos y teorías, aunque a veces tengan de ellos un conocimiento incompleto e indirecto, y aun a riesgo de engañarnos a nosotros mismos.

El presente trabajo generó una serie de retos de coacción entre distintos puntos de las ciencias, para poder hacer que el proceso de investigación se enriqueciera en conjunto por todas las partes involucradas y no desde el punto en que cada una de ellas viera el tema a tratar de una manera aislada. Este tipo de investigaciones sirven como puentes entre disciplinas de manera que se enriquece el tema de estudio por medio de un entendimiento mutuo. Posicionando a todos los involucrados en un mismo contexto y conocimiento fundamental de todas las disciplinas, específicamente aplicadas al tema de particular interés. Para el estudiante es un reto en el que debe de ser capaz de entender el lenguaje utilizado en las diferentes disciplinas, unificándolo en el contexto propio del tema de tesis, y lograr una exposición dialéctica sin confusiones. Así mismo, todos los participantes de la investigación que se ven en este ejercicio de interdisciplinaridad ejercitan la capacidad de no quedarse posicionados en una opinión dada por su propio campo de estudio, sino en un proceso de análisis que incluye las posibilidades de acción de los diferentes campos y potencia el surgimiento de caminos inesperados para la solución de problemas. De esta manera, más allá del objetivo de la tesis, se crea por su medio conocimientos que pueden servir de base para el estudio transdisciplinar del tema que trata. Entendiéndose esto como aportar al tema un conocimiento más complejo y que aspira a ser revisado de manera constante. Ya que en el presente “Volvemos entonces a la imperiosa necesidad de proponer, vivir, aprender y enseñar un pensamiento complejo, que vuelva a tejer las disciplinas como posibilidad de humanidad en completitud; y que sólo de esta manera se vencería la eterna limitación y fragmentación del sujeto separado de sí mismo en la búsqueda del conocimiento” (Nicolescu, 1996). Es necesario realizar estudios considerando las diferentes herramientas que nos brinda la ciencia, sin olvidar el método científico y cada vez ir profundizando más en los diferentes aspectos de la investigación. Entre tan amplios horizontes sobre el tema que trata la presente tesis, este trabajo es una aportación pequeña al tema, que además de aportar un modelo de optimización (el cual está sujeto a mejoras), y un Algoritmo Genético para tratar el

tema del crecimiento de células sobre andamios, en lo particular ha abierto mi punto de vista con respecto a los métodos que se pueden utilizar para investigar y me ha generado nuevos retos en los cuales espero poder trabajar posteriormente. Le doy mi más sincero agradecimiento a mucha gente involucrada en este proyecto, quienes me han enseñado tantas cosas desde el punto de vista particular de sus áreas de trabajo.

Capítulo 1. Introducción

*["Si no conozco una cosa, la
investigaré."
Louis Pasteur]*

Capítulo 1. Introducción

En este capítulo se introduce sobre el tema tratado en la presente tesis. Un andamio es un **sustrato** que puede ser usado para implantar células, proveyéndoles de condiciones adecuadas que favorezcan su crecimiento, por lo cual es utilizado en aplicaciones de Ingeniería de Tejidos (Greiner *et al.* 2012; Mitchell & Tojeira, 2013). La definición del campo de la Ingeniería de Tejidos (TE por sus siglas en inglés) fue oficialmente descrita en 1988 en un Taller de la Fundación Nacional para la Ciencia (National Science Foundation) de Estados Unidos de América y se describe como “la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida a través de la comprensión fundamental de las relaciones de estructura-función en tejidos (normales y patológicos) de mamíferos, y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de tejidos” (O’Brien, 2011). Actualmente la TE es un área multidisciplinaria (Figura 1.1) con interacciones entre los biomateriales, la ciencia de materiales, la biología celular y molecular, y el modelado computacional, entre otras (Zilberman, 2011).

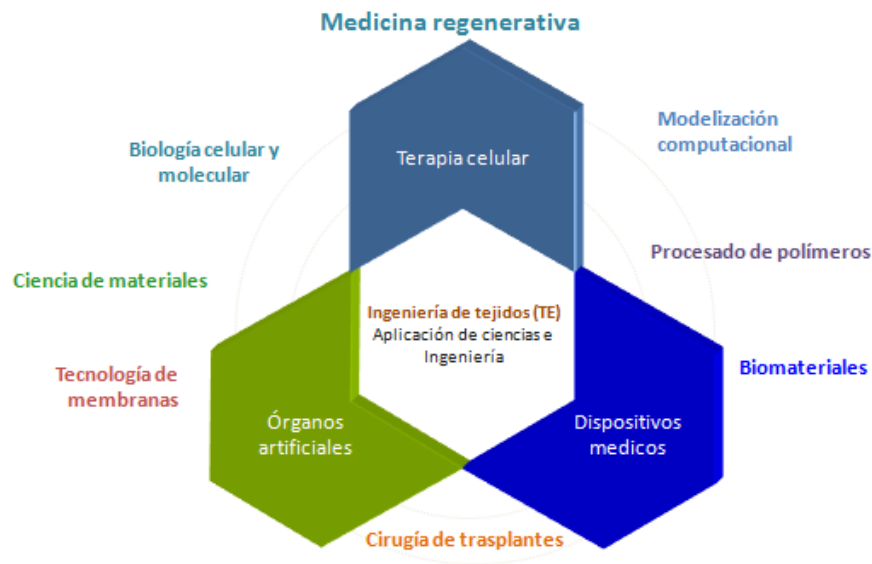


Figura 1.1. Interrelación de la ingeniería de tejidos en diversos campos (imagen basada en Zilberman, 2011).

Debido a que un andamio debe ser un sustituto biológico requiere propiedades de biocompatibilidad, para lo cual son usados diferentes tipos de materiales como son polímeros, cerámicos, metales y compuestos de los anteriores (Burdick & Mauck, 2011). Las estructuras de los andamios pueden ser anisotrópicas o isotrópicas en el nivel morfológico y topográfico dependiendo del proceso por medio del cual se fabrican. Algunos métodos de fabricación de andamios pueden ser Sólido de Forma Libre (SFF por sus siglas en inglés), Modelado por Deposición Fundida (FDM por sus siglas en inglés), Impresión Tridimensional (3DP), Electrohilado, Estereolitografía (SLA), Separación de Fases Térmicamente Inducida (TIPS), Formación de Espuma de Gas, Mallas de Fibras/Unión de Fibras, Moldeo Fundido, Emulsión de Liofilización, Fundición de Solución, Secado en Frío, Trazador 3D, Impresión de Chorro por Cambio de Fase (Mitchell & Tojeira, 2013; Sachlos & Czernuszka, 2003). Dependiendo del material base y del método de fabricación que se utilice se pueden obtener diferentes configuraciones de un andamio. Una configuración de un andamio puede ser definida por la arquitectura, la composición estructural y las propiedades del mismo. La arquitectura del andamio se conforma por la estructura física del andamio y que representa la escala que es llamada microestructura o incluso mesoestructura en la literatura mecánica, sin embargo en el área de ingeniería de tejidos este nivel es llamado ‘arquitectura del andamio’, por lo cual se denota a esta escala como ‘arquitectura’ (Hollister & Lin, 2007). Parámetros que conforman la arquitectura del andamio pueden ser la morfología, topografía, rugosidad de la superficie, porosidad, tamaño de poros, forma de poros, interconectividad de los poros. La composición estructural del andamio se refiere a la estructura química y la cristalinidad del material base. Mientras que las propiedades del andamio, como son el Módulo de Young (o Módulo de Elasticidad) y la hidrofobicidad del andamio, dependen de la combinación de la arquitectura y la composición estructural del andamio. La interacción entre la configuración de los andamios y las células influye en su proliferación, adhesión, diferenciación y alojamiento de las células (Mitchell & Tojeira, 2013; O’Brien, 2011; Zilberman, 2011; Burdick & Mauck, 2011).

Los andamios con diferentes configuraciones pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones, como pueden ser apósitos para heridas, liberación controlada de drogas, Ingeniería de Tejidos Vascular, Ingeniería de Tejidos Óseo (BTE por sus siglas en inglés), Ingeniería de Tejidos cardíaca, células madre de cáncer, regeneración esquelética, Ingeniería de Tejidos Neuronales, Ingeniería de Tejidos pediátrica (Keane & Badylak, 2014). Por lo que para el adecuado uso de los andamios es importante diseñarlos de acuerdo a la aplicación que tendrán. Para dicho fin se realizan estudios que buscan encontrar la combinación óptima (o configuración óptima) de parámetros para el diseño de andamios que además sea económica, con propiedades reproducibles y que pueden ser fabricados a gran escala (Bailey *et al.* 2013; Chen *et al.* 2011). Para hacer y mejorar los andamios se han utilizado técnicas que permitan una producción más rentable, por medio del diseño asistido por computadora y utilizando modelos anatómicos que facilitan el desarrollo de estructuras muy precisas o réplicas de los tejidos biológicos, así como para realizar la evaluación de las propiedades de los modelos de ingeniería de tejidos, para facilitar la planificación quirúrgica para su implantación (Tuan & Hutmacher, 2005). Sin embargo, no suelen realizarse estudios con una gama amplia de configuraciones de los andamios, lo cual sería interesante ya que ayudaría a comprender las complejas relaciones entre las diferentes configuraciones de un andamio y sus efectos en las células a mayor escala. Una limitación para hacer experimentos con un número de combinaciones de propiedades grande es que este tipo de experimentos son costosos en tiempo, dinero y materiales. Por lo cual, es deseable desarrollar métodos de optimización que puedan ayudar a resolver este problema.

Una forma de encontrar la mejor configuración posible de un sistema con respecto a un conjunto de objetivos es la optimización combinatoria. Esta es una de las áreas más activas de las matemáticas discretas y presenta diferentes metodologías para optimizar objetivos, como pueden ser métodos exactos y heurísticos (Korte & Vygen, 2008). Dado que la aplicación de los materiales depende de la compleja interacción entre sus propiedades y cómo optimizarlos, se ha desarrollado la Ciencia

de Materiales Combinatoria (CombiSci), la cual puede ayuda en el análisis de las propiedades de un material. Con esto se acelera el descubrimiento de nuevos materiales, así como la incorporación de una gama más amplia de variables de procesamiento, conducir al éxito en la creación de métodos más eficientes para recopilar y analizar grandes cantidades de datos, y la creación de bibliotecas digitales de las propiedades de los materiales (Rajan, 2008; Potyrailo *et al.* 2011). De esta manera el uso de métodos combinatorios se presenta como una excelente opción para optimizar las propiedades de andamios para el cultivo celular y es por esta razón que en este trabajo se propone un modelo de optimización para maximizar el crecimiento de osteoblastos en los andamios. El modelo de optimización propuesto se aplica por medio de un algoritmo genético el cual, utilizando las condiciones de procesado de un andamio por la técnica de electrohilado, calcula la arquitectura y propiedades del mismo, de manera que se puede analizar la relación entre la configuración del andamio y las condiciones necesarias para cultivo de osteoblastos en el mismo.

1.1. Planteamiento del problema

El problema que se trata en la presente tesis doctoral es optimizar el crecimiento de células sobre un andamio, encontrando una configuración que sea adecuada para dicho fin. Para obtener una solución a este problema se aplicara un Algoritmo Genético con el objetivo de Maximizar el Crecimiento de Osteoblastos Normales Humanos sobre Andamios del polímero Polihidroxitirato. Los parámetros que se pueden variar para buscar maximizar el crecimiento de células (independientemente del tipo de células que sean) son diversos. En particular en este trabajo utilizamos los parámetros de arquitectura denominados diámetro de hilo (h), diámetro de poro (P) y la porosidad del andamio (ϕ). Por otra parte, nos referimos como propiedades del andamio al Módulo de Young (E) y el ángulo de contacto (θ). Las diferentes configuraciones de un andamio afectan la proliferación, diferenciación y alojamiento de las células (Karp *et al.* 2003). De esta manera, si conocemos como se ven afectadas las células por los diferentes tipos de configuraciones de un andamio

podríamos lograr un mejor uso de los mismos. Sin embargo, la mayoría de los estudios del efecto de un andamio sobre el crecimiento de células tienen un enfoque a prueba y error, lo que hace que solo puedan cubrir un corto abanico de posibilidades. Esto es porque la realización de los experimentos implica un alto costo de tiempo y dinero, debido a que para llevarlos a cabo se necesita un número mínimo de repeticiones del experimento, los cuales pueden requerir desde semanas a meses, dependiendo de la condición específica que se desee estudiar. Además, el uso de células o tejidos es caro. Debido a todo lo mencionado, el uso de técnicas que puedan ayudar a entender la interrelación andamio-células optimizando el gasto de recursos y tiempos es muy importante. Hay que considerar que para la realización de los andamios se planteó el uso de la técnica de electrohilado. En esta técnica se aplica un voltaje dado a una solución polimérica que es eyectada hacia una pantalla colectora (en el capítulo 3 de esta tesis se trata más a detalle este tema). Sobre el electrohilado se han realizado muchos estudios para conocer el efecto de los parámetros de procesamiento sobre la configuración que se puede llegar a obtener. Por lo cual, en el presente trabajo de investigación se utilizó dicha técnica para producir andamios para cultivo de células. La problemática mencionada genera ciertas preguntas, las cuales se mencionan a continuación.

1.2. Preguntas de investigación

1. ¿Se pueden definir parámetros del problema de cultivo de células en un andamio?
2. ¿Se puede generar un Modelo de Optimización que tenga por objetivo maximizar el crecimiento de células a través de la optimización de los parámetros mencionados?
3. ¿Se puede implementar el Modelo de Optimización por medio de un Algoritmo Genético que sirva para encontrar la mejor configuración de un andamio para cultivo de células?.

4. ¿Se pueden implementar los resultados obtenidos por medio de un Algoritmo Genético experimentalmente en la prueba de un andamio para cultivo de células?
5. Los resultados obtenidos por medio de un Algoritmo Genético para optimizar el crecimiento de células en un andamio ¿pueden presentar tendencias similares a las esperadas en la realidad?
6. Los cambios entre diferentes configuraciones de andamios para cultivo de células ¿pueden mostrar diferencias medibles en el crecimiento de las mismas?

1.3. Hipótesis

El crecimiento de células sobre andamios para aplicaciones en cultivo celular y de ingeniería de tejidos puede ser optimizado por medio del control de su arquitectura y propiedades con ayuda de un Algoritmo Genético.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo principal:

Maximizar el crecimiento de Osteoblastos Normales Humanos sobre andamios del polímero Polihidroxibutirato (PHB), obtenidos por medio de la técnica de electrohilado, utilizando un Algoritmo Genético (GA) para encontrar las condiciones de arquitectura (diámetro de poro y porosidad) y propiedades (Módulo de Young y ángulo de contacto) más adecuadas.

1.4.2. Objetivos secundarios:

1. Proponer un modelo de optimización para el problema de optimización del crecimiento de células sobre un andamio.

2. Programar un Algoritmo Genético (GA), con base al modelo de optimización propuesto, que pueda generar de manera computacional diferentes configuraciones de andamios y que busque una configuración (con una arquitectura y propiedades definidas) que favorezca el crecimiento de osteoblastos con respecto de otras soluciones (configuraciones de andamios).
3. Comparar la solución con mejor aptitud obtenida por medio del GA con una solución con aptitud de valor intermedio y otra con la peor aptitud.
4. Producir andamios a partir del polímero PHB con base de los parámetros de procesado de la solución con mejor aptitud encontrada por medio del GA, así como de un par de soluciones más (las de aptitud intermedia y peor), por medio de la técnica de electrohilado.
5. Cultivar osteoblastos sobre los andamios generados por electrohilado y corroborar si en el caso de la solución con mejor aptitud aumentó el crecimiento y viabilidad de los osteoblastos, con respecto a las soluciones de aptitud intermedia y peor, hasta 148 horas.

1.5. Justificación

El desarrollo de trabajos sobre el equilibrio de la arquitectura y propiedades (es decir la configuración) de los andamios con las células es constante. Sin embargo, aún falta mucho por comprender al respecto, particularmente con respecto a las interacciones entre los andamios y su entorno de acogida, así como la manera en que estas interacciones regulan la regeneración y la forma en que se pueden mejorar para la reparación tisular óptima (Mauney & Adam, 2015). Experimentalmente se han realizado diversos estudios a prueba y error, pero se necesita implementar métodos que nos guíen en la búsqueda de las mejores condiciones del andamio optimizando los recursos. Por lo anterior un estudio como el que se propone en la presente tesis

puede, además de ayudar en la comprensión de este tema, servir para eficientar los recursos utilizados en el proceso experimental.

En el aspecto computacional este tema es novedoso y presenta diversos retos, que van desde el propio tratamiento del problema por medio de la optimización combinatoria, aplicada a la necesidad de construir un modelo de optimización por medio del cual se puede implementar el Algoritmo Genético (GA por sus siglas en inglés), pasando por la representación simbólica y el diseño del propio GA, así como analizar el comportamiento y validez de un GA aplicado a este tema.

Por otra parte el hecho de que los resultados del Algoritmo Genético se deban poner a prueba de manera experimental presentan diferentes retos que van desde la generación de protocolos adecuados para tal caso, así como la transición de los resultados obtenidos por medio de un algoritmo a mediciones cualitativas y cuantitativas que nos permitan representarlos de manera certera, así como la posibilidad de realizar una posterior retroalimentación del algoritmo con los resultados obtenidos.

Este trabajo también se presenta como un estudio modelo de la Ingeniería de Tejidos, ya que sigue el proceso de estudio de los materiales para utilizarlos en una aplicación específica y su posterior diseño de alto rendimiento, lo cual corresponde a la metodología usada en una área llamada high throughput en inglés, y que incluye este trabajo en una línea novedosa de forma de desarrollo de nuevos materiales. Así como también el uso de osteoblastos normales humanos circunscribe la investigación en el área de Ingeniería de Tejidos Óseo (BTE, por sus siglas en inglés de Bone Tissue Engineering), la cual actualmente es una de las líneas más activas al ser las células de huesos un paradigma para el estudio de la Ingeniería de Tejidos por su capacidad de regeneración (Kasuya & Tanashita, 2012).

Por la parte del conocimiento de propiedades de los materiales, hay que mencionar que en este estudio se utilizó el polímero biodegradable y biocompatible llamado Polihidroxibutirato (PHB) donado por investigadores del Instituto de

Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), quienes lo sintetizaron por medio de bacterias. De esta manera, este trabajo presenta resultados de caracterización básica del PHB, ya que se analizó una serie de PHBs que varían en su peso molecular promedio (desde pesos moleculares bajos hasta altos) y se puede ver como la conformación de los distintos pesos moleculares puede variar las propiedades de los PHBs y lo que hace que puedan servir para diferentes aplicaciones.

En lo subsiguiente se presentan nociones desde las cuales partir para el posterior análisis de la investigación, para sentar las bases necesarias de la comprensión de la presente tesis. Empezaremos por plantear el tema de la dificultad de resolver algunos problemas, para ir situándonos en el ámbito en que trabajaremos.

1.6. Contribución de la tesis

El presente trabajo de tesis doctoral generó las siguientes contribuciones:

- Planteamiento de una función objetivo para maximizar el crecimiento de osteoblastos sobre andamios del polímero polihidroxibutirato.
- Planteamiento de parámetros de estudio del problema, que pueden ser utilizados en otros trabajos para implementar propuestas de solución al problema planteado.
- Diseño y aplicación de un algoritmo genético que genera una solución de un andamio para cultivo de osteoblastos sobre andamios de polihidroxibutirato, el cual presenta como resultados los parámetros de procesado para poder obtener de manera experimental el andamio, así como la arquitectura y propiedades del mismo.
- Propuesta de visualización del espacio de soluciones del problema.

- El algoritmo desarrollado genera datos que pueden ser analizados para estudiar la relación entre la configuración de un andamio y los efectos que esta produce sobre el crecimiento de osteoblastos.
- Reducción de costos en los estudios de andamios para Ingeniería de Tejidos.

1.7. Alcance de la tesis

1. **Propuesta de un modelo de optimización:** Se planteó un modelo para optimizar el crecimiento de osteoblastos sobre andamios de polihidroxibutirato (PHB).
2. **Implementación de un Algoritmo Genético:** Se implementó un Algoritmo Genético para el problema, con el objetivo de encontrar una configuración de un andamio que optimice el crecimiento de osteoblastos sobre andamios de PHB.
3. **Comprensión del sistema.** Se estudio cómo afecta la arquitectura y propiedades de andamios de PHB en su aplicación en cultivo de osteoblastos normales humanos, lo cual es de utilidad en el estudio y comprensión del sistema, para mejorar la optimización de andamios para su aplicación en ingeniería de tejidos.
4. **Procesado de andamios.** Se generaron andamios por medio del método de electrohilado.
5. **Medición del diámetro de poro de los andamios.** Se realizó corroboró que tan cercanos son los resultados teóricos de diámetro de poro obtenidos a través del algoritmo con los resultados que se pueden obtener experimentalmente.
6. **Corrección del modelo de optimización y parámetros utilizados en el algoritmo:** Se realizaron ajustes al modelo de optimización y al algoritmo de acuerdo a los resultados de caracterización obtenidos.

7. **Crecimiento de osteoblastos sobre los andamios.** Se realizaron pruebas de crecimiento de osteoblastos normales humanos sobre los andamios de PHB, evaluando la proliferación celular.

1.8. Contenido de la tesis

El contenido de esta tesis es el siguiente. El capítulo 1 presenta una introducción al tema a tratarse en la presente tesis, su importancia y teoría básica utilizada para el estudio que se llevo a cabo. En el capítulo 2 se encuentra el marco Teórico, con los conceptos básicos del área de desarrollo de la presente tesis. En el capítulo 3 se presenta la metodología de investigación, en la cual se incluyen los materiales y métodos (tanto computacionales como experimentales) utilizados. En el capítulo 4 se encuentra el diseño del modelo de optimización y del Algoritmo Genético, así como las ecuaciones utilizadas para implementarlos. En el capítulo 5 se encuentra el estudio sobre el material con el que se realizaron los andamios para este proyecto y la justificación de porque se eligió tal material, la implementación del modelo de optimización y el Algoritmo Genético, así como las pruebas y el análisis computacional del algoritmo, y la implementación experimental de los resultados obtenidos por medio del Algoritmo Genético. Y por último el capítulo 6 contiene las conclusiones y trabajo futuro.

Capítulo 2. Marco Teórico

*["Cada frase que pronuncio
no puede considerarse una
afirmación sino una
pregunta."
Niels Bohr]*

Capítulo 2. Marco Teórico

En este capítulo se presentan los conceptos básicos para el desarrollo de la presente tesis.

2.1. Dificultades que se pueden presentar al tratar de resolver problemas del mundo real

Si bien al plantearnos el problema de optimizar el crecimiento de osteoblastos sobre un andamio de poli-3-hidroxi-butirato nos encontramos frente a diversos retos inherentes a este tema, en general en el mundo real los problemas son difíciles de resolver por diversas razones (Michalewicz & Fogel, 2004) entre las que podemos mencionar las siguientes:

- El número de posibles soluciones en el espacio de búsqueda es muy grande para realizar una búsqueda exhaustiva de la mejor respuesta.
- El problema es muy complicado como para dar una respuesta del todo, por lo cual se deben usar modelos del problema que lo simplifiquen para hacerlo más tratable. Si no se tiene cuidado estos modelos pueden resultar esencialmente no aptos al generar soluciones malas.
- La evaluación de la función que describe la calidad de una solución propuesta es ruidosa o varía con el tiempo, por lo cual requiere la evaluación de una serie entera de soluciones.
- Las soluciones son tan altamente restringidas que construir una respuesta factible es difícil.
- La persona que resuelve el problema no tiene la preparación adecuada para descubrir una solución.

Además existen otros obstáculos como el ruido asociado con nuestras observaciones y medidas, la dificultad de tener objetivos múltiples y que se

encuentran en conflicto entre ellos, y hay que recordar que cada problema tiene sus propias dificultades. Por lo cual para resolver un problema debemos comprenderlo y de esta manera examinar cada una de estas cuestiones y sus detalles, algunas de las cuales se comentaran a continuación.

2.1.1. El tamaño del espacio de búsqueda

Para ejemplificar la importancia del tamaño del espacio de búsqueda consideraremos el problema del agente viajero (TSP, por sus siglas en inglés de Traveling Salesman Problem). Existen diversas variaciones del TSP, pero esencialmente trata sobre un agente viajero que debe visitar cada ciudad en un territorio una única vez y regresar al punto de partida cubriendo la menor distancia posible. En particular en el problema llamado TSP simétrico simple (Figura 2.1) la distancia entre cada par de ciudades i y j es la misma en cualquiera de las dos direcciones, es decir que distancia $(i, j) = \text{distancia}(j, i)$ (Michalewicz & Fogel, 2004).

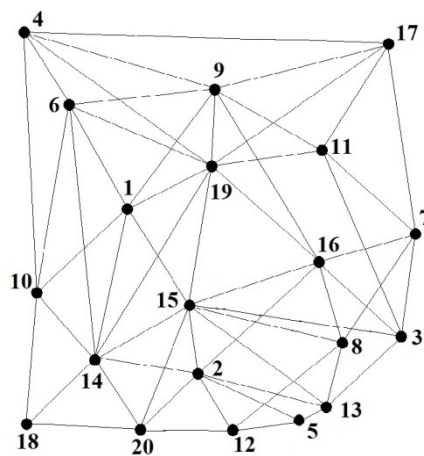


Figura 2.1. TSP simétrico simple de 20 ciudades (modificado de Michalewicz & Fogel, 2004).

El espacio de búsqueda del TSP puede ser un conjunto de permutaciones de n ciudades. Una permutación de n ciudades representa una lista ordenada que define la secuencia de ciudades a visitar. La solución óptima es una permutación que representa el costo mínimo del recorrido. Para un TSP simétrico cada recorrido puede ser representado en $2n$ diferentes maneras. Debido a que estas son $n!$ maneras de permutar n números, el tamaño del espacio de búsqueda es $|S| = n!/(2n) = (n - 1)!/2$. Por ejemplo, para un $n = 6$ el número de posible soluciones es $5!/2 = 60$, mientras que para un $n = 7$ las posibles soluciones son 360, para un $n = 10$ se pueden tener 181000 posibles soluciones (Michalewicz & Fogel, 2004). Así que para un $n = 20$ tenemos 60822550204416000 posibles soluciones, las cuales son demasiadas como para poder verificar cada una de ellas en poco tiempo.

2.1.2. El modelado del problema

Para poder trabajar sobre un problema necesitamos un modelo del mismo, el cual es una representación del mundo real. Cuando resolvemos un problema en realidad estamos resolviendo el modelo del problema. El proceso para resolver un problema consiste en dos pasos: (1) crear el modelo del problema, y (2) usar el modelo para generar una solución. La solución que se obtiene solo es solución del modelo presentado, por lo cual si tenemos un modelo con alto grado de fidelidad nuestra solución puede ser significativa, mientras que si tiene demasiadas suposiciones que no se cumplen y aproximaciones inciertas la solución puede no tener sentido o ser mala (Michalewicz & Fogel, 2004). Si bien el uso de los modelos puede ser aplicado incluso de manera inconsciente en la resolución de problemas, en el área de optimización se utilizan específicamente los modelos matemáticos que están asociados a diferentes parámetros que se deben cumplir y que dependen de cada tipo de problema. Dichos parámetros son las restricciones, concepto que se encuentra presente en diferentes ámbitos y que a continuación se explicará.

2.1.3. Restricciones

Casi todos los problemas prácticos poseen restricciones y si se violan las restricciones no se puede implementar la solución. Existen restricciones duras y suaves. Las restricciones duras son las que deben ser satisfechas para obtener una solución factible, y las restricciones suaves son las que esperamos cumplir pero no es obligatorio que así sea. En principio se puede pensar que las restricciones del problema pueden hacer que se encuentre la solución de manera más fácil, ya que hacen que el espacio de búsqueda sea más pequeño y de esta manera tenemos menos soluciones que considerar. Sin embargo hay que recordar que para buscar una mejor solución necesitamos movernos de una solución a la siguiente. Para esto se necesitan operadores que actúen sobre soluciones factibles y ayuden a generar nuevas soluciones factibles que son mejores que las que encontramos anteriormente. Para encontrar la solución del problema podríamos descartar las soluciones infactibles desde un principio o tratar de repararlas para generar una solución factible. Sin embargo también podríamos utilizar soluciones que no cumplan las restricciones suaves y utilizar operadores que actúen sobre ellas dirigiendo la búsqueda de la solución factible hasta encontrar la mejor solución (Michalewicz & Fogel, 2004).

Debido a la búsqueda de la resolución de problemas se ha trabajado en el desarrollo de la optimización combinatoria (OC), la cual considera en su metodología los puntos anteriormente expuestos y sobre la que hablaremos con más detalle a continuación.

2.1.4. El cambio sobre el tiempo

Los problemas del mundo real cambian con el tiempo debido a cuestiones como pueden ser el azar, por lo cual se debe tratar de trabajar con modelos que incluyan maneras de considerar los imprevistos que pueden surgir. Para esto es necesario conocer muy bien el problema, para poder incluir condiciones en el modelo

que representen lo más cercanamente posible la realidad y de esta manera poder tener soluciones que sirvan para resolver el problema que estamos tratando (Michalewicz & Fogel, 2004).

2.2. Optimización combinatoria

La Optimización Combinatoria (OC) es un campo muy activo de las matemáticas discretas, la cual tiene su origen en la combinatoria, la investigación de operaciones y la informática teórica (Korte & Vygen, 2008). La optimización es el proceso de seleccionar la mejor solución desde un abanico de posibles candidatos, es decir el espacio de búsqueda. En otras palabras un sistema S, que tiene que ser optimizado en términos de un valor de salida y la calidad de los candidatos del espacio de búsqueda, se pone en un nuevo estado que tiene una mejor calidad que el valor de salida y que el estado anterior (Köppen *et al.*, 2011).

Es muy interesante el hecho de que miles de problemas, tanto cotidianos como más abstractos, pueden ser tratados por medio de la OC y ser implementados de diferentes maneras, desde medios gráficos o por programación lineal (PL), hasta por métodos denominados heurísticos y metaheurísticos. De esta manera se pueden encontrar aplicaciones de la OC incluso en áreas como la biología o la Ciencia de Materiales (Korte & Vygen, 2008).

En particular, las Metodologías combinatorias aplicadas a la Ciencia de Materiales han creado la rama denominada Ciencia de Materiales Combinatoria (CombiSci, por sus siglas en inglés), la cual busca encontrar la mejor configuración de un material para un determinado propósito. Además de esto, la CombiSci también puede permitir crear grandes cantidades de datos y de información (Meredith *et al.* 2002; Broderick *et al.* 2008). Algunos de los temas cubiertos por la CombiSci son la síntesis de polímeros y aleaciones de metal (Meredith *et al.* 2002; Juárez-Chávez *et al.* 2012; Domínguez-Díaz & Cruz-Chávez, 2015).

Una de las razones por lo cual la OC es de vital importancia es el hecho de que algunos problemas demandan una fuerte inversión de recursos (ya sea tiempo, materiales o dinero) para poder resolverlos. Sin embargo, no todos los métodos de la OC pueden resolver con la misma facilidad un problema y esto es porque no todos los problemas presentan la misma complejidad. En el área de se trata la complejidad algorítmica y la complejidad de los problemas, las cuales son áreas de estudio fundamentales que ayudan en la comprensión de los algoritmos que se emplean y los problemas que se estudian, para poder desarrollar métodos más eficientes para resolver problemas. A continuación, se explican las bases de la complejidad algorítmica y la complejidad de los problemas. En este aspecto no se ha encontrado algo escrito sobre la complejidad tanto algorítmica como la del problema que estamos tratando y el objetivo primordial del proyecto de tesis doctoral no es estudiar la complejidad del problema, ya que para ello sería necesario un estudio más detallado enfocado solamente a este aspecto. Sin embargo, más adelante se presenta la complejidad algorítmica del algoritmo implementado.

2.3. Complejidad algorítmica

Un algoritmo es un método para resolver problemas en una computadora. La complejidad de un algoritmo es el costo, medido en tiempo de ejecución, o almacenamiento, o las unidades que sean relevantes, que presenta el utilizar el algoritmo para resolver un problema (Wilf, 2002). De esta manera la Complejidad Algorítmica estudia la eficiencia de los algoritmos basado en el tiempo y en el espacio de memoria (almacenamiento) necesarios para resolver un problema computacional, lo que es conocido respectivamente como Complejidad Temporal y Complejidad Espacial (Sipser, 2013). La importancia de entender estos conceptos se debe a que se espera que se puedan obtener soluciones de manera rápida y que no consuman demasiado espacio computacional, es decir que se restrinjan a una cantidad adecuada de recursos disponibles. Además, de que es necesario poder comparar

diferentes algoritmos que resuelven un problema, por lo cual se explica a continuación los conceptos fundamentales de este tema.

La complejidad temporal se refiere al tiempo que necesita un algoritmo para resolver un problema. Sin embargo este tiempo depende de diversos aspectos como son el tipo de software y hardware que se utilice, el sistema operativo que se utiliza, así como la misma habilidad del programador. De esta manera para poder establecer una métrica que nos permita calcular el tiempo de ejecución de un algoritmo se suele medir la eficiencia computacional del algoritmo como el número de operaciones básicas que se realiza como función de la longitud de la entrada (n). Es decir, la eficiencia de un algoritmo puede ser expresada por una función T del conjunto de números naturales N , de tal manera que $T(n)$ es igual al número máximo de operaciones básicas que el algoritmo lleva a cabo en las entradas de longitud n (Arora & Barak, 2009). La entrada en problemas de optimización combinatoria es un objeto combinatorio: un grafo, un conjunto de enteros (posiblemente dispuestos en vectores y matrices), una familia de conjuntos finitos, etc (Papadimitriou & Steiglitz, 1998). La complejidad espacial se define de forma análoga para el espacio de memoria necesario para resolver un problema, el cual puede ser afectado por el tipo de programación, la velocidad del procesador y el compilador que se utiliza para ejecutar el programa (Jungnickel, 2013).

La tasa de crecimiento en el tiempo de ejecución de un algoritmo con el aumento del tamaño de la entrada del problema determina la viabilidad del algoritmo. Las tasas de crecimiento se describen por funciones matemáticas que pueden clasificarse ya sea como polinomiales o exponenciales. Para cualquier función exponencial y cualquier polinomio hay un valor de n más allá del cual la función exponencial es siempre el mayor. Por esta razón, los algoritmos cuyo tiempo de ejecución se incrementa como una función exponencial del tamaño del problema se consideran ineficientes. Algoritmos cuyo tiempo de ejecución aumenta en función polinómica son considerados eficientes (Lewis & Papadimitriou, 1978). La complejidad siempre es medida por el peor caso posible para una entrada de

especifico (Jungnickel, 2013). El peor caso es el tiempo tomado si la peor cosa sucede, $T(n)$ es el máximo tiempo tomado sobre todas las entradas de tamaño n . Mientras que el caso promedio es el tiempo de ejecución esperado, dada alguna distribución de probabilidad sobre las entradas (usualmente uniforme), $T(n)$ es el tiempo medio tomado sobre todas las entradas de tamaño n (Parberry, 2001). En la tabla 2.1 se encuentran ejemplos de complejidades comunes, representadas por medio de la notación de la O grande.

Tabla 2.1. Ejemplos de complejidades comunes de algunos problemas (modificada de Karabed & Yu, 2014).

Notación	Nombre	Ejemplo
$O(1)$	Constante	La determinación de si un número es par o impar.
$O(\log \log n)$	Logarítmico doble	Encontrar un elemento mediante la búsqueda de interpolación en una matriz ordenada de valores distribuidos uniformemente.
$O(\log n)$	Logarítmico	Encontrar un elemento de una matriz ordenada con búsqueda binaria.
$O(n^c), 0 < c < 1$	Potencia fraccionaria	La búsqueda en un árbol kd .
$O(n)$	Lineal	Encontrar a un elemento de una lista sin ordenar.
$O(n \log n) = O(\log n!)$	Lineal, lineal logarítmica, y cuasi-lineal	Realizar una transformada rápida de Fourier.
$O(n^2)$	Cuadrática	Ordenamiento de burbuja (peor de los casos).
$O(n^c), c > 1$	Polinomial o algebraica	Máxima coincidente para grafos bipartitos .
$O(c^n), c > 1$	Exponencial	Encontrar la solución (exacta) al problema del viajante de comercio utilizando programación dinámica.
$O(n!)$	Factorial	La solución del problema del viajante de comercio a través de la búsqueda de fuerza bruta .

En informática, se utiliza la notación de la O grande (BigO) para clasificar los algoritmos por cómo responden (ya sea a los requerimientos del tiempo de procesamiento o del espacio de trabajo) a los cambios en el tamaño de la entrada (proceso de análisis de algoritmos). De la misma manera la complejidad espacial es

definida para el espacio de memoria necesario. La notación de la O grande caracteriza funciones de acuerdo a sus tasas de crecimiento, de manera que diferentes funciones con la misma tasa de crecimiento son representadas con la misma notación O (Karabed & Yu, 2014). Por lo cual la solución del problema del Agente viajero a través de la búsqueda de fuerza bruta presenta mayor complejidad ($O(1)$) que el primer caso representado en la Tabla 2.1., la cual es la determinación de si un número es par o impar ($O(n!)$). Ya que “un algoritmo eficiente es aquel que requiere un número de pasos que crece como un polinomio en el tamaño de la entrada” (Papadimitriou & Steiglitz, 1998). Ahora bien, los problemas en sí mismos presentan un tipo de complejidad denominada “complejidad de los problemas”, la que será explicada a continuación.

2.4. Complejidad de los problemas

La teoría de la complejidad (o complejidad computacional) es un campo central de las ciencias computacionales, que estudia lo que puede y lo que no puede ser calculado utilizando recursos limitados, como pueden ser el espacio y el tiempo (Rudich, 2000; Goldreich, 2000), de los cuales hablamos en el apartado 1.7. Los problemas computacionales pueden ser fáciles y difíciles. Por ejemplo, el problema de arreglar una lista de números en orden ascendente es fácil. En cambio encontrar la manera de ordenar las clases de una universidad entera para satisfacer restricciones, por ejemplo de horarios y disponibilidades de salones o materiales, en un tiempo razonable es mucho más difícil y dicha dificultad crece con forme aumenta el número de clases y restricciones que se deben de organizar (Sipser, 1997). Muchos problemas de optimización pueden ser resueltos por medio de un algoritmo en tiempo polinomial, sin embargo para muchos problemas importantes no se conoce ningún algoritmo de tiempo polinomial, es decir que no existen algoritmos eficientes que puedan resolverlos. Para comprender mejor estos conceptos utilizamos el modelo de computación denominado “la máquina de Turing”, que es una definición precisa de

un algoritmo en tiempo polinómico. La máquina de Turing se puede considerar como una secuencia de instrucciones sencillas (en forma de símbolos) que trabajan en una cadena (una tira de cinta), con forma a una serie de reglas y con ella se puede simular la lógica de un algoritmo (Korte & Vygen, 2008). A continuación se explicará a partir del modelo de Turing las definiciones de tiempo polinomial y de los tipos de problemas que existen.

Definición 1.1 (tiempo polinomial). Decimos que una máquina de Turing M es de tiempo polinomial si existe un polinomio p de modo que por cada $x \in \{0,1\}^*$, cuando se invoca un dato de entrada (“input”) x , la máquina M se detiene después de la mayoría de los pasos $p(|x|)$ (Goldreich, 2000).

El número (finito) de pasos que el algoritmo precisa para resolver una **instancia** (o “ejemplo”), es decir para producir la respuesta o datos de salida (“output”), depende de los datos de entrada de dicha **instancia** (Salazar, 2001).

La mayor parte de la teoría de la complejidad se basa en los problemas de decisión. Cualquier lenguaje $S \subseteq \{0,1\}^*$ puede interpretarse como un problema de decisión: dada una secuencia de 0-1 (en este caso la **instancia**), decidir si pertenece a S (Korte & Vygen, 2008), que es lo que expresa la definición 1.2 de manera más formal:

Definición 1.2 (problema de decisión). Un problema de decisión es un par $P = (X, Y)$, donde X es un lenguaje decidable en tiempo polinomial y $Y \subseteq X$. Los elementos de X son llamados casos de P ; los elementos de Y son casos-sí, donde $X \setminus Y$ son casos-no. Un algoritmo para un problema de decisión (X, Y) es un algoritmo de cálculo de la función $f: X \rightarrow \{0,1\}$, definido por $f(x) = 1$ para $x \in Y$ y $f(x) = 0$ para $x \in X \setminus Y$ (Korte & Vygen, 2008).

La definición 1.2 indica que un problema se dice decisional sí su respuesta es “sí” o “no”. Se llama problema complemento de un problema decisional a otro que pregunta lo opuesto (Salazar, 2001). Es necesario que podamos decidir esto en tiempo

polinomial y cuando se puede realizar esto significa que el problema pertenece a la clase de complejidad P como se ve en la definición 1.3:

Definición 1.3 (la clase de complejidad P). Un problema de decisión $S \subseteq \{0,1\}^*$ es resoluble en tiempo polinomial si existe una máquina de Turing M determinista de tiempo polinómico tal que $M(x) = 1$ si y solo si $x \in S$. La clase de problemas de búsqueda que son resolubles en tiempo polinomial es denotada P (Goldreich, 2000).

De esta manera, la clase de problemas de decisión que se sabe que tienen algoritmos eficientes se llama P (polinomio determinista, o, simplemente, polinómica) (Calude *et al.* 2013). Es decir que los problemas P son una clase de problemas que pueden ser resueltos en todas sus diferentes instancias en el peor de los casos por un algoritmo determinístico en tiempo polinomial (Garey & Johnson, 1976). Sin embargo existe una clase de problemas, muchos de ellos de importancia práctica fundamental, para los cuales no han sido encontrados algoritmos eficientes que los resuelvan en tiempo polinómico, esta clase se llama NP y contiene a la clase P (proposición 1.1. $P \subseteq NP$) (Korte & Vygen, 2008). A continuación se presenta la definición de los problemas NP :

Definición 1.4 (la clase de complejidad NP). Un problema se dice que pertenece a la clase NP (no determinista polinómica) si toda **instancia** con respuesta “sí” puede ser solucionada en tiempo polinomial por un algoritmo. Un problema se dice que pertenece a la clase $co-NP$ (complemento de NP) si toda instancia con respuesta “no” puede ser resuelto en tiempo polinomial (Salazar, 2001).

Papadimitriou introdujo varias clases de problemas NP de búsqueda basado en los principios combinatorios que garantizan la existencia de soluciones a los problemas. Muchos de los interesantes problemas que no son resolubles en tiempo polinomial son contenidos en estas clases, y un número de estos son llamados problemas NP -completos. Intuitivamente un problema NP -completo es un problema

computacional que es *tan duro como cualquier problema razonable* y presenta las siguientes propiedades (Papadimitriou & Steiglitz, 1998):

1. No hay problema *NP*-completo que pueda ser resuelto por cualquier algoritmo polinomial.
2. Si hay un algoritmo polinomial para algún problema *NP*-completo, entonces hay algoritmos polinomiales para todos los problemas *NP*-completos.

Basados en las dos propiedades anteriores se ha propuesto que si la segunda fuera verdad entonces $P = NP = NP$ -completo, lo cual permitiría que en los problemas en los que actualmente se tarda mucho en obtener una solución (la cual no es la óptima sino una sub-óptima, ya que no es posible llegar a obtener la óptima por medio de exploración de todas las posibles soluciones) se pudiera encontrar la solución óptima en tiempo polinomial. En esencia el diagrama de Euler de la figura 1.3 nos puede orientar en la comprensión de la relación existente entre las clases de problemas mencionadas, como actualmente se conocen (Salazar, 2001), donde $P \neq NP$ (Figura 2.2 (a)) y en el caso de que $P = NP$ (Figura 2.2 (b)).

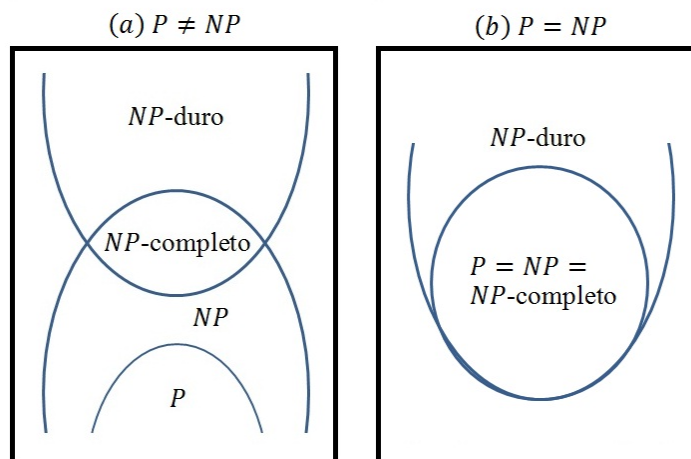


Figura 2.2. Clases de problemas (a) si como se conoce actualmente $P \neq NP$ y (b) si se prueba que $P = NP$ (diseñado a partir de Salazar, 2001).

La explicación de las diversas clasificaciones de complejidad de los problemas puede ser muy extensa, sin embargo esta breve descripción es suficiente para explicar los tipos de problemas a los que nos enfrentamos y que debido a la constante búsqueda de mejora de la eficiencia de los algoritmos que los resuelven es que se trabaja con métodos para encontrar soluciones. A continuación se explicará brevemente sobre técnicas de búsqueda para resolución de problemas.

2.5. Técnicas de búsqueda

Para solucionar diferentes tipos de problemas se pueden utilizar diferentes técnicas de búsqueda, que pueden ser algoritmos deterministas y no-deterministas (Sivanandam & Deepa, 2008). En los algoritmos deterministas una entrada del algoritmo produce una misma salida y se garantiza la solución al problema. En cambio en los algoritmos no-deterministas una misma entrada puede generar diferentes salidas. En un algoritmo de búsqueda un número de posibles soluciones a un problema están disponibles y se debe encontrar la mejor solución posible en una cantidad fija de tiempo. Las técnicas de búsqueda se pueden dividir en 3 principales ramas que son las basadas en cálculos, las aleatorias y las enumerativas, como se ve en la figura 2.3 (Sivanandam & Deepa, 2008).

Cuando el espacio de búsqueda es pequeño todas las posibles soluciones pueden ser examinadas en un plazo de tiempo razonable y de esta manera llegar a la solución óptima. Sin embargo, cuando los espacios son grandes esta búsqueda exhaustiva es impráctica. Los algoritmos de búsqueda tradicionales toman muestras al azar (ej. caminata aleatoria) o una muestra heurística (ej. descenso de gradiente) del espacio de búsqueda, esperando encontrar una solución en un tiempo razonable (Araujo, 2009; Sivanandam, 2008). Las heurísticas y metaheurísticas, como son búsqueda Tabú, Recocido Simulado y Algoritmos genéticos, son una opción para la

resolución de problemas en que no se realiza una búsqueda exhaustiva y a continuación se explicara lo que son.

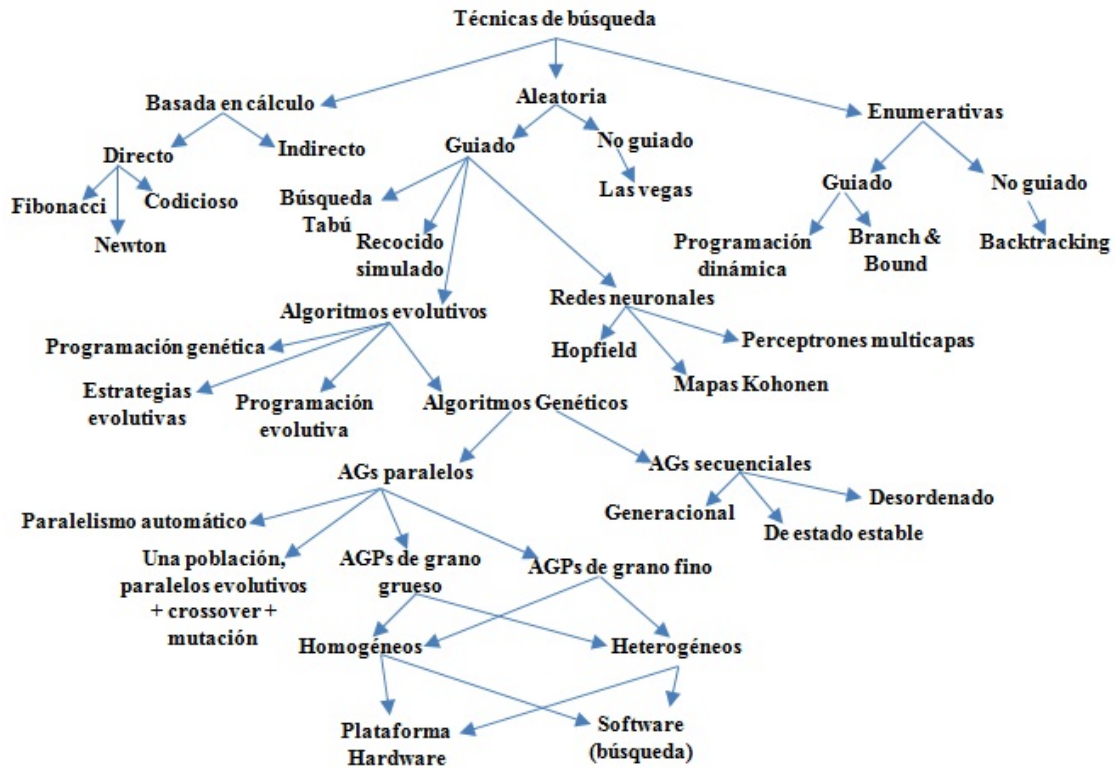


Figura 2.3. Técnicas de búsqueda para resolver problemas de optimización (Sivanandam & Deepa, 2008).

2.6. Heurísticas y metaheurísticas

Una heurística es un método estructurado que “sobre las bases de la experiencia o juicios busca encontrar una buena solución para el problema, pero no garantiza producir una solución óptima” (Wetzel, 1983; Aickelin, 2011). A diferencia de los procedimientos de optimización estadística, la heurística no trata de optimizar,

es decir encontrar la mejor solución, sino que su lugar satisfice, es decir encuentra una solución suficientemente buena (Gigenzer, 2008).

Las heurísticas son populares en áreas donde se busca una solución a un problema, como Investigación Operativa, debido a las siguientes razones (Aickelin, 2011):

1. La complejidad computacional (tratada en el apartado 1.8 de la presente tesis) de algunos problemas implica que las soluciones óptimas son imposibles de encontrarse en un tiempo razonable en instancias grandes.
2. Los problemas pueden ser poco definidos o tener datos imprecisos, por lo que una solución óptima basada en los datos actuales puede no ser óptima. En este caso puede ser mejor obtener una solución sub-óptima que sea robusta para más posibles escenarios.
3. Su uso puede requerir varias soluciones diferentes para hacer la elección final, particularmente en situaciones donde varios criterios son necesarios para ser balanceados usando mayor tasa de juicio humano que de técnicas de medición.

Las heurísticas se caracterizan por los siguientes atributos (Tabassum & Kuruvilla, 2014):

- Guían el proceso de búsqueda por medio de estrategias definidas.
- Su objetivo es buscar de manera eficiente el espacio de estados para encontrar soluciones casi óptimas.
- Son algoritmos aproximados y usualmente no determinísticos.
- No son específicas de un problema.

Una metaheurística es un algoritmo diseñado para resolver aproximadamente un amplio rango de problemas de optimización duros sin tener que adaptarla a fondo para cada problema. El prefijo griego “meta” se utiliza para indicar que estos

algoritmos son heurísticas “de alto nivel”, en contraste con las heurísticas de problemas específicos. Las metaheurísticas se aplican generalmente a problemas para los cuales no hay ningún algoritmo específico satisfactorio para resolverlos. Casi todas las metaheurísticas comparten las siguientes características: son inspiradas en la naturaleza (basadas en algunos principios de la física, la biología y etología), puesto que hacen uso de componentes estocásticos (que involucra variables aleatorias); no utilizan el gradiente o matriz de Hesse de la función objetivo; tienen varios parámetros que deben ser instalados en el problema en cuestión. Algunos ejemplos de metaheurísticas son Recosido Simulado propuesto por Kirkpatrick *et al.* en 1982, Búsqueda Tabú propuesta por Glover en 1986, Sistema Inmunológico Artificial propuesto por Farmer *et al.* en 1986, Programación Genética patentada por Koza en 1988, Algoritmos genéticos cuyo primer libro fue publicado por Goldberg en 1989, Colonia de Hormigas descrita en su tesis doctoral por Dorigo en 1992, Colonia de abejas propuesta por Walker *et al.* en 1993, Enjambre de partículas desarrollado por Kennedy y Eberhart en 1995, CMA-ES propuesto por Hansen y Ostermeier en 1995, el Algoritmo de distribución propuesto por Mühlenbein y Paaß en 1996, Evolución Diferencial propuesto por Storn y Price en 1997, Búsqueda de alimento bacteriana introducida por en 2002, un algoritmo de optimización basada en biogeografía propuesto por Simon en 2008, entre otros (Boussaïd *et al.* 2013).

Las heurísticas se desarrollaron para resolver problemas específicos complejos de optimización combinatoria. Con la aparición de esquemas de solución más generales, denominados metaheurísticas por Glover en 1986, el panorama cambió drásticamente. Ahora, el reto consiste en adaptar una metaheurística a un problema en particular, lo que por lo general requiere mucho menos trabajo que el desarrollo de una heurística que se construya desde cero para resolver un determinado problema. Además, es probable que una metaheurística proporcione soluciones casi óptimas en tiempos de cálculo razonables. Las metaheurísticas se pueden dividir en dos categorías: de solución única, donde una solución única (y la trayectoria de búsqueda) se considera a la vez, y de población, donde una multiplicidad de soluciones

evolucionan simultáneamente. También sería posible distinguir entre metaheurísticas (Figura 2.4) principalmente constructivas (ej. Colonia de hormigas), donde una solución se construye desde cero (a través de la introducción de nuevos elementos en cada iteración) y metaheurísticas de mejora (como Recocido Simulado, Búsqueda Tabú y Algoritmos Evolutivos), las cuales modifican una solución en forma iterativa (Gendreau & Potvin, 2005).

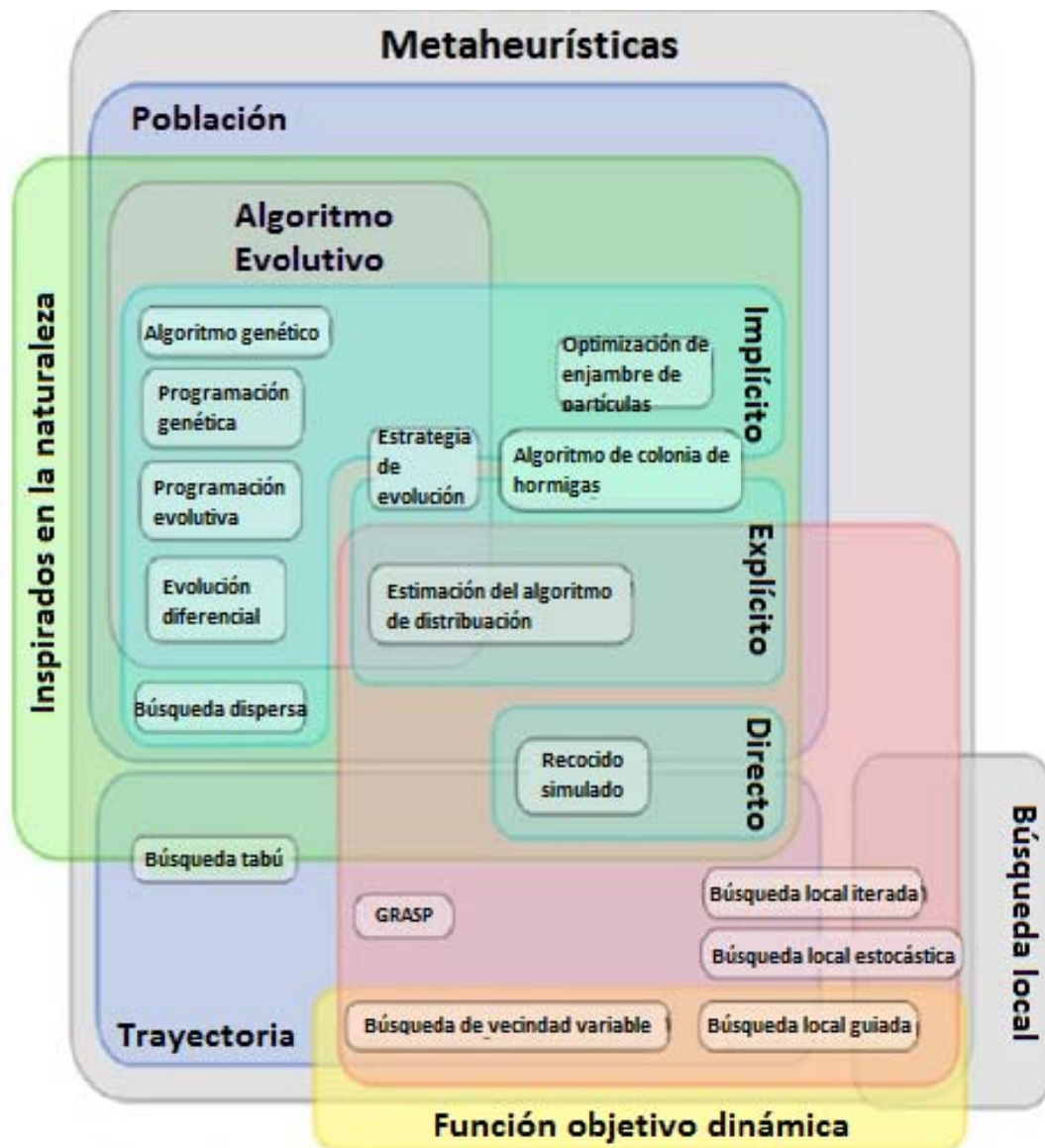


Figura 2.4. Clasificaciones comunes de metaheurísticas.

En la Figura 2.4 se puede ver que diferentes metaheurísticas pueden caer en varias clasificaciones. Por ejemplo las poblacionales están a su vez inspiradas en la naturaleza y algunas de estas pueden ser además de trayectoria o de búsqueda local. A su vez la Búsqueda Local tiene una función de objetivo dinámica. Además de esto los Algoritmos Evolutivos son un subconjunto que por sí solo tiene mucha relevancia y en el cual se encuentran el Algoritmo Genético, la Programación Genética, la Programación Evolutiva y la Evolución diferencial. En particular en la presente tesis se desarrolló un Algoritmo Genético, el cual representa una clase de procedimientos de optimización estocástica basada en sistemas naturales de acuerdo a las observaciones de Darwin y de la moderna teoría sintética de la evolución (Rezende, 2007) y del que hablaremos más a lo largo de la exposición de este proyecto.

2.7. Antecedentes de la investigación

A continuación se expondrán los trabajos existentes sobre el tema de optimización de andamios para el cultivo de células por medio de modelos de optimización y su aplicación por una heurística. Sobre este tópico en particular se encontraron 3 trabajos relacionados, en dos de los cuales se utiliza un Algoritmo Genético y en uno se utiliza un Algoritmo de Enjambre de Partículas.

El primer trabajo es de 2006, en el cual Khalil et al. (Khalil *et al.* 2006) proponen el uso de un método de Elemento Finito combinado con un Algoritmo Genético para la estimación de la elasticidad de tejido vascular blando. El interés de este tema es debido a que entre las propiedades de los materiales utilizados para Ingeniería de Tejidos es importante la de elasticidad, ya que esto es particularmente necesaria en el caso del tejido vascular suave para conocer las concentraciones de esfuerzos intravasculares y poder identificar placas vulnerables, que en caso de rotura puede causar trombosis e infarto de miocardio agudo. La función objetivo (F.O.) utilizada para resolver el problema tratado representa la elasticidad (F) de un material en una región específica (ecuación 1.1).

$$F = \sum_i \alpha_i f_i \quad (1.1)$$

En otro caso se utilizó un Algoritmo Genético con el objetivo de obtener mejores valores de concentración del polímero alginato y de la porosidad adecuada para la fabricación de un andamio que maximice el módulo elástico (Rezende *et al.* 2010). En dicho trabajo se propuso una función objetivo (ecuación 1.2) para maximizar el módulo elástico (E) del andamio, que se presenta como una función de la composición de alginato, la porosidad y el tiempo. Las restricciones del modelo son: composición de alginato entre 1 y 8%, y de porosidad entre 30 y 80%.

$$\underset{[\alpha, \phi_0]}{\text{Maximizar}} \quad E(\phi_0, \alpha, t) \quad (1.2)$$

En un trabajo más reciente (Chantarapanich *et al.* 2013) se utiliza un algoritmo de enjambre de partículas (PS por sus siglas en inglés) para el diseño de parámetros geométricos de los andamios de acuerdo a la rigidez que requieren. La rigidez (E) del andamio se calculó utilizando la ecuación 1.3 que relaciona la fuerza ejercida sobre el plano rígido del andamio (F), el área de delimitación del andamio (A) y la tensión de compresión aplicada (ϵ). Mientras que la función objetivo (ecuación 1.4) que se utiliza está relacionada con el tamaño de poro (x_1), el espesor (x_2) y la rigidez normalizada del andamio (y).

$$E = \frac{F}{A\epsilon} \quad (1.3)$$

$$y = \frac{2.04x10^5 - 4.87x10^2x_1 + 2.72x10^3x_2}{1 + 8.99x10^3x_1 + 6.86x10^2x_2} \quad (1.4)$$

De esta manera, en los trabajos mencionados se utilizan funciones objetivos empíricas a partir basadas en la mejora de las propiedades de elasticidad y rigidez de los andamios. Ninguna de las funciones objetivos es presentada como formalmente se

acostumbra en el área de optimización, ya que son propuestas nuevas para tratar cada problema, además que en dichos trabajos se priorizo el uso de ellas para obtener resultados y no el desarrollo formal de las mismas.

Khalil et al. hace uso de sumatorias en la F.O. propuesta. Mientras que en el trabajo de Rezende et al. hacen uso de la sentencia de Maximizar. Chantrapanic *et al.* relaciona la rigidez del andamio con el tamaño de poro y el espesor del andamio representadas como una función objetivo simple en forma de una función sencilla. Ninguno de los trabajos mencionados satisface la necesidad de métodos de optimización que indiquen las condiciones de procesamiento que se requieren utilizar para generar cada andamio específico y también indicar las condiciones de las propiedades del andamio (tales como el tamaño de poro del andamio) que optimizan el crecimiento de ciertos tipos de células. Es por lo anterior, que en este proyecto de investigación se presenta un modelo de optimización de la configuración de un andamio para maximizar el crecimiento de osteoblastos sobre el mismo y su aplicación por medio de un Algoritmo Genético.

Además, el termino optimización de andamios se ha utilizado por algunos autores para referirse a técnicas de optimización de la topológica, en las que se busca definir las regiones de poro y materiales dentro de un dominio determinado de diseño (Kang *et al.*, 2010; Heesuk *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014). En estos trabajos utilizan métodos numéricos en los cuales se buscan ajustar parámetros, entre los cuales existe particular interés por la permeabilidad de los andamios, la cual está asociada al tamaño de poro, porosidad e interconectividad de los poros.

En particular, en el trabajo de Dias *et al.* 2014 utilizan ecuaciones que buscan optimizar la permeabilidad (Ecuación 1.5) por medio de ecuaciones que consideran el flujo de un fluido a través de un material poroso y las propiedades elásticas del mismo. Sin embargo la optimización tal como es trabajada por los autores mencionados no es considerada en el área de optimización y software como un método eficiente.

$$\int_{\Omega} K_{ij} \frac{\partial P}{\partial x_j} \frac{d\phi}{\partial x_i} d\Omega - \int_{\Omega} \phi f \mu d\Omega - \int_{\Gamma_q} \bar{q} \phi \mu d\Gamma = 0 \quad (1.5)$$

$\forall \phi$ *admissible*

En el presente trabajo se utiliza un enfoque de optimización que consiste en el uso de un Algoritmo Genético, con base de un modelo de optimización que considera como componentes el diámetro de poro, la porosidad, el Módulo de Young (o Módulo de elasticidad) y el ángulo de contacto de andamios.

Capítulo 3. Metodología de Investigación

*["Es verdad que en la ciencia
no hay caminos reales; que
la investigación se abre
camino en la selva de los
hechos, y que los científicos
sobresalientes elaboran su
propio estilo de pesquisas."]*

Mario Bunge]

Capítulo 3. Metodología de Investigación

En este capítulo se presenta la metodología, materiales y métodos empleados en el desarrollo del proyecto, iniciando por el esquema metodológico general.

3.1. Esquema metodológico general

El presente proyecto de tesis doctoral consta de 4 etapas de trabajo. La primera etapa corresponde al diseño del modelo de optimización y del algoritmo para maximizar el crecimiento de osteoblastos sobre andamios de PHB. La segunda etapa es la caracterización del material que utilizaremos para obtener nuestro andamio. La tercera etapa es la adaptación del algoritmo genético para poder realizar la búsqueda de las mejores propiedades de un andamio para cultivo de osteoblastos. La cuarta etapa es la prueba de los resultados del Algoritmo Genético por medio del procesado de los andamios con la técnica de electrohilado y el cultivo de osteoblastos sobre los mismos.

3.1.1. Diseño del Modelo de Optimización y del Algoritmo Genético

La primera etapa del proyecto corresponde al planteamiento de la Función Objetivo (F.O.) y el desarrollo del Algoritmo Genético para maximizar el crecimiento de osteoblastos en un andamio (Figura 3.1). Para esto primero se deben seleccionar los parámetros que se utilizaran para describir nuestro sistema de estudio, el cual en este caso es el andamio que se requiere aplicar para cultivo de osteoblastos. Posteriormente se deben diseñar la F.O. y las restricciones del modelo de optimización. Este proceso se desarrolla en el capítulo 4 de la presente tesis. Por último se requiere diseñar un GA que funcione para este problema, para lo cual debemos construir el individuo que representara una solución del problema a tratar, así como también el algoritmo que genera la población inicial, la estructura que

tendrá el GA y como funcionarán los operadores genéticos que modificarán la población inicial.



Figura 3.1. Etapa de diseño del modelo de optimización y del Algoritmo Genético.

3.1.2. Caracterización y selección del PHB

Como resultados de salida del Algoritmo Genético (GA) que se implementó se deben obtener los parámetros de procesamiento del andamio. Esto es porque dichos parámetros de procesamiento corresponden a cierta configuración (arquitectura y propiedades del andamio) de un andamio. De esta manera es necesario conocer ciertas características del material (en este caso el polímero polihidroxibutirato) que se utilizará para realizar los andamios y considerarlos en el GA. Dichos parámetros se obtuvieron por medio de la caracterización de una serie de PHBs de origen bacteriano, cada uno de los cuales tiene un diferente peso molecular promedio. El proceso de caracterización del andamio que se siguió fue el que se puede ver de manera general en la Figura 3.2 y que se explica en la sección 5.1 de la presente tesis. Se comprobó la composición química, se realizó análisis de las propiedades térmicas y mecánicas, la morfología y de la mojabilidad (por medio del ángulo de contacto) de la serie de

PHBs. Con lo cual se determino cual de los PHBs se utilizaría para la realización de los andamios.



Figura 3.2. Etapa de caracterización y selección del PHB.

3.1.3. Optimización de andamios para crecimiento de osteoblastos

Posteriormente, se realizó la optimización de los andamios para el crecimiento de osteoblastos (Figura 3.3). En el modelo de optimización se utilizaron los rangos de las restricciones que han sido reportados en la literatura como más adecuados para el crecimiento de osteoblastos. Los parámetros de modulo de Young (una de las propiedades mecánicas del andamio) y el ángulo de contacto del material base (PHB seleccionado) se utilizaron como entradas en el Algoritmo Genético. Se procedió a generar de manera aleatoria los individuos (andamios) utilizando rangos de parámetros de electrohilado que han sido reportados como condiciones adecuadas para generar una estructura de andamio. El GA fue programado de manera modular y se realizó el proceso de sintonización del algoritmo, el cual es realizado para que el algoritmo funcione de manera eficiente. Después se obtuvieron los resultados del GA, de donde se tomo la configuración del andamio con la mejor aptitud para el crecimiento de osteoblastos, una configuración con una aptitud intermedia y otra con la peor aptitud. Esta parte de la investigación corresponde a la sección 5.2 de la presente tesis.

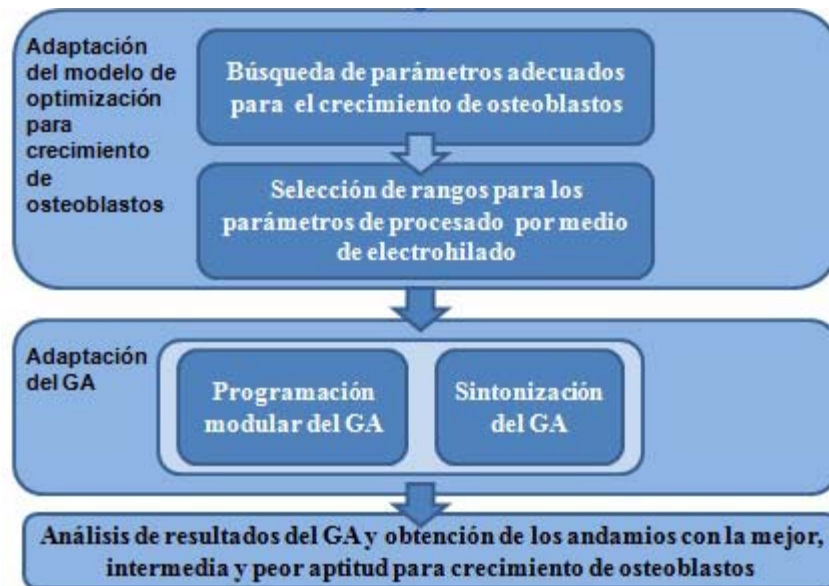


Figura 3.3. Etapa de optimización de andamios por medio del modelo de optimización y el Algoritmo Genético.

3.1.4. Prueba de resultados de los andamios obtenidos por medio del GA

Una vez obtenida el andamio con la mejor, intermedia y peor aptitud se procedió a la etapa de prueba de resultados del GA (Figura 3.4). Los andamios fueron procesados por medio de la técnica de electrohilado y se probaron experimentalmente los resultados del GA por medio de la utilización de Osteoblastos Normales Humanos (NH_{ost}, de Normal Human Osteoblasts). Finalmente, se analizaron los resultados y se comprobó la utilidad del método de optimización de andamios por medio de un GA (sección 5.3). Para lo cual se esterilizaron los andamios por medio de luz UV y se realizó cultivo de las NH_{ost} por 148 horas, el cual fue observado por microscopía óptica (POM), midiendo el conteo celular con azul tripano y al final observándose los andamios extraídos a las 148 por epifluorescencia.

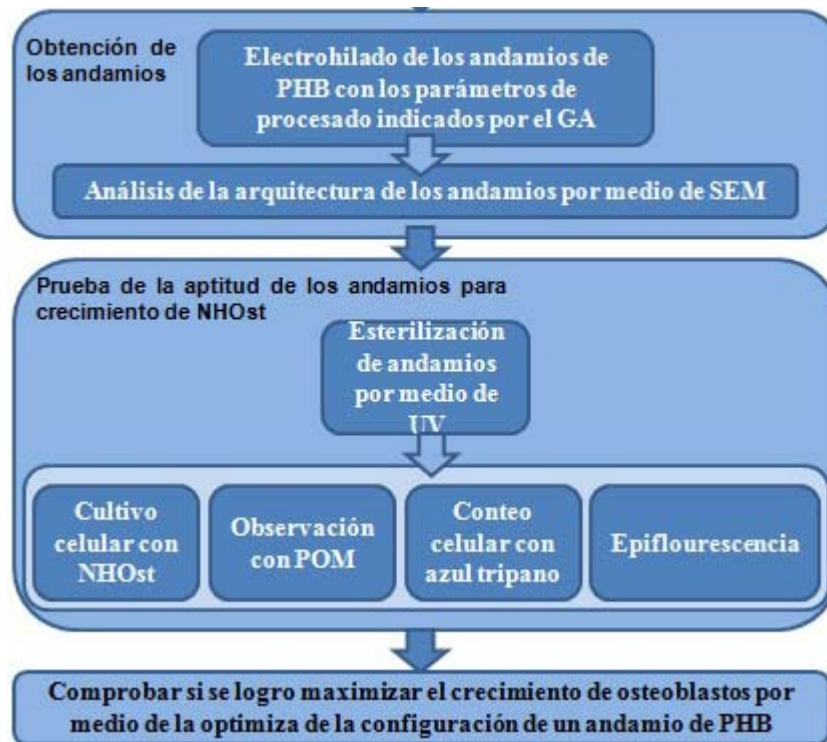


Figura 3.4. Etapa de prueba de los resultados del Algoritmo Genético.

3.2. Materiales para el constructo de Ingeniería de Tejidos

Un requerimiento general para todos los andamios es que reproduzcan el ambiente de una matriz extracelular que soporte el crecimiento de las células fuera del cuerpo, por lo que la composición química del biomaterial que se utilice para hacerlo debe ser biocompatible (Langer & Tirrell, 2004). Por lo anterior, se decidió utilizar al polihidroxibutirato (PHB) como biomaterial base para hacer los andamios. Además se eligió utilizar osteoblastos debido a que al ser células formadoras de hueso son considerados un prototipo de paradigma para enunciar los principios de la Ingeniería de Tejidos (Fisher & Reddi, 2003). Por otra parte, se decidió utilizar la técnica de electrohilado ya que es una técnica que ofrece la ventaja de poder fabricar fibras que forman estructuras porosas con alta área superficial, de manera robusta y simple (Bhardwaj & Kundu, 2010). A continuación se presentara con mayor detalle

una explicación de los materiales y métodos que se usaron en la presente tesis doctoral.

3.2.1. Polihidroxitirato

El Polihidroxitirato (PHB) es un polímero de la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs), que son polioxoesteres lineales sintetizados por muchas bacterias (Figura 3.5) a partir de ésteres 3-hidroxicanoilo solubles en agua de la coenzima A [R-CHOHCH₂CO-S-CoA, donde el grupo R = (CH₂)_nCH₃, con n que puede ser de 0 a 14, en medios ricos en carbono. A medida que aumenta el contenido de PHAs en las bacterias se almacena en el citoplasma en forma de gránulos insolubles y globulares, los cuales, en condiciones de crecimiento optimizados, pueden representar hasta el 85% del peso seco de la bacteria. Diferentes PHAs tienen propiedades que varían de termoplásticos (R = CH₃, CH₂CH₃) similares a los polietilenos y polipropilenos a base de petróleo, a los elastómeros [R = (CH₂)_nCH₃, donde n van de 6 a 14]. En contraste con los polímeros no biodegradables a base de petróleo, los PHAs son "amigables con el medio ambiente", ya que pueden ser hidrolizados por despolimerasas extracelulares. Cuando R = 3 tenemos el poli-3-hidroxitirato (PHB), el cual fue descubierto por primera vez en 1925 por el microbiólogo francés Maurice Lemoigne en el Instituto Pasteur de Paris (Beeby *et al.*, 2012; Lemogni, 1926). El PHB es un polímero interesante, ya que puede ser degradado a dióxido de carbono y agua sobre condiciones aeróbicas, o a metano sobre condiciones anaeróbicas (Abou-Zeid *et al.* 2004). Por lo cual, puede ser sustituto de otros plásticos y evitar la contaminación ambiental. Además de esto el PHB es biocompatible, por lo cual puede ser usado en aplicaciones tales como suturas para cirugía, liberación controlada de fármacos, implantes cardiovasculares y andamios para ingeniería de tejidos (Sudesh *et al.* 2000; Valappil *et al.* 2006). Los PHBs utilizados en la presente tesis fueron sintetizados por los grupos de investigación de los doctores del Instituto de Biotecnología, de la Universidad

Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM, Campus Cuernavaca, Morelos), el Dr. Carlos Peña Malacara y el Dr. Daniel Genaro Segura.

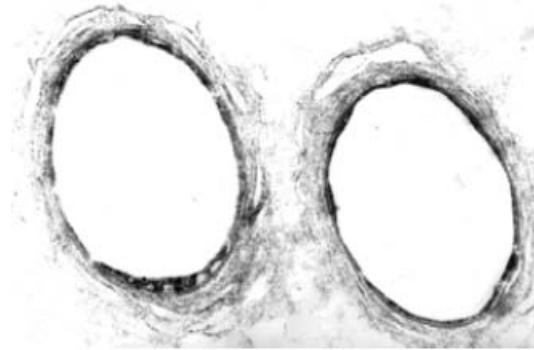


Figura 3.5. Microscopía electrónica de transmisión de inclusiones de polidroxibutirato dentro de bacteria *Azotobacter chroococcum* (Bonartsev *et al.*, 2007).

3.2.2. Osteoblastos Normales Humanos

Los osteoblastos son células fundamentales involucradas en la formación de hueso orgánico, matriz de hueso no mineralizada. Los osteoblastos son parte integral del desarrollo, crecimiento, la función, la reparación y el mantenimiento de los huesos. Esto se logra a través de interacciones complejas con una variedad de factores, mediadores y otros tipos de células incluyendo los osteoclastos (Jayakumar & Silvio, 2010). Cuando se forma hueso, los osteoblastos en la superficie del hueso comienzan a sintetizar y secretar una matriz extracelular orgánica (ECM por sus siglas en inglés), que posteriormente se mineraliza. Los osteoblastos incrustados en la ECM secretan osteocitos, los osteocitos recién formados conservan varias características estructurales de los osteoblastos. A pesar de su aparición como Células "inactivos", existe una creciente evidencia que indica que los osteocitos maduros son células que tienen un papel en la transducción de señales de la carga mecánica, por lo tanto actuando como los mecano-sensores en el hueso (Zhao *et al.* 2000). Previo a la prueba experimental de los resultados del Algoritmo Genético se realizó capacitación

en cultivo de células y se procedió a crecer osteoblastos normales humanos (NHOst) adquiridos a la Lonza®, para ensayar las condiciones experimentales que se necesitan utilizar para el experimento final. Los NHOst (Figura 3.6) crecen con una morfología celular alargada y tardan en llegar a confluencia (en cajas de cultivo de células denominadas T-25 o T-75) aproximadamente 10 días, ya que su crecimiento es lento.

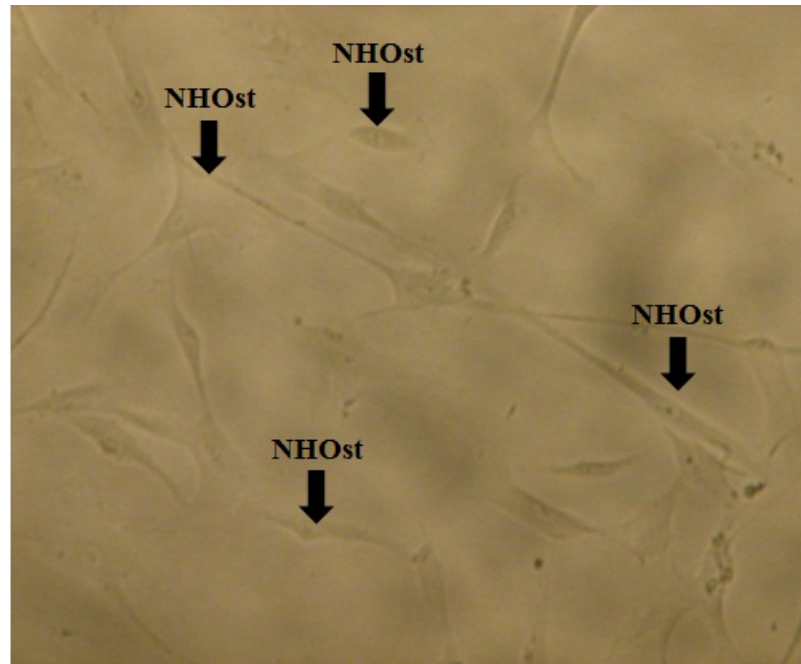


Figura 3.6. Microscopia óptica de osteoblastos normales humanos (NHOst) a 72 horas de crecimiento en caja de cultivo T-25.

3.3. Métodos

Los métodos utilizados en el presente trabajo de investigación son: computacionales, de procesamiento de los andamios, de caracterización de materiales y de cultivo de células. A continuación se exponen dichos métodos de manera más detallada.

3.3.1. Métodos computacionales

Se utilizó la metaheurística denominada Algoritmo Genético, la cual se explica de manera general a continuación. Además, se realizó el análisis de sensibilidad del algoritmo, para obtener un programa de cómputo que sea eficiente.

3.3.1.1. Algoritmo Genético

El Algoritmo Genético (GA, de Genetic Algorithm) se encuentra dentro de las técnicas de la computación evolutiva (EC, de Evolutionary Computation), en las cuales los principios de la evolución son aplicados a algoritmos. El aspecto principal que distingue un algoritmo de búsqueda evolutiva es que está basado en una población, la cual se adapta a través de generaciones sucesivas y realiza una búsqueda dirigida eficiente. Una búsqueda evolutiva es generalmente mejor que la búsqueda al azar y no es susceptible a los comportamientos de bajada en la búsqueda (Araujo & Cervigón, 2009; Sivanandam & Deepa, 2008).

Algunas ventajas de la computación evolutiva son las siguientes (Sivanandam & Deepa, 2008):

- Son conceptualmente simples. El algoritmo consiste en inicialización, variación iterativa y selección de acuerdo a un valor de rendimiento.
- Respuesta robusta a las circunstancias cambiantes. Pueden ser aplicados a cualquier problema que se pueda formular como problemas de optimización de funciones.
- Hibridación con otros métodos. Se pueden combinar con técnicas de optimización más tradicionales.
- Paralelismo. La evolución es un proceso altamente paralelo, por lo cual la evaluación de cada solución puede ser manejado en paralelo y la selección solo requiere una solución en serie.

- Robusto a los cambios dinámicos. La computación evolutiva se puede utilizar para adaptar las soluciones a circunstancias cambiantes, en muchos casos no es necesario reinicializar la población al azar.
- Resuelve problemas que no tienen soluciones. Tienen la capacidad de abordar problemas para los que no hay experiencia humana, a pesar de que es deseable aplicar esta cuando se disponga de ella.

La técnica más popular en computación evolutiva son los Algoritmos Genéticos (Araju & Cervigón, 2009; Sivanandam & Deepa, 2008). Charles Darwin sentó la base de la teoría de la evolución natural en su libro *El origen de las especies*. Durante generaciones los organismos biológicos evolucionan por medio del principio de la selección natural de “la supervivencia del más apto”. En la naturaleza los individuos compiten entre sí por los recursos, así como también para atraer parejas para la reproducción. Por lo anterior los individuos menos adaptados tienen menos posibilidades de sobrevivir y los más adaptados pueden producir mayor descendencia. Así mismo, durante la reproducción una recombinación de las buenas características de los antepasados puede producir un “mejor ajuste” logrando una mayor aptitud en los descendientes que la que tenían los padres (Sivanandam & Deepa, 2008).

En 1975, John Holland desarrolló la idea de la evolución en su libro “*Adaptación en sistemas naturales y artificiales*”, describiendo como aplicar los principios de la evolución natural en la optimización de problemas y construyendo el primer GA. La idea básica es que una población dada contiene una solución potencial a un problema de adaptación, la cual no está activa porque la combinación genética sobre la que se basa está dividida entre varios sujetos y solo la asociación de diferentes genomas puede conducir a la mejor solución (Sivanandam & Deepa, 2008).

Un GA basa sus ideas y representación en la evolución natural. En biología toda la información genética se almacena en un cromosoma, para el GA un cromosoma representa un individuo (una posible solución al problema), el cual contiene las características que lo representan. El proceso básico de funcionamiento

de un GA es realizar una selección de individuos, cruzamiento de un porcentaje de dichos individuos y mutación de un porcentaje de dichos individuos como se puede ver en la Figura 3.7 (Ben Amor, 2008) y del cual se tratara más a fondo en el capítulo 5.

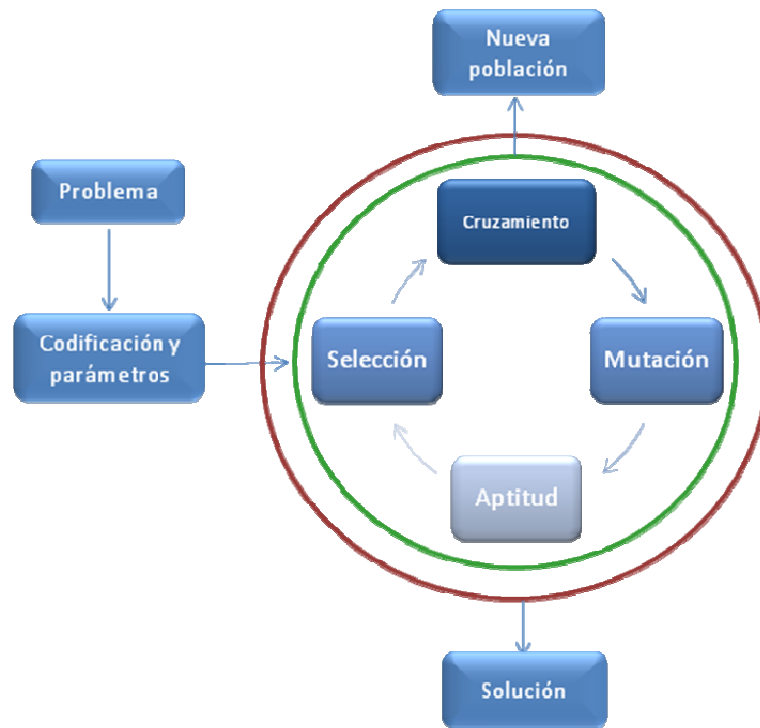


Figura 3.7. Funcionamiento básico de un Algoritmo Genético.

Existen diferentes tipos de selección. Algunos de los más empleados son selección por ruleta y por torneo. En la selección por ruleta a cada individuo se le asigna un segmento de una ruleta y el tamaño de este es proporcional a la aptitud del individuo, de esta manera es más probable que se seleccione un individuo que se encuentre en una sección de ruleta mayor. En la selección por torneo, en la que un número de individuos compiten entre ellos y el que tiene mejor aptitud es elegido.

Posteriormente, en el proceso de recombinación se alteran las características de los individuos por medio de la mezcla de dos genotipos produciendo uno nuevo. Un ejemplo de recombinación es el cruzamiento. Un tipo de cruzamiento es el

multipunto, el cual es el más común. En el cruzamiento de multipunto selecciona de manera aleatoria n puntos de cruce y realiza intercambios de los segmentos del cromosoma que están entre ellos. Otro tipo de cruzamiento es el uniforme, en el cual se seleccionan secciones separadas de alelos entre los padres y estos se intercambian. Por otra parte la mutación simula los cambios aparentemente accidentales en el ADN de un individuo. Esto se realiza realizando pequeñas modificaciones al individuo.

La población con la que inicia el Algoritmo Genético es llamada población inicial. La evolución de la población depende de la calidad relativa de los individuos que compiten por aumentar su presencia en la población y participar en las operaciones de reproducción. De esta manera, el grado de adaptación de los individuos se mide por la función de aptitud. Otra cuestión que hay que considerar es la condición de terminación, la cual es la que determina la condición en la que el algoritmo deja de funcionar. Una condición de terminación sencilla es que el algoritmo llegue a determinado número de generaciones (Araujo & Cervigón, 2009).

Los GA son especialmente eficaces porque no sólo consideran la mutación (la cual raramente mejora los algoritmos) sino que también la recombinación genética (el cruce), la cual mejora en gran medida la capacidad de enfoque del algoritmo y eventualmente encuentra el óptimo.

También se deben mencionar los inconvenientes que puede presentar un GA, para poder considerarlos a la hora de utilizar dichos algoritmos. Algunos inconvenientes que hay que tomar en cuenta como son el problema de la identificación de la Función Objetivo, la necesidad de representar el problema de manera adecuada y la convergencia prematura, entre otras. En la Tabla 3.1 se presentan algunas ventajas y desventajas de los algoritmos genéticos (Sivanandam & Deepa, 2008).

Tabla 3.1. Ventajas y desventajas de un GA.

Ventajas	Desventajas
Paralelismo	Problema de identificar la función objetivo.
Espacio de soluciones amplio	Se debe hacer una adecuada definición para la representación del problema.
Facilidad de descubrir un óptimo global	Puede ocurrir convergencia prematura.
El problema puede tener función multiobjetivo.	El problema de la elección de los diferentes parámetros como el tamaño de la población, tasa de mutación, tasa de cruzamiento, el método de selección y la fuerza de la selección.
Solo utiliza evaluaciones de la función.	No es bueno en identificar óptimos locales.
Se puede modificar fácilmente para diversos problemas.	Necesita acoplarse a una técnica de búsqueda local.
Maneja grandes espacios de búsqueda que se pueden malinterpretar fácilmente.	Tiene problemas para encontrar el óptimo global exacto.
Son resistentes a quedar atrapados en óptimos locales.	Requiere un gran número de evaluaciones de la función de aptitud.

Algunas aplicaciones de los GA son sistemas de dinámica no lineal, planeación de trayectoria de robots, encontrar la forma de moléculas de proteínas, problema del agente viajero, funciones para crear imágenes y procesamiento de señales, entre otras (Sivanandam & Deepa, 2008).

3.3.1.2. Análisis de sensibilidad del algoritmo

Posteriormente a que se realiza la programación de un algoritmo es necesario realizar una serie de pruebas, denominadas “pruebas experimentales”, pero que no son pruebas en las que se realicen experimentos aplicados en la realidad sino en el ámbito computacional.

Para realizar las pruebas experimentales del algoritmo se lleva a cabo un análisis de sensibilidad de los parámetros de control del algoritmo, utilizando una metodología de sintonización (Martínez-Oropeza *et al.* 2010). Dicha metodología de sintonización dependerá de cada problema a tratar, ya que se debe analizar que parámetros del problema se pueden sintonizar. Por ejemplo, en el caso de un GA (del cual se describió su funcionamiento anteriormente) los operadores genéticos de cruzamiento y mutación se realizan con un porcentaje dado. Sin embargo, en principio no sabemos cuál debe ser dicho porcentaje, por lo cual posteriormente a la programación del algoritmo, se deben realizar pruebas en las cuales se vaya variando uno de los parámetros (por ejemplo cruzamiento) y dejando fijo el otro, y luego variar el parámetro faltante, para así determinar cuáles son los porcentajes de cada uno de ellos que dan un mejor desempeño en nuestro algoritmo. Es de conocimiento general en el área de optimización que al ajuste de las variables se le denomina sintonización.

Con respecto al análisis de sensibilidad sus bases se encuentran en conceptos de la programación lineal (PL). Los parámetros (datos de entrada) de un modelo pueden cambiar dentro de límites sin que cambie la solución óptima, de esta manera el análisis de sensibilidad determina las condiciones que mantendrán la solución actual sin cambios. El efecto de un pequeño cambio en el valor óptimo de una función se puede estudiar evaluando la razón de cambio de la función con respecto al parámetro dado. Dichas razones se conocen como coeficientes de sensibilidad (Taha, 2012). Estos conceptos aplicados en el área de las heurísticas y metaheurísticas nos conducen a que el efecto del cambio de los coeficientes de sensibilidad pueden dar los siguientes efectos sobre el algoritmo:

- a) Que al ir variando los coeficientes encontremos que el cambio sea insignificante hasta determinado punto, en que el efecto del cambio sea realmente notorio.

- b) Que evitemos realizar cambios innecesarios (los cuales además pueden hacer que el algoritmo tarde demasiado tiempo en ejecutarse) en los coeficientes.
- c) Obtener un mejor control de las condiciones en las que se ejecuta el algoritmo para poder realizar pruebas reproducibles y estadísticamente confiables.

Una metodología para la sintonización del algoritmo, en la cual se obtienen los valores de los parámetros de control (considerados como los valores de sintonización) puede constar de las siguientes partes (Martínez-Oropeza *et al.* 2010):

1. Selección de los parámetros de control: ya sea haciendo una revisión de la literatura o identificándolos por medio del análisis del problema.
2. Establecer los rangos de evaluación: viendo en la literatura los rangos que se han encontrado son adecuados para que el algoritmo obtenga buenas soluciones.
3. Pruebas a rangos de evaluación: se calculan series de muestras, cuya cantidad depende del tamaño del rango establecido en la literatura, y se procede a realizar 30 pruebas experimentales (como mínimo) a cada muestra calculada. Se debe proceder dejando fijo un valor de un determinado parámetro y moviendo los demás en los rangos establecidos, hasta identificar el valor que mejore la calidad de las soluciones. Después se fija el valor del primer parámetro sintonizado y se varía el de otro parámetro, hasta que se realiza el mismo procedimiento con todos los parámetros a sintonizar, todo esto buscando la mejora de la eficiencia y eficacia del algoritmo. Finalmente, se realiza el mismo proceso para cierta cantidad de muestras en un rango más pequeño, en las cuales se toma como punto medio el valor fijado, hasta fijar nuevamente los valores.

De esta manera, una vez realizada la sintonización, el algoritmo se ejecutara con los valores fijos que dan el mejor comportamiento para el mismo.

3.3.2. Método de procesamiento del andamio (electrohilado)

El procesamiento de polímeros por electrohilado (Figura 3.8) es una técnica que produce fibras de una solución polimérica. La elección adecuada de los parámetros de procesamiento permite la producción de una malla constituida por fibras continuas lisas de diámetro homogéneo al ser depositado sobre un sustrato. Los diámetros de las fibras pueden ir desde nanómetros a micrómetros. El electrohilado se produce cuando las fuerzas eléctricas en la superficie de una solución de polímero superan la tensión superficial y causan un chorro eléctricamente cargado que es expulsado. Cuando el chorro se seca o se solidifica, una fibra se genera en una pantalla colectora. Los factores de procesamiento más importantes en el electrohilado son la tensión aplicada (V), el caudal o tasa de flujo de la solución (Q), la concentración de polímero (C), el peso molecular promedio del polímero (M_w), y la distancia de la punta de la aguja a la pantalla colectora (Z) (Theron *et al.* 2004; Cramariuc *et al.* 2013). Los tipos de pantallas colectoras pueden variar, pero una de las más comúnmente utilizadas es la de pantalla plana, para la cual muchas veces es utilizada una placa cubierta con papel aluminio (Figura 3.8). En el caso de la presente tesis se utilizó como pantalla colectora una oblea de silicio

Se puede decir que el electrohilado tiene sus bases en el inicio de la investigación del efecto de un objeto con carga electrostática en estrecha proximidad a un líquido (Rayleigh *et al.* 1882). Posteriormente se descubrió el punto de inestabilidad de un líquido (Zeleny, 1914) y fue patentada una forma de proceso de electrohilado por Formhals en 1934 (Formhals *et al.* 1934). Taylor (1964, 1969) intentó derivar en un sentido matemático la física del proceso de electrohilado (Taylor *et al.* 1964; Taylor *et al.* 1969). Desde entonces se han producido bastantes trabajos sobre electrohilado de polímeros en estado fundido y en solución buscando

predecir el diámetro de hilo obtenido a través de la variación de las condiciones de procesado (Larrondo *et al.* 1981a-c; Doshi & Reneker, 1995; Cramariuc *et al.* 2013). Para nuestro caso particular, calculamos el diámetro de hilo a partir de las ecuaciones presentadas por Cramariuc *et al.* (Cramariuc *et al.* 2013) que relaciona el diámetro de hilo (h) con las condiciones de procesado (V , Q , C , y Z).

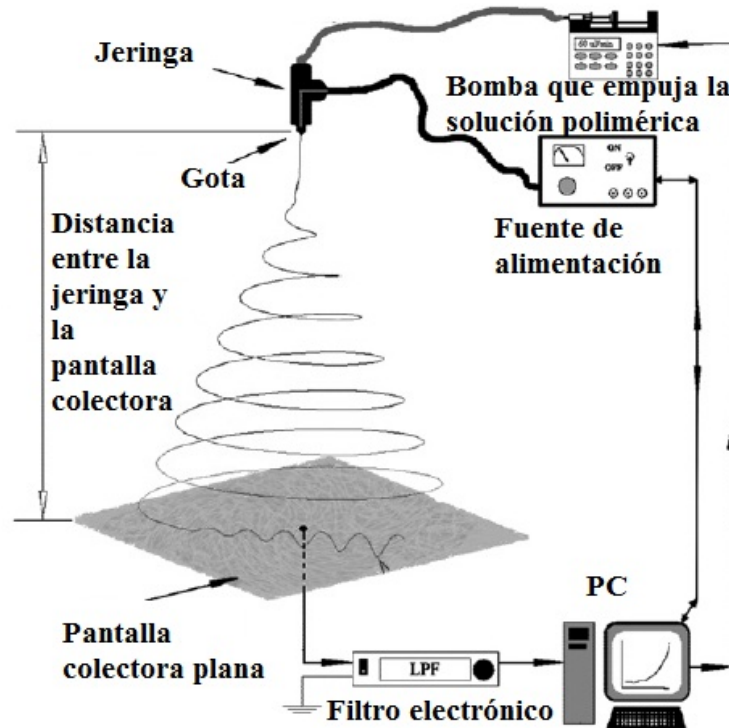


Figura 3.8. Partes principales de un sistema de electrohilado (Modificado de Theron *et al.*, 2004).

El electrohilado tiene un crecimiento continuo de interés. Esto es debido a sus posibles aplicaciones, como pueden ser filtración de agua, liberación controlada de fármacos, Ingeniería de Tejidos y medicina regenerativa. Posee peculiares características como ser en principio extremadamente largo (sobre km), poseer alta superficie-área, porosidad sintonizable, topografía tridimensional intrínseca y propiedades funcionales (Persano *et al.* 2013).

3.3.3. Métodos de caracterización de materiales

A continuación se presentan los diferentes métodos utilizados para caracterizar las propiedades de una serie de PHBs. Como se menciono anteriormente, esto realizó para decidir el PHB que se utilizaría en la fabricación de los andamios, así como también para conocer algunos parámetros de entrada que se deben utilizar en el programa que se realizó en la presente tesis.

3.3.3.1. Determinación de peso molecular

El peso molecular promedio de un polímero se puede calcular a través de la viscosidad de soluciones poliméricas (Staudinger & Hever, 1930). Utilizando un viscosímetro capilar (Figura 3.9 (a)) se mide el tiempo en que tardan en desplazarse diluciones del polímero (a concentraciones que tienden a cero) de una marca inicial (M_1) a una final (M_2). Posteriormente se calcula la viscosidad intrínseca de la solución a través de la función que define las rectas de las viscosidades reducida o de la inherente (Figura 3.9 (b)) y se obtiene por medio de la ecuación de Mark-Houkink (ecuación 3.1), la cual relaciona la viscosidad cinemática $[\eta]$ con los coeficientes k y α específicos de cada polímero (Marchessault *et al.* 1970), el peso molecular promedio M_w del polímero (Domínguez-Díaz *et al.* 2011).

$$[\eta] = k \cdot \overline{M_w^\alpha} \quad (3.1)$$

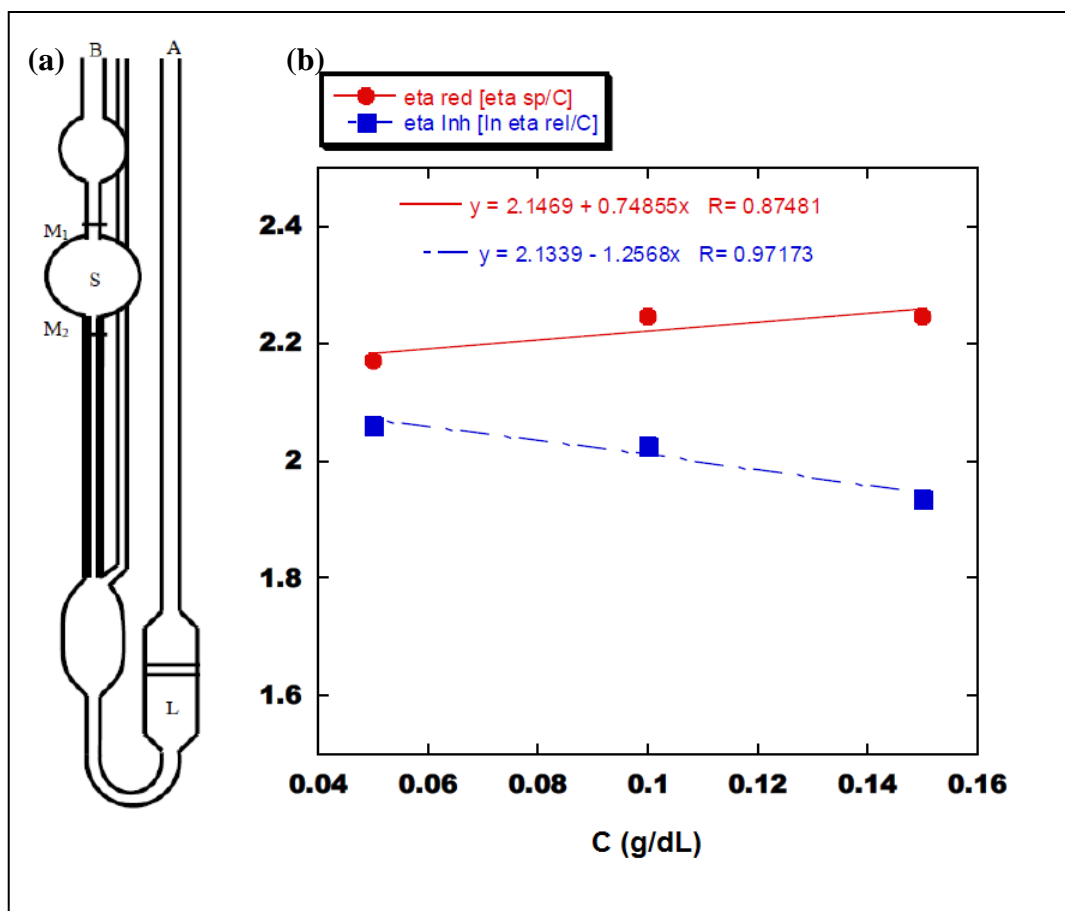


Figura 3.9. (a) Viscosímetro capilar Ubbelohde utilizado para determinar el peso molecular, (b) rectas de las viscosidades reducida o de la inherente.

3.3.3.2. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier

La Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica usada para determinar cualitativamente y cuantitativamente las características de moléculas de muestras orgánicas, inorgánicas, ya sean sólidas, líquidas o gases. Esta técnica se basa en la excitación vibratoria de enlaces moleculares por la absorción de energía de luz infrarroja (sección media de infrarrojo). El espectro infrarrojo es el espectro de vibración molecular. Cuando se expone una muestra a la radiación infrarroja, las moléculas de la muestra absorben selectivamente la radiación

de longitudes de onda específicas que causa el cambio del momento dipolar de las moléculas de la muestra. Los picos de absorción que se obtienen están determinados por la brecha de energía de vibración. El número de picos de absorción está relacionado con la libertad de vibración de la molécula. La intensidad de los picos de absorción está relacionada con el cambio de momento dipolar y la posibilidad de la transición de los niveles de energía. Mediante el análisis del espectro de infrarrojos, se puede obtener información de la estructura de una molécula (Taha *et al.* 2013). Por ejemplo, podemos ver el espectro de FTIR del polímero Nylon 6,6 y sus componentes en la Figura 3.10.

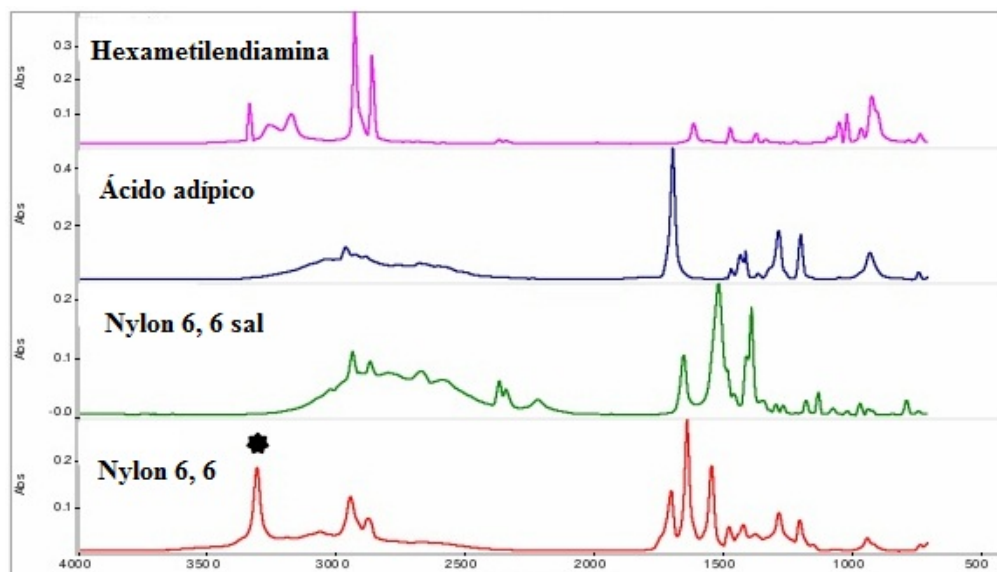


Figura 3.10. FTIR del Nylon 6,6 y sus componentes (Ndukwe, 2016).

3.3.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una herramienta analítica efectiva para caracterizar las propiedades físicas de un polímero. El esquema del equipo se puede observar en la Figura 3.11 (a). El DSC permite la determinación del punto de fusión (T_m), de cristalización (T_c), y temperaturas de transición vítrea (T_g), y los correspondientes cambios de entalpía y entropía, y otros efectos como la capacidad de calor o calor latente, los cuales se pueden observar en la Figura 3.11 (b).

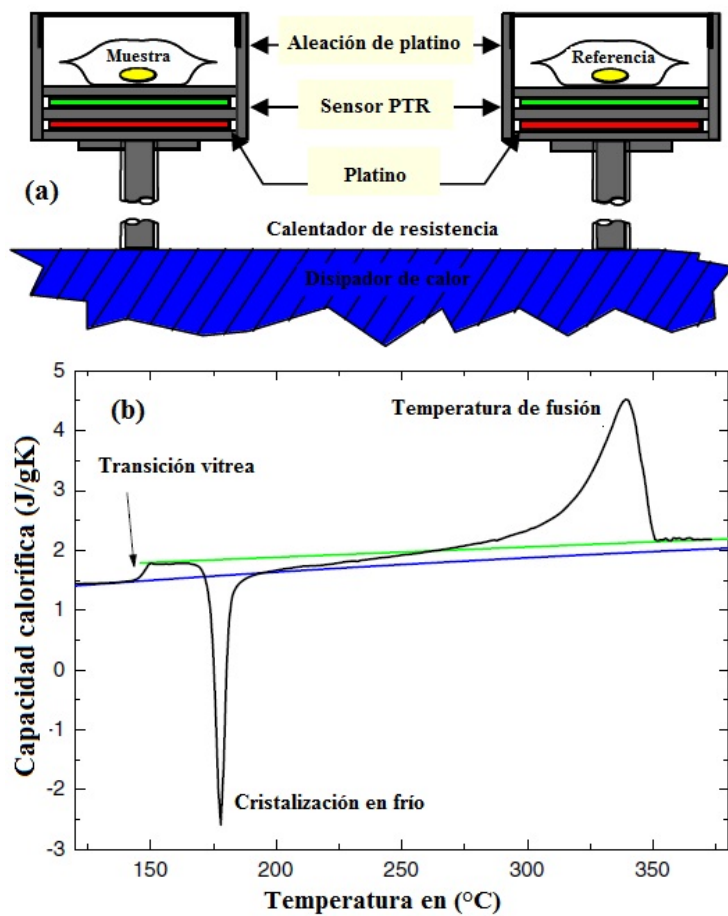


Figura 3.11. (a) Esquema del equipo de DSC, (b) ejemplo de temperaturas de transición obtenidas por DSC (Schick, 2009).

La calorimetría ocupa un lugar especial entre otros métodos, debido a su simplicidad y universalidad, la energía característica (capacidad calorífica C_p y la integral sobre la temperatura T-entalpía H), medido mediante calorimetría, tiene un significado físico claro aunque a veces puede de ser difícil de interpretar. Con la introducción de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) a principios de la década de 1960 se convirtió en una herramienta estándar la ciencia de los polímeros. La ventaja del DSC en comparación con otras técnicas calorimétricas se encuentra en el rango de dinámico amplio de calentamiento y refrigeración con respecto a las tasas, incluyendo temperatura isotérmica y temperatura modulada de operación. El amplio rango dinámico es de especial interés para los polímeros semicristalinos porque que se encuentran comúnmente lejos del equilibrio y las fases de transiciones son fuertemente dependientes al tiempo (velocidad). Sin embargo, todavía hay varios problemas sin resolver en relación con la calorimetría.

3.3.3.4. Microscopía óptica con polarizadores cruzados

Un microscopio de polarización (Figura 3.12) es un microscopio de luz transmitida que tiene un polarizador en el sistema de iluminación, y un analizador entre el objetivo y el ocular. El polarizador y analizador son polares, es decir, dispositivos que transmiten selectivamente la luz polarizada en un plano concreto, lo cual se puede controlar al girarlos. Los polarizadores son hechos de una película de polímero orientada que es dicróico, y este absorbe selectivamente la luz de un estado de polarización. Con los polarizadores cruzados puede ocurrir que el campo sea oscuro, cuando no hay espécimen o el espécimen es isotrópico, o que el material sea anisotrópico birrefringentes y se distinga una estructura (Sawyer *et al.* 2008).

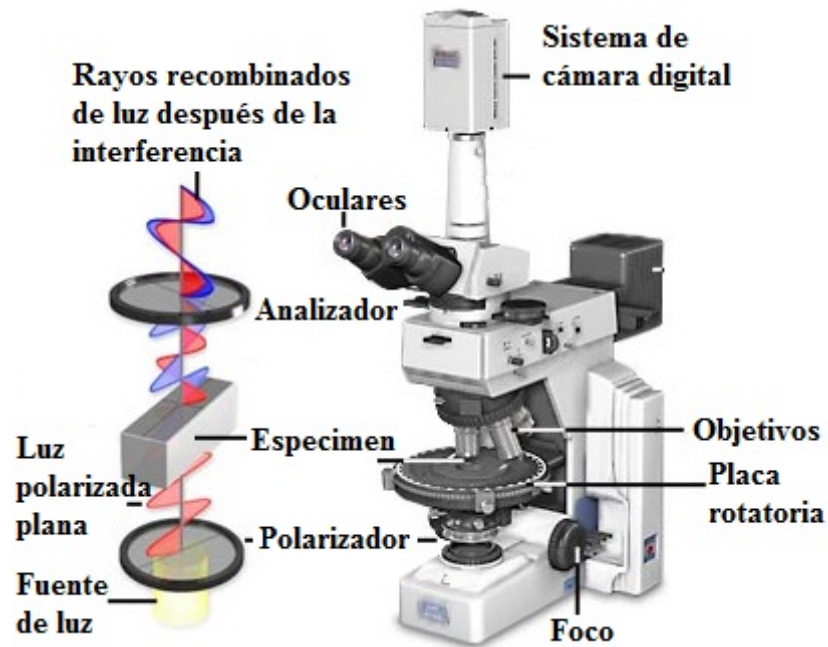


Figura 3.12. Equipo de microscopia óptica con polarizadores (modificado de Robinson & Davidson, 2015).

3.3.3.5. Dispersión de luz a ángulo pequeño (SALS)

La técnica de de dispersión de luz a ángulo pequeño (SALS, de Small Angle Ligh Scattering) es un método de dispersión de la luz, en la cual un haz de luz láser (Helio-Neón) pasa a través de una serie de dispositivos ópticos e incide en la muestra, lo cual genera un patrón de dispersión de luz por medio del cual se puede analizar si la muestra presenta *isotropía* o *anisotropía*. Permite la determinación de tamaño y la anisotropía en películas delgadas de polímeros, así como el análisis de la estructura interna de esferulitas de polímeros (Romo-Uribe *et al.* 2010). Los componentes básicos del SALS se pueden ver en la Figura 3.13.

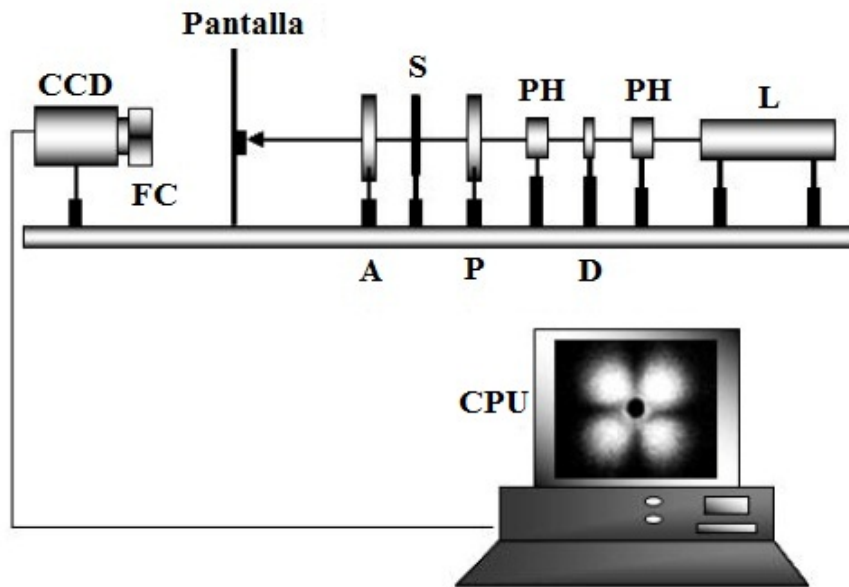


Figura 3.13. Componentes del equipo de SALS: láser (L), colimador (PH), filtro de densidad neutra (D), polarizador (P), Analizador (A), muestra (S), cámara (CCD), lente de enfoque (FC), computadora (CPU) con la imagen de una esferulita en la pantalla (modificado de Romo-Uribe *et al.* 2010).

3.3.3.6. Tensiómetro digital

El tensiómetro digital (Figura 3.14) es un instrumento con el cual se pueden realizar pruebas de tracción a una muestra, las cuales pueden implementarse a temperatura ambiente o a temperaturas controladas (con un rango de -196 a 350 ° C con 0.1 ° C de precisión y tasas de hasta 60 ° C / min). La muestra se coloca entre dos mordazas alineadas de manera vertical y una fuerza, en dirección opuesta al centro de la muestra, es aplicada hasta que la muestra se rompe. Con este equipo puede obtenerse el Módulo de Young y el porcentaje de deformación de una muestra (Linkam Scientific Instruments Ltd., 2010).



Figura 3.14. Tensiómetro digital.

3.3.3.7. Técnica de la gota sésil

La técnica de la gota sésil (Figura 3.15) es un método de medición del ángulo de contacto de una gota de un líquido sobre una superficie, en la cual dicha gota se deja caer sobre la superficie particular y se mide el ángulo que queda entre la recta tangente a la gota y la superficie del material. Si el ángulo de contacto es mayor de 90° la superficie es hidrofóbica, si el ángulo es inferior a 90° la superficie es hidrófila, mientras que una superficie con ángulo de contacto menos a 10° es superhidrofílica (Arkles, 2006). Se puede encontrar una relación entre la estructura de la superficie en que se deposita la muestra y el ángulo de contacto que tendrá como se puede apreciar en la figura 3.15 (Domínguez-Díaz *et al.* 2015), en donde una película del polímero PHB tiene un ángulo de contacto menor a 90° (material hidrofílico) mientras que un andamio del mismo material presenta un ángulo mayor a 90° (material hidrofóbico). En el siguiente capítulo de la presente tesis (capítulo 3) se analiza más a fondo el tema del ángulo de contacto y se presentan las ecuaciones que se utilizarán para calcularlo.

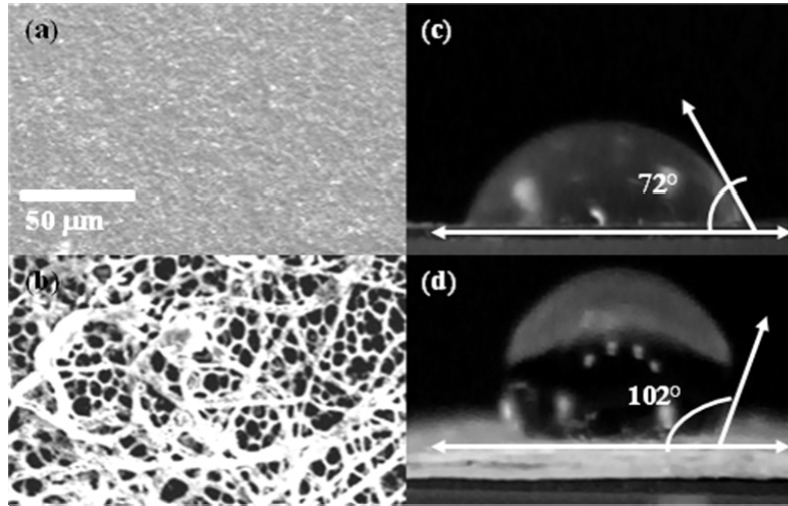


Figura 3.15. Ángulo de contacto del polímero PHB en forma de (a) película que presenta comportamiento hidrofílico ($<90^\circ$, (c)), y (b) andamio con comportamiento hidrofóbico ($>90^\circ$, (d)).

El ángulo de contacto entre una gota de agua colocada sobre una superficie es relacionado a la propiedad de adherencia de un material. Esta propiedad es de gran importancia para generar superficies sobre las que las células sean capaces de adherirse, debido a que la adhesión de las células es crucial para el ensamblaje de células individuales en tejidos tridimensionales de animales (Gumbiner, 1996). Si el ángulo es menor de 90° se dice que la superficie es hidrofílica, mientras que si es mayor de 90° se dice que hidrofóbica y si es de 180° es superhidrófoba (Figura 3.16).

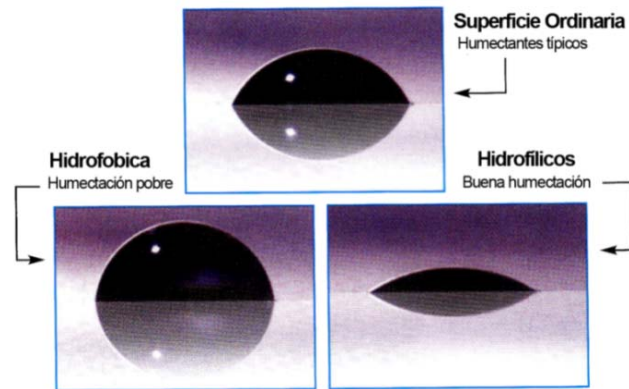


Figura 3.16. Modelos de ángulos de contacto sobre superficies: (a) hidrofílica, (b) hidrofóbica, y (c) superhidrofóbica (modificada de Arkles, 2006).

El ángulo de contacto de una superficie es influenciada por el material del que está hecha y por su textura (Choi *et al.* 2009). En la figura 3.17 (a) se puede ver una hoja de loto, la cual es superhidrofóbica, sobre la cual hay una gota de agua (en verde) y en un aumento (recuadro superior en la misma imagen) se puede ver como la superficie de la hoja es altamente rugosa. Mientras tanto, en la figura 3.17 (b) se puede ver la superficie de las alas de una mariposa sobre la cual también podemos observar una gota de agua (en verde), así como imagen aumentada de la misma.

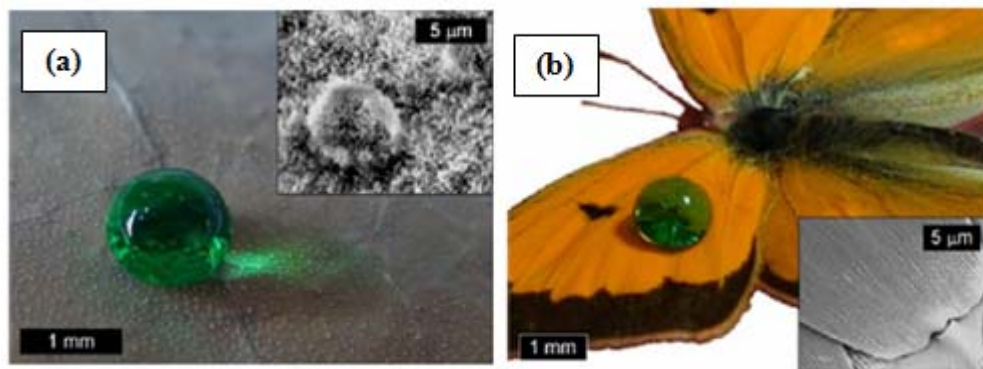


Figura 3.17. Una gota de agua sobre (a) la superficie de una hoja de loto, (b) la superficie de las alas de una mariposa (modificada de Choi *et al.* 2009).

3.3.3.8. Microscopía Electrónica de Barrido

El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, de Scanning Electron Microscopy) es un aparato (Figura 3.18) que produce una imagen a partir de electrones en lugar de luz. Un haz de electrones llega a la muestra (pasando a través de campos electromagnéticos y lentes), entonces electrones y rayos X son expulsados convirtiéndose en una señal que produce una imagen de la muestra. Previo a su análisis, las muestras suelen ser recubiertas con una capa de carbono o de un metal para conferirles carácter conductor. La resolución de la técnica se encuentra entre 4 y 20 nm dependiendo del equipo con el que se cuente (Nessler, 2016).

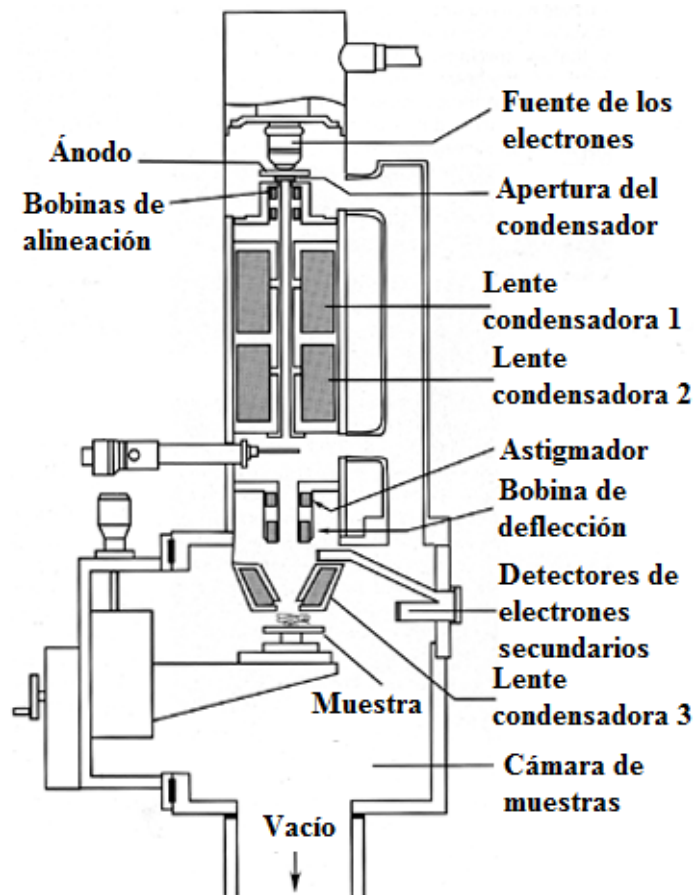


Figura 3.18. Componentes básicos del dispositivo de Microscopía Electrónica de Barrido (Imagen modificada de Nessler, 2016).

3.3.4. Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos fueron hechos para determinar el efecto de los diferentes andamios sobre el crecimiento de los Osteoblastos Normales Humanos (NHOS_t). Se realizó conteo celular por azul tripano para determinar el crecimiento y viabilidad de los NHOS_t. De esta manera analizó si el andamio con mejor aptitud presenta mayor crecimiento de los NHOS_t que los otros andamios, es decir los de aptitudes intermedia y peor.

3.3.4.1. Cultivo celular

El cultivo celular es el proceso por el cual las células crecen sobre condiciones controladas. El cultivo celular es una herramienta muy valiosa para los investigadores en numerosos campos, ya que facilita el análisis de las propiedades biológicas y procesos que no son fácilmente accesibles a nivel del organismo intacto. Se pueden utilizar células humanas, vegetales, animales o líneas de insecto. Las células son removidas de un animal o una planta y subsecuentemente se colocan en un ambiente artificial propicio para su crecimiento. Dicho ambiente artificial puede consistir de un recipiente de cultivo (el cual puede ser de plástico o de vidrio), que contiene un medio que sustituya los nutrientes esenciales necesarios para las células. Se utiliza el medio de cultivo para proveer los requerimientos necesarios para el crecimiento y condiciones óptimas de las células. Los medio de cultivos típicamente contienen carbono, nitrógeno y fuentes de fósforo, junto con sales minerales y componentes tampón. Las células removidas de tejidos son desagregadas por medios enzimáticos o mecánicos antes de su cultivo, o pueden ser derivadas de una línea celular que haya sido establecida previamente. Un cultivo primario es aquel que se obtiene de tejidos y se prolifera sobre condiciones adecuadas en un sustrato. Las células pueden crecer colocarse dispersas en un medio (células en suspensión) o pueden crecer adheridas a una caja de cultivo (células adherentes). Cuando las células llegan a la confluencia, es decir que llenan la superficie del sustrato en el que crecen, son subcultivadas (se

realiza un pase) para transferirlas a un nuevo recipiente con medio de cultivo fresco para que continúen su crecimiento (Houp, 2008; Helgason, 2012). Para el cultivo celular se pueden utilizar diferentes tipos de cajas de cultivo, como pueden ser las de T-25, T-75 y cajas de 24 pozos (Figura 3.19). Durante el tiempo de cultivo celular se puede ir contando el número de células a diferentes tiempos para ver la tasa de crecimiento celular, el número de células vivas por mililitro, así como la viabilidad celular, es decir el número de células vivas por mililitro. Para el contero celular se pueden utilizar diversas técnicas, como pueden ser el conteo por medio de azul tripano, que se explicara a continuación.

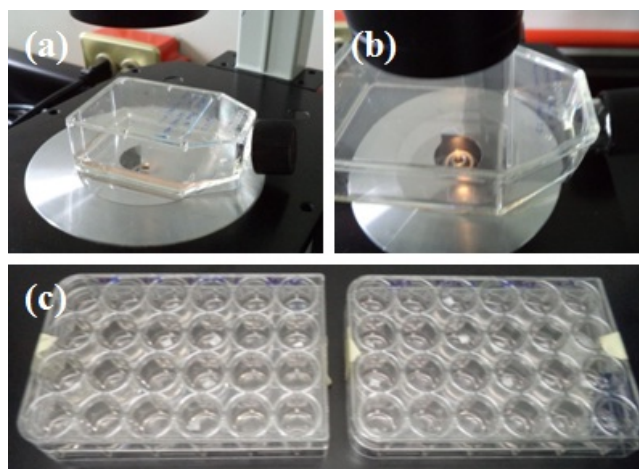


Figura 3.19. Cajas para cultivo celular (a) T-25 con 25 cm² de área, (b) T-75 con 75 cm² de área, (c) cajas de 24 pozos.

3.3.4.2. Conteo celular por azul tripano

El conteo celular es esencial para cuantificar la cinética de crecimiento de las células. Una de las técnicas más empleadas para determinar la viabilidad celular es la técnica de exclusión por azul tripano, en la cual se utiliza un aparato llamado hemacitómetro para contar manualmente las células dentro de 4 regiones cuadrículadas (denotadas como A, B, C, D en la Figura 3.20). Las células viables tienen una membrana celular intacta, mientras que las no viables se tiñen de azul al

permitir la membrana celular el paso del colorante azul. De esta manera se contabiliza el número de células vivas y muertas colocando el hemacitómetro debajo de un microscopio óptico (Louis & Siegel, 2011).

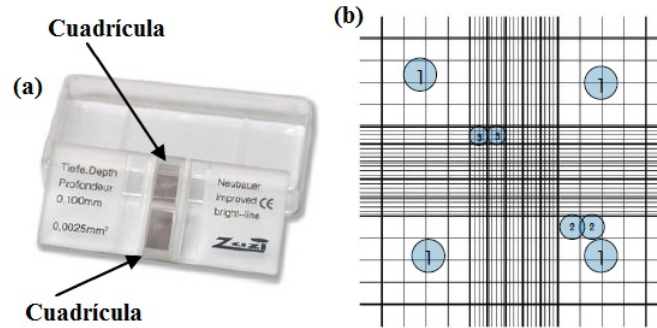


Figura 3.20 (a) Diseño de la cámara Neubauer, (b) región cuadrículada del hemocitómetro donde en las áreas con (1) se cuentan las células, además también se puede utilizar el área del centro de la cuadrícula, pero se considera que contar 4 cuadrantes da una buena medida del número de células (modificada de Bastidas, 2016).

3.3.4.3. Microscopía de epifluorescencia

El conteo celular es esencial para cuantificar la cinética de crecimiento de las células, pero además de este método existen otros que sirven para observar las células como pueden ser métodos en los cuales se utiliza microscopía óptica, como por ejemplo microscopía de epifluorescencia. En la figura 3.21 se muestran los componentes del microscopio de epifluorescencia. La luz incidente procedente de una lámpara se enfoca a través de un sistema de lentes colectores, que puede incluir filtros de calor y de densidad neutra (ND). Las longitudes de onda infrarroja de la fuente de luz pueden generar una gran cantidad de calor cuando se centran por la lente objetivo sobre la muestra. Los filtros ND, que atenúan uniformemente las longitudes de onda más visibles de la luz, reducen la potencia de la lámpara incidente y cualquier

potencial foto-blanqueo. Si es necesario se alinea la fuente de luz y la luz pasa a través de un difusor para proporcionar una iluminación uniforme a través del campo de visión del microscopio. Los diafragmas de campo y la abertura se alinean y se abre de manera que no sean más grandes que el campo de visión. Esto reduce la luz incidente en el sistema, ya que de no hacerlo se puede conducir a la degradación de la muestra. Un obturador manual o automática debe estar presente para bloquear la luz incidente en el que la muestra no se está viendo. Esto reducirá el foto-blanqueo y es esencial para reducir la fototoxicidad y poder observar las imágenes de células por mayor lapso de tiempo.

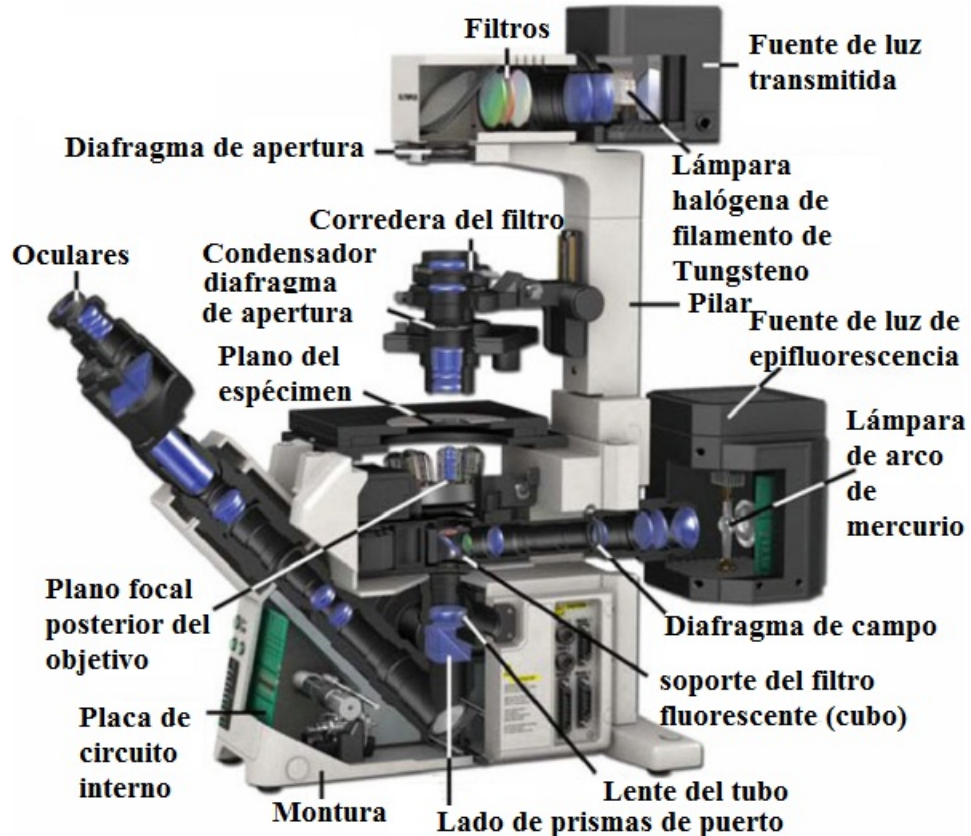


Figura 3.21. Componentes del microscopio de epifluorescencia.

Capítulo 4. Diseño del modelo de optimización y del Algoritmo Genético

*["La ignorancia afirma o
niega rotundamente; la
ciencia duda" Voltaire.]*

Capítulo 4.1. Diseño del modelo de optimización

Para implementar el algoritmo para maximizar el crecimiento de osteoblastos se necesita un modelo de optimización, el cual se propuso en este trabajo de investigación y se explica en el presente capítulo. Dicho modelo fue propuesto debido a que, como se comenta en la sección 2.7 (Antecedentes de la investigación) de la presente tesis, no existe un modelo preestablecido que relacione las propiedades del andamio con la capacidad de mejorar el crecimiento de células. Solamente encontramos trabajos en los cuales se busca maximizar la elasticidad (Khalil *et al.* 2006; Rezende *et al.* 2010; Chantarapanich *et al.* 2013) y permeabilidad (Dias *et al.* 2014) de andamios, sin embargo en dichos trabajos no se relaciona el método de producción de los andamios con las propiedades y su capacidad de crecimiento de las células. Posteriormente, con base al modelo de optimización propuesto en el presente trabajo se implementó un Algoritmo Genético. El algoritmo mencionado genera diferentes configuraciones (conjunto de arquitectura y propiedades) de andamios, por medio de las condiciones de procesado (por el método de electrohilado) y las evalúa, con el objetivo de encontrar la mejor configuración de un andamio para maximizar el crecimiento celular. De esta manera en este capítulo se presenta primero el análisis del problema planteado para poder desarrollar el modelo de optimización que implementa la arquitectura y propiedades del andamio a través de ciertos parámetros de procesado. Posteriormente se presenta la implementación de un Algoritmo Genético usado para resolver el modelo.

4.1.1. Análisis del Problema

A continuación se analizan las partes de las que está compuesto el sistema con el que vamos a trabajar, el cual es llamado constructo de Ingeniería de Tejidos. Esto nos permite situarnos en los aspectos necesarios para describir el sistema y en las variables ocupadas para definirlo en el modelo que se propuso.

4.1.1.1. El constructo de ingeniería de tejidos

Un constructo de Ingeniería de Tejidos (TE) está compuesto por un andamio y células. El constructo de TE (Figura 4.1) debe encontrarse en un medio de cultivo con factores de crecimiento adecuados para cada linaje celular, así como mantener el cultivo celular en condiciones de temperatura de 30°C y atmósfera de CO₂, las cuales se mantienen colocando el constructo en una incubadora de células.

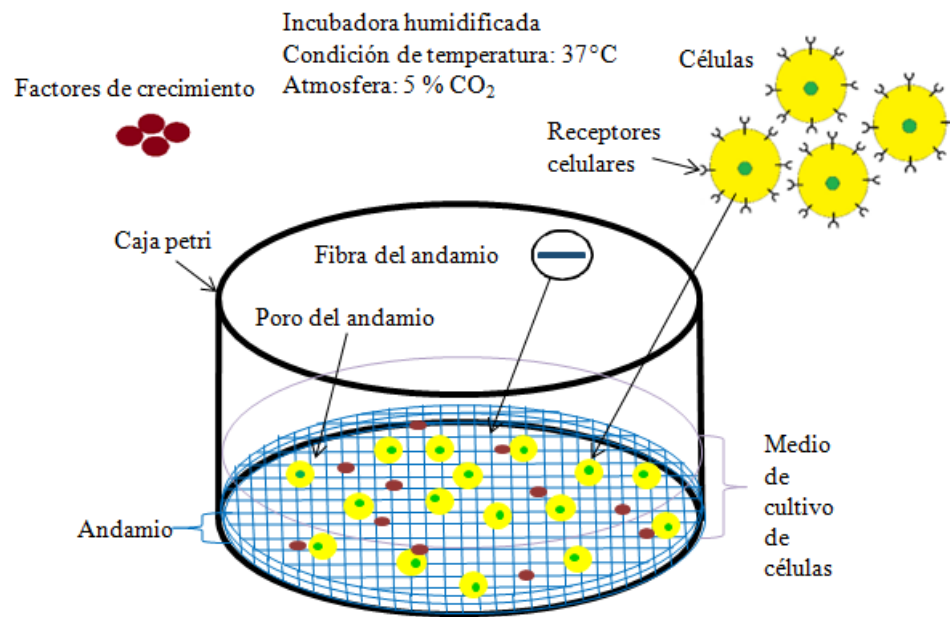


Figura 4.1. Constructo de Ingeniería de tejidos.

La arquitectura de los andamios influyen la unión celular, por lo tanto también el comportamiento y la función celular. Las células interactúan de manera distinta con los andamios a diferentes escalas de arquitectura (Figura 4.2), además de que dicha interacción depende del tipo de células que se utilicen. Por ejemplo, se ha considerado que los andamios que proporcionan un entorno para células que mejor se asemejan a la matriz extracelular de un cartílago fibroso son los andamios fibrosos con arquitectura de nanoescala (Stevens & George, 2005).

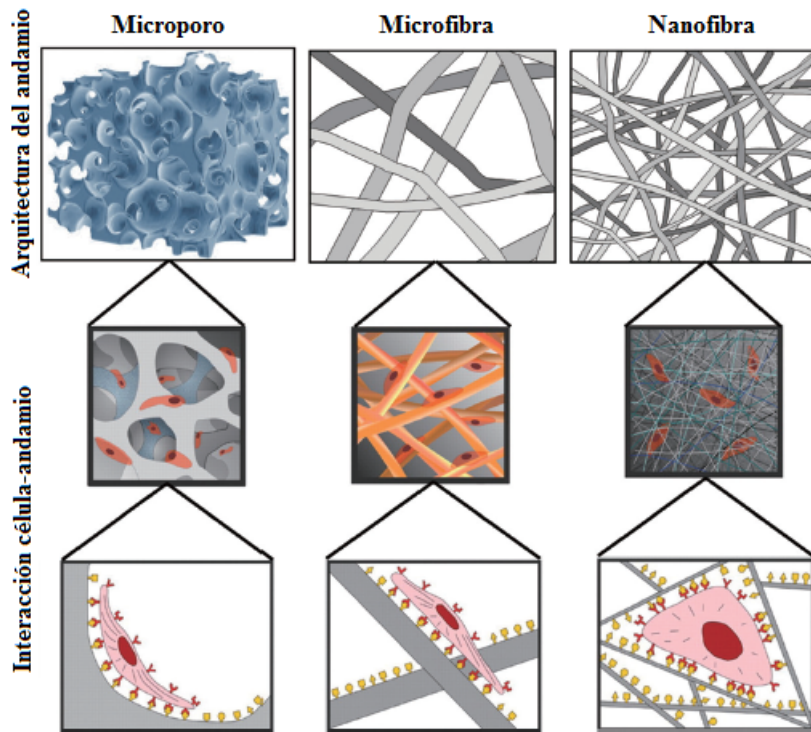


Figura 4.2. Impacto de la arquitectura de un andamio sobre el comportamiento de la célula (adaptado de Lim *et al.* 2014).

4.1.1.2. Optimización del crecimiento de células sobre un andamio

Un enfoque para mejorar la configuración de un andamio para un determinado fin es probar las diferentes combinaciones de posibles arquitecturas que se pueden obtener, por medio de diversas técnicas de fabricación de los andamios. Entre los diferentes objetivos que se buscan al fabricar un andamio se encuentran que el crecimiento de las células sea lo más rápido posible, debido a que este es un factor importante (por ejemplo en ciertas aplicaciones de trasplante de tejidos). Es por esto, que el objetivo del presente trabajo es maximizar el crecimiento de células sobre un andamio. En particular, se utiliza el modelo celular de osteoblastos normales humanos (NHOst) y el polímero polihidroxibutirato (PHB).

Los andamios buscan imitar las condiciones en las cuales crecen las células normalmente como si fueran una matriz extracelular artificial (ECM). La matriz extracelular es una organización compleja de proteínas estructurales como colágenos y una amplia variedad de proteoglicanos que es encontrada dentro de los tejidos y órganos (Harley & Gibson, 2008). Los andamios compuestos de ECM purificada presentan la capacidad de proporcionar sitios para la unión celular y la interrelación de células-sustrato (Figura 4.3). Estos andamios son bioactivos porque llevan información compleja, codificado en sus estructuras físicas y químicas. Desafortunadamente, los andamios totalmente hechos de moléculas ECM naturales presentan varias limitaciones relacionadas con su difícil purificación y procesamiento y sus propiedades mecánicas sub-óptimas. Estas limitaciones han ampliado la gama de materiales investigados hacia andamios sintéticos que están funcionalizados con restos bioactivos (Hoffman & García-Fuentes, 2011).

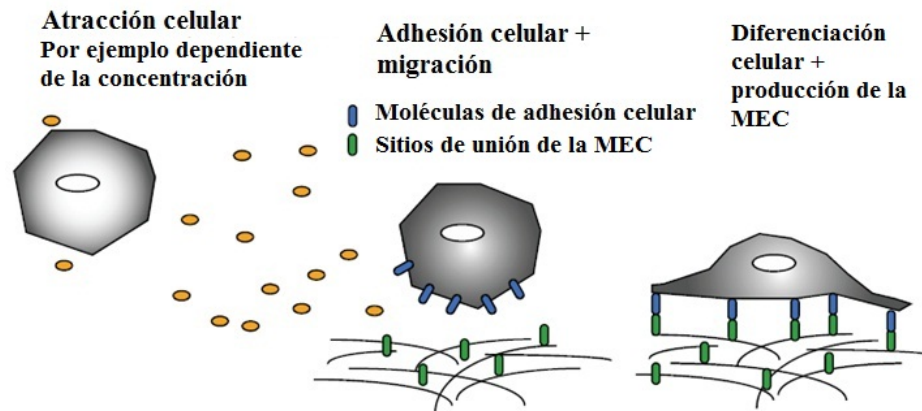


Figura 4.3. Los andamios son dispositivos capaces de activar el grupo de células madre que los acoge, en donde los factores de crecimiento activan el grupo de células madre e inducen su migración hacia el andamio (adaptado de Hoffman & García-Fuentes, 2011).

Los biopolímeros proporcionan otro método para la integración de secuencias bioactivas. Las células son conocidas por ser muy sensibles a las propiedades mecánicas del sustrato y a las fuerzas mecánicas direccionales transducidas a través de la ECM. En los tejidos esqueléticos, donde las tensiones mecánicas son importantes e incluso necesarias para la estimulación celular, la integración de motivos de adhesión capaces de transducir las fuerzas mecánicas en señales adecuadas para las células es de importancia crítica (Figura 4. 4).

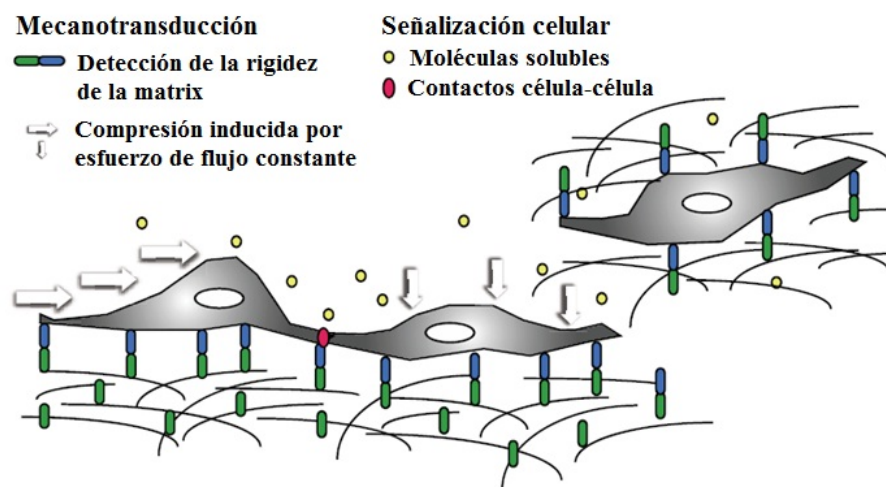


Figura 4.4. La diferenciación celular y la deposición de la matriz extracelular pueden ser afectadas por diferentes señales, por ejemplo la mecanotransducción o señalización celular (adaptado de Hoffman & García-Fuentes, 2011).

Es por esto que el andamio debe proporcionar un soporte mecánico temporal y definir la forma del tejido que se debe formar, mientras realiza la entrega de productos biológicos y la liberación de desechos celulares a través de poros internos. De esta manera un andamio debe definir la forma anatómica y volumen, proporcionar un soporte mecánico temporal y mejorar la regeneración del tejido a través de la liberación de factores biológicos (Hollister & Lin, 2007).

4.1.1.3. Dificultad de coordinar las diferentes propiedades de un andamio

Las estructuras porosas de redes fibrosas dependen altamente del diámetro de hilo (Eichhorn & Sampson, 2005). Las redes que presentan fibras de tamaño micrométrico permiten el ingreso de las células, mientras que las que tienen fibras más delgadas solo permiten la proliferación en la superficie (Pham *et al.* 2006) pero incrementan la razón del área superficial con respecto al volumen, por lo cual se debe acoplar el control de la porosidad de la red y el diámetro de poro promedio (Eichhorn, 2005) para obtener andamios que promuevan el crecimiento de células. Es deseable que se puedan calcular las propiedades de los andamios (independientemente del método de fabricación) a través de la arquitectura y propiedades químicas del material, para que se pueda comprender mejor el efecto de las propiedades en la regeneración de tejidos. Sin embargo, la interrelación entre diferentes propiedades adecuadas para un uso específico puede ser difícil de conseguir, por ejemplo las propiedades relacionadas al soporte mecánico pueden estar en conflicto con las de transporte de masas (Hollister & Lin, 2007). Como se mencionó anteriormente, en los modelos discutidos en el capítulo 2 de la presente tesis, no se precisa como obtener andamios con determinadas características para cierta aplicación, por lo cual a continuación se presenta el proceso de construcción del modelo de optimización para maximizar el crecimiento de células en andamios.

4.2. Construcción del modelo de optimización

Muchos problemas de optimización de importancia tanto teórica como práctica se preocupan de la elección de la mejor configuración de un conjunto de variables para lograr algunos objetivos. Estos problemas se pueden dividir de manera natural en dos categorías: aquellos en los que las soluciones están codificadas con valores de variables reales, y aquellos en los que soluciones están codificados como variables discretas. Entre estos últimos encontramos una serie de problemas llamados problemas de Optimización Combinatoria (CO, de Combinatorial Optimization). En

los problemas de CO se busca un objeto a partir de un número finito o numerable de objetos, que posiblemente pertenecen a un conjunto finito de objetos. Este objeto es típicamente un número entero, un subconjunto, una permutación, o una estructura gráfica (Blum & Roli, 2003). El problema general de programación no lineal se encuentra al final de la jerarquía de los problemas que buscan encontrar la mejor configuración de un set de parámetros (Papadimitriou & Steiglitz, 1998). Es decir encontrar x para

$$\text{Mininizar } f(x) \quad (4.1)$$

Sujeto a

$$g_i(x) \geq 0 \quad i = 1, \dots, m \quad (4.2)$$

$$h_j(x) = 0 \quad j = 1, \dots, p \quad (4.3)$$

Donde f , g_i , y h_j son funciones generales del parámetro $x \in R^n$. Las técnicas para resolver estos problemas en la naturaleza son casi siempre iterativas, y su convergencia es estudiada por medio del análisis real (Papadimitriou & Steiglitz, 1998).

De esta manera podemos pensar en obtener un conjunto de propiedades, que se encuentren sujetas a ciertas restricciones para satisfacer un objetivo establecido. Donde un conjunto de asignaciones factibles posibles son en nuestro caso

$$S = \{s = \{(Propiedad_1, \quad Propiedad_2, \dots, Propiedad_n), \dots, \}\} \quad (4.4)$$

4.2.1. Elementos a considerar para modelar el problema

El modelo del problema debe incluir la Función Objetivo y las restricciones. La función objetivo del problema debe servir para guiarnos en el objetivo que necesitamos resolver. En nuestro caso el objetivo es maximizar el crecimiento de

células sobre un andamio. Para abordar nuestro objetivo buscamos la maximización del crecimiento de las células encontrando la mejor configuración (es decir la arquitectura y las propiedades) de un andamio para determinando linaje celular. Además podemos identificar en este problema que las restricciones a resolver deben ser referentes a la misma arquitectura y propiedades del andamio que aumenten las capacidad de crecimiento del tipo de células deseado. Considerando estos elementos se construyó el modelo de optimización, el cual se presenta a continuación.

4.2.2. Modelo de optimización para maximizar el crecimiento de células en un andamio

El enfoque que utilizamos en el problema que se quiere resolver es generar un modelo que busque maximizar las propiedades que favorecen el crecimiento de cierto tipo de células en un andamio. Para esto utilizaremos los siguientes parámetros de configuración del andamio: el diámetro de poro (P), porosidad (φ), Módulo de Young (E) y ángulo de contacto (θ). Estos parámetros influyen en la interacción del andamio con las células como se puede ver en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Relación de la arquitectura y propiedades de un andamio con las células (Domínguez-Díaz & Cruz-Chávez, 2015).

Arquitectura y propiedades del andamio	Influencia
Diámetro de poro (P)	La adhesión optima, el crecimiento y la movilidad de las células.
Porosidad (φ)	La penetración celular y dispersión de las células en el andamio.
Módulo de Young (E)	La habilidad de diferenciación celular y la adhesión celular en el andamio.
Ángulo de contacto (θ)	La adhesión de las células en el andamio.

Los primeros dos parámetros (diámetro de poro y porosidad) son parte fundamental en la arquitectura de un andamio, mientras que los últimos dos (Módulo de Young y ángulo de contacto) son una parte importante de las propiedades de un andamio.

Debido a lo anterior se propone un modelo de optimización cuya función objetivo (Ecuación 4.5) maximice las propiedades mencionadas, con restricciones (Ecuaciones 4.6 a 4.9) de los límites que dichas propiedades pueden tener dependiendo del tipo de células que se utilicen. Dicho modelo de optimización puede ser adaptado a los rangos más adecuados para diversos linajes celulares.

$$\max f(P_i, \varphi_i, E_i, \theta_i) = \frac{P_i \alpha_i + \varphi_i \beta_i + E_i \gamma_i + \theta_i \delta_i}{4} \quad (4.5)$$

Sujeto a

$$L_{LP} \leq P_i \leq L_{UP} \quad (4.6)$$

$$L_{L\varphi} \leq \varphi_i \leq L_{U\varphi} \quad (4.7)$$

$$L_{LE} \leq E_i \leq L_{UE} \quad (4.8)$$

$$L_{L\theta} \leq \theta_i \leq L_{U\theta} \quad (4.9)$$

Las restricciones del modelo indican los rangos entre los cuales la arquitectura y propiedades del andamio presentan mejores condiciones para crecimiento de células. L_{LP} es el límite inferior y L_{UP} es el límite superior de diámetro de poro, $L_{L\varphi}$ es el límite inferior y $L_{U\varphi}$ es el límite superior de porosidad, L_{LE} es el límite inferior y L_{UE} es el límite superior de Módulo de Young, $L_{L\theta}$ es el límite inferior y $L_{U\theta}$ es el límite superior de ángulo de contacto. Donde α , β , γ , δ son factores de peso que ajustan las diferentes propiedades a un valor adimensional.

4.3. Diseño del Algoritmo Genético

El Algoritmo Genético Simple (también conocido como Canónico) necesita una codificación o representación del problema, que debe ser adecuada a cada caso específico. También se requiere de una función de ajuste o adaptación al problema, la cual asigna un número real a cada posible solución codificada. En nuestro caso la función de ajuste será la ecuación 4.5.

Los parámetros que tienen mayor influencia en un algoritmo evolutivo son los operadores genéticos y el criterio de terminación (o paro), los cuales se explican brevemente a continuación (Abraham *et al.* 2009):

- El operador de selección es usado para seleccionar cromosomas (los cromosomas elegidos usualmente son llamados padres) de una población. A través de este operador, se aplica peso sobre las soluciones de la población con el fin de elegir soluciones prometedoras para formar la siguiente generación.
- El operador de cruzamiento modifica los cromosomas seleccionados de una población a la siguiente por cambio de uno o más de sus subpartes. La idea del cruzamiento es incrementar las buenas propiedades de los padres para la descendencia y se aplica con una probabilidad P_C llamada probabilidad de cruzamiento o valor de cruzamiento.
- El operador de mutación introduce permutaciones aleatorias en la estructura del cromosoma, de manera que se introduzca nuevo material genético en la población por medio de la aplicación de la probabilidad o valor de mutación P_M .

El diagrama de flujo básico de un Algoritmo Genético (GA), introducido por John Holland y extendido por David Golberg, es el siguiente (Abraham *et al.* 2009):

1. Definir la función objetivo.

2. Codificar la población inicial de soluciones posibles.
3. Crear una nueva población (de manera evolucionaria para mejorar las soluciones)
 - a. Seleccionar cromosomas adecuados para la reproducción (padres)
 - b. Aplicar el operador de cruzamiento sobre los padres con respecto a la probabilidad de cruzamiento para producir nuevos cromosomas (conocidos como descendencia)
 - c. Aplicar el operador de mutación sobre los cromosomas con respecto a la probabilidad de mutación. Añadiendo nuevos cromosomas a la nueva población.
 - d. Volver a (a) cuando el tamaño de la nueva población es más pequeño que el de la población actual.
 - e. Reemplazar la población actual por una nueva población.
4. Evaluar la población actual usando la función objetivo.
5. Checar el criterio de terminación y si no se satisface regresar a (3).

Como se puede ver en el esquema básico de un GA es necesario formar una población de soluciones posibles, por lo cual necesitamos definir como estará compuesta dicha población, así que a continuación se va a explicar la representación simbólica del andamio.

4.3.1. Representación simbólica del andamio

Se decidió hacer uso de codificación directa para las soluciones del andamio. Los individuos que se utilizaran en el proceso del GA deben contener las características que los definan, por lo cual en nuestro caso vamos a hacer uso del diámetro de poro (P), la porosidad (φ), el Módulo de Young (E) y el ángulo de contacto (θ) para representar al individuo. Así mismo en dicha representación debemos incluir los parámetros de entrada que van a generar al andamio y por medio de los cuales se calculara la configuración del andamio. Como se menciono en el

capítulo 2 de la presente tesis (sección 3.3.2), se escogió el método de electrohilado para generar los andamios. Utilizaremos la tensión aplicada (V), el caudal o tasa de flujo de la solución (Q), la concentración de polímero (C), y la distancia de la punta de la aguja a la pantalla colectora (Z), como parámetros de entrada. Además, en la representación simbólica del individuo también añadiremos la aptitud para visualizar que tan apto es cada individuo para el crecimiento de células. Finalmente, el individuo quedo representado como se ve en la Figura 4.5, donde la posición en la que se encuentra el parámetro es llamada locus y el valor que se encuentra en esta es llamado alelo. Los valores presentados son solamente de ejemplo, es decir que para tales parámetros de electrohilado no se corresponden la arquitectura, propiedades y aptitud mostradas.

Individuo →	Parámetros de electrohilado				Arquitectura y propiedades				Aptitud
	V [kv]	C [%w/v]	Z [cm]	Q [mL/hr]	P [μ m]	ϕ [%]	E [MPa]	θ [$^{\circ}$]	<i>Aptitud</i> [A.U.]
	6	1	5	2	2	0.5	49	70	0.23

↑ posición ↑ valor

Figura 4.5. Representación simbólica del individuo del GA, la cual contiene los parámetros de entrada y salida de una determinada configuración de andamio.

Después de decidir la representación del individuo se debe pensar la manera en que se procederá para utilizar los operadores genéticos. Se decidió utilizar dos operadores de cruzamiento, un operador de mutación y uno de copia, los cuales se explicaran a continuación.

4.3.2. Diseño de los operadores genéticos

Uno de los más importantes temas en los algoritmos genéticos es el compromiso entre exploración y explotación. Esta compensación se refleja en tres operadores genéticos: el cruzamiento, mutación y selección. Generalmente, el cruzamiento y la mutación exploran el espacio de búsqueda, mientras que la selección reduce el área de búsqueda dentro de la población descartando las soluciones pobres (Lee *et al.*, 2008). A continuación se muestra la forma en que funciona cada operador, los cuales fueron adaptados a la estructura del individuo anteriormente presentado.

4.3.2.1. Operador de selección

Es necesario usar una estrategia de selección adecuada para la obtención de mejores soluciones. Encontrar un equilibrio entre la presión de selección y la diversidad es un tema crítico en el diseño de una estrategia eficiente, ya que la selección afecta tanto a la explotación y como a la exploración (Lee *et al.*, 2008). La selección es el primer operador aplicado sobre la población. El operador de selección también se llama operador de reproducción. La idea presente en el funcionamiento del operador de reproducción es obtener individuos con buenas propiedades que puedan ser utilizados para reproducirse con otros de manera probabilística y producir una mejora de la población (Mehta & Patel, 2015). Se escogió la selección por torneo debido a que se ha encontrado que este método es más eficiente que otros, como puede ser la selección proporcional a la aptitud (Yang & Soh, 1997). Para la selección por torneo comparamos dos individuos y aquel con mayor aptitud es seleccionado.

4.3.2.2. Operador de cruzamiento

A lo largo de décadas diversos investigadores han propuesto diferentes tipos de operadores de cruzamiento. Estos operadores se diferencian en la manera de explorar el espacio de soluciones y generar nuevas soluciones. Ellos tienen diferentes maneras de realizar el intercambio de información entre individuos durante la búsqueda. Típicamente, un cruce y un operador de mutación se usan en cualquier algoritmo genético (Elaoud *et al.* 2010). Ya que el cruzamiento sirve para proveer diversidad a la población se pensó en aplicar dos tipos de cruzamiento (Figura 4.6). Uno de estos es el cruzamiento de tipo elitista, en el cual después de la selección por torneo de un individuo se procede a realizar un segundo torneo y los dos individuos seleccionados se cruzan de manera aleatoria en un punto, obteniéndose dos nuevo individuos. En el segundo tipo de cruzamiento se seleccionan dos individuos de la población de manera aleatoria y se cruzan de manera aleatoria en un punto, obteniéndose dos nuevo individuos.

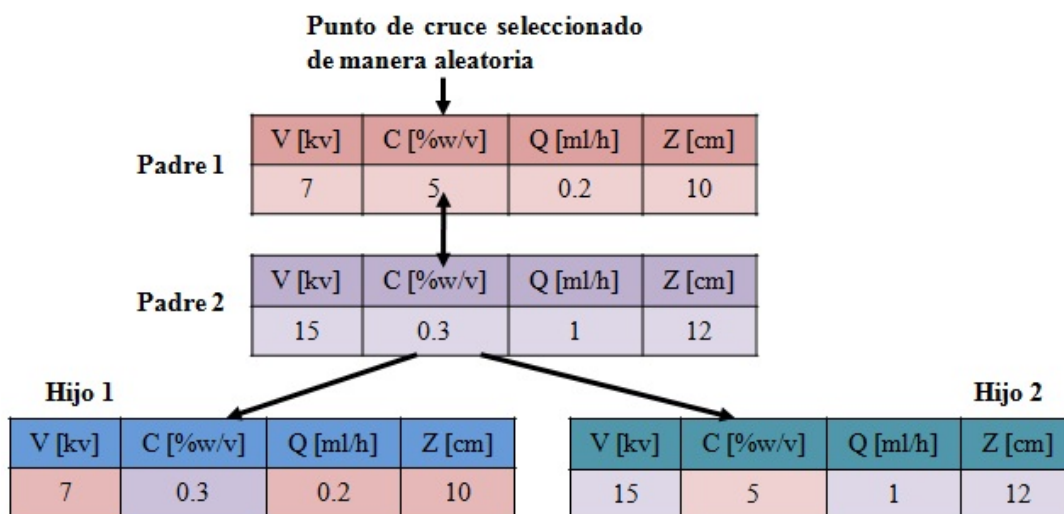


Figura 4.6. Funcionamiento de los operadores de cruzamiento.

De esta manera con el primer operador de cruzamiento se espera dar cierto peso elitista a los individuos generados, mientras que con el segundo se espera incluir mayor aleatoriedad al sistema.

4.3.2.3. Operador de mutación

La mutación introduce cambios aleatorios en un individuo, de manera similar a los procesos de mutación reales en que en una persona puede existir una mutación no heredada por sus padres. Por lo general la probabilidad de mutación es asignada usualmente como un valor constante, donde cada individuo tiene la misma probabilidad de ser mutado independientemente de su aptitud, si bien existen otros enfoques en los que se busca mutar individuos con aptitud más baja, dejando de lado los de aptitud más alta, para que de esta manera se cambien los individuos con menor aptitud (Libelli & Alba, 2000). En nuestro caso, el funcionamiento del operador de mutación será el tradicional, es decir que se utilizara un porcentaje establecido de probabilidad de mutación (Figura 4.7).

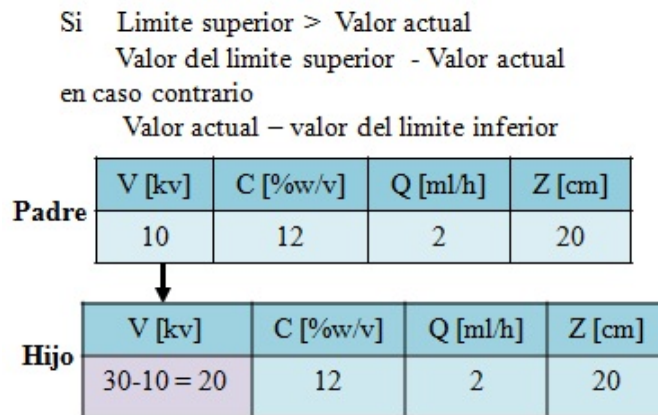


Figura 4.7. Funcionamiento del operador de mutación.

Solo se debe tener en cuenta que los parámetros de entrada (parámetros de electrohilado) se deben encontrar dentro de un rango específico en que se pueden llevar a cabo, por lo cual para solventar el problema de que una mutación nos lleve a

obtener parámetros que no sea posible utilizar se plantea que la mutación se realice de dos formas: (a) si el límite del parámetro a mutar es mayor que el valor actual se resta el valor actual al límite superior, (b) en caso contrario se resta el valor del límite inferior al valor actual.

4.3.2.4. Operador de copia o reemplazo

El operador de copia se trata de una reproducción de tipo asexual. Un determinado número de individuos pasa sin sufrir ninguna variación directamente a la siguiente generación. El porcentaje de copias de una generación a la siguiente debe ser relativamente reducido, pues en caso contrario se corre el riesgo de una convergencia prematura de la población hacia ese individuo, ya que el tamaño efectivo de la población se ve reducido y la búsqueda en el espacio del problema se focaliza en el entorno de dicho individuo (Pose, 2000).

4.3.3. Funcionamiento del Algoritmo Genético

El algoritmo genético es estático, es decir que se genera el mismo número de individuos en cada población. Su funcionamiento general se puede ver en la figura 4.8. Se requieren parámetros de entrada correspondientes al material del que se realizara el andamio, por lo que se realizó la búsqueda de las ecuaciones necesarias para obtener la configuración del andamio revisando la literatura existente sobre cómo obtener la arquitectura de un andamio a partir de los parámetros de electrohilado de un polímero. Finalmente se selecciono el trabajo de Cramariuc *et al.* 2013 para calcular el diámetro de hilo que se obtiene en el proceso de electrohilado y se encontró que a través de dicho diámetro de hilo se puede generar la estructura de una red fibrosa, por medio de las ecuaciones propuestas en los trabajos de Eichhorn y colaboradores de diferentes años. Hay que recalcar que los trabajos de Eichhorn y sus colaboradores han sido llevados a cabo durante más de una década, y se cuenta con

un libro entre ellos, por lo cual en el siguiente apartado únicamente se sintetiza la información que se requiere para poder determinar el diámetro de poro y la porosidad de una red fibrosa utilizando las ecuaciones que han desarrollado. Posteriormente se paso a generar las propiedades de Módulo de Young y ángulo de contacto del andamio por medio de los trabajos de Hollister y utilizando la teoría de Wenzel, Cassi y Baxter desarrollada sobre ángulos de contacto en diversas estructuras, respectivamente.

Algoritmo general para optimizar la configuración de un andamio

1. **Inicio**
 2. **Entrada de parámetros** del material con el que se fabricara el andamio
 3. **Algoritmo genético**
 - a) **Población inicial**
 - i) **Individuo = 0**
 - ii) Generación aleatoria de los parámetros básicos de procesado del andamio
 - iii) Cálculo de la arquitectura y propiedades del andamio
 - iv) Evaluación de la aptitud del andamio (Ecuación 3.5)
 - v) **Individuo = Individuo + 1**
 - vi) Cuando población inicial es igual a una cantidad n de individuos se termina el procedo de generación de individuos
 - b) **Generación = 0**
 - c) Proceso de **recombinación genética**
 - vii) Selección
 - viii) Cruzamiento
 - ix) Mutación
 - x) Copia

Se repite iii) y iv) para cada individuo recombinado
 - xi) **Se actualiza la población**
 - d) Mientras **Generación < Máximo número de Generación**
Repetir c)
 - e) Fin
-

Figura 4.8. Algoritmo Genético general para optimizar la configuración (arquitectura y propiedades) de un andamio.

El uso de las ecuaciones mencionadas se tuvo que hacer de esa manera ya que no existen estudios que propongan ecuaciones que nos lleven desde un punto (entrada de parámetros de electrohilado) hasta el otro extremo (arquitectura y propiedades de un andamio).

4.4. Modelos utilizados para la programación del Algoritmo Genético

Los modelos son representaciones de la realidad, por lo que se pueden mejorar con el paso del tiempo para poder hacer cálculos más exactos de los fenómenos que estamos estudiando. A continuación, se explica brevemente los modelos y las ecuaciones empleadas para obtener el diámetro de hilo de un proceso de electrohilado, con el cual se puede construir la estructura de un andamio y a partir de ella calcular la configuración del mismo. Se pudo realizar la relación entre ellas debido a que las ecuaciones son equivalentes en lo que están calculando, aunque se utilizan con diferentes propósitos y nombres en los trabajos de los que se tomaron. Al analizarlas se encontró que dichas ecuaciones se tratan de las mismas características que estaban mencionando para cada uno de los casos. A continuación se verá a que se refiere esto con mayor detalle.

4.4.1. Modelos para generar la arquitectura del andamio

Se necesitan ecuaciones que relacionen los parámetros de electrohilado con la arquitectura del mismo. Para esto se utilizaron las ecuaciones mencionadas en el trabajo de Cramariuc *et al.* 2013, y se enlazaron con la teoría desarrollada por Eichhorn *et al.* A continuación se presentan los detalles al respecto.

4.4.1.1. Generación del diámetro de hilo de un andamio obtenido a través de parámetros de procesado por medio de electrohilado

La predicción del diámetro de hilo de las fibras obtenidas por electrohilado se realizó por medio de la metodología propuesta por Cramariuc *et al.* 2013, las cuales relacionan parámetros de procesado con el diámetro de hilo obtenido. Se utiliza la ecuación 4.10 para calcular el diámetro de hilo por medio de las condiciones de electrohilado. Las ecuaciones relacionan la viscosidad cinemática (μ), densidad del polímero (ρ), flujo (Q), corriente eléctrica (I), campo eléctrico externo (E_{∞}), distancia entre la punta de la aguja y la pantalla colectora (z).

$$h = \left(\frac{6\mu\rho Q^2}{\pi I E_{\infty}} \right)^{\frac{1}{2}} \cdot z^{-1} [m] \quad (4.10)$$

Después de obtenerse el diámetro de hilo se necesita construir a partir de este la arquitectura y propiedades del andamio. Para generar la arquitectura del andamio se utilizan las expresiones teóricas desarrolladas por Eichhorn *et al.* 2005 y Eichhorn *et al.* 2010, en los cuales se relacionan el diámetro de poro y la porosidad de andamios producidos por medio de electrohilado, cuyo desarrollo se explica a continuación.

4.4.1.2. Generación de la arquitectura de un andamio

Se conoce que las propiedades de redes fibrosas estocásticas (tales como el papel) están fuertemente influenciadas por su estructura.. Las redes de electrohilado (Figura 4.9) pueden ser modeladas como líneas infinitas que representan ejes longitudinales y pasan a través de puntos distribuidos de acuerdo a un proceso de Poisson en el plano con orientación uniformemente distribuida (Sampson, 2009).

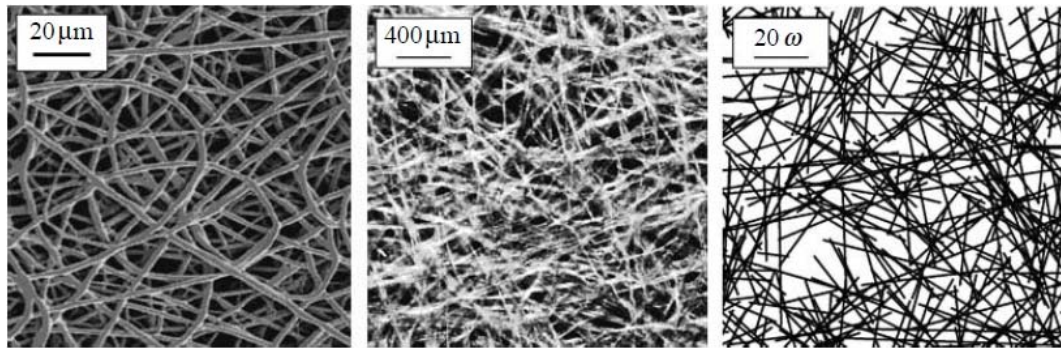


Figura 4.9. Imágenes de redes fibrosas obtenidas de un proceso de electrohilado (imagen de la izquierda), un papel (imagen de en medio) y modelado de este tipo de estructuras (imagen de la derecha). La escala para la estructura modelada es a lo mucho de 20 fibras (20ω).

Si bien las fibras de electrohilado pueden tener morfología colapsada, listón o rugosas, en este trabajo se consideran fibras con sección transversal circular, ya que asumir esto permite una única y simple relación entre el diámetro y la densidad lineal (la cual es influenciada por la densidad del material del que las fibras están hechas). De esta manera, las fibras en una red se pueden modelar como varillas rectas sólidas y pueden ser caracterizadas por tres variables: longitud (λ), sección transversal de la fibra (h), y densidad lineal (δ). La densidad lineal de una fibra se define como su masa por unidad de longitud, y viene dada por el producto de la densidad del sólido (ρ) a partir del cual se forma la fibra (en esta tesis de doctorado utilizaremos la densidad promedio del polímero polihidroxibutirato (PHB), y el diámetro de la sección transversal de la fibra (h). Para generar la red a través de las fibras utilizamos dos variables que caracterizan la red como un todo, las cuales son su porosidad media (φ) y su cobertura promedio (\bar{c}). La cobertura promedio se define como el número esperado de fibras que cubre un punto en el plano de apoyo de la red (Eichhorn & Sampson, 2005) y se puede calcular por medio de la ecuación (4.11), en la cual β es

la densidad areal (que es la masa por unidad de área de la red), h es el diámetro de fibra y δ es la densidad lineal previamente definida.

$$\bar{c} = \frac{\bar{\rho}h}{\delta} \quad (4.11)$$

Por otra parte el área abierta fraccionaria de una red (ε) de cobertura (\bar{c}) es dada por la probabilidad de Poisson:

$$\varepsilon = e^{-\bar{c}} \quad (4.12)$$

Los contactos de fibras influyen las dimensiones de los poros y se ha mostrado (Sampson, 2009) que el diámetro promedio de un polígono hueco en una red es

$$\bar{P} = \frac{2h}{\log\left(\frac{1}{\varepsilon}\right)} \quad (4.13)$$

La fracción de la superficie de la fibra en contacto con otras fibras en la red, y la cual está relacionada con la superficie válida para la adhesión de células, es llamada “el área de contacto fraccionaria” Φ . Para redes de cobertura promedio menores a dos dimensiones tenemos (Sampson, 2009):

$$\Phi_{2D} = \varepsilon \log(\varepsilon) \left(-\frac{1}{2} + \frac{2\log(\varepsilon)}{9} - \frac{\log(\varepsilon)^2}{16} + \frac{\log(\varepsilon)^3}{75} + \dots \right) \quad (4.14)$$

Mientras que para redes de cobertura mayor a dos dimensiones tenemos:

$$\Phi = \left(1 - \frac{2\bar{c}_{2D}}{\bar{c}}\right) \Phi_{2D} + \left(1 - \frac{\bar{c}_{2D}}{\bar{c}}\right) \Phi^* \quad (4.15)$$

Donde Φ^* se calcula como

$$\Phi^* = 2\varepsilon(1 - \varepsilon)^2 \log(\varepsilon) \left(-1 + \frac{\log(\varepsilon)}{4} - \frac{\log(\varepsilon)^2}{18} + \frac{\log(\varepsilon)^2}{96} - \frac{\log(\varepsilon)^4}{600} + \dots \right) \quad (4.16)$$

La fracción de superficie de fibras que no está en contacto con otras fibras, y por tanto es una superficie válida para interacciones con las células es:

$$(1 - \Phi) \quad (4.17)$$

Para estas redes el área fraccional abierta de redes de dos dimensiones es extendida a tres dimensiones y equivale a la porosidad (φ) de la red:

$$\varphi = \frac{(\bar{c}-1)h}{(\bar{c}-1)h + \bar{c}h} \quad (4.18)$$

Diferentes condiciones de arquitectura (por ejemplo, diámetro de poro, porosidad) de un andamio influyen en las propiedades mecánicas y la mojabilidad del andamio. A su vez las propiedades mecánicas de un andamio afectan la capacidad de crecimiento de células en el mismo (Burdick & Mauck, 2011), sin embargo aún no se puede cuantificar que tanto influye una propiedad específica en el crecimiento de las células. A continuación se presenta las ecuaciones que se utilizaron en la presente tesis doctoral para obtener el Módulo de Young y el ángulo de contacto de un andamio a través de las características de la arquitectura y la influencia del material del que está constituido un andamio.

4.4.1.3. Generación de propiedades del andamio

Las propiedades del andamio cambian dependiendo de la estructura química del material base del que está hecho el andamio y la arquitectura del andamio. Entre dichas propiedades podemos encontrar al modulo de Young y al ángulo de contacto del material, los cuales describiremos a continuación junto con las ecuaciones que se utilizaran para calcularlos dentro del algoritmo que se diseño.

4.4.1.3.1. Módulo de Young

El Módulo de Young (o Módulo elástico). La rigidez es una medida de la habilidad de un material a resistir la deformación. En el cuerpo humano el modulo de Young del tejido adiposo se encuentra en el rango de cientos de kPa, mientras que para el hueso llega a ser de GPa. Además la rigidez de los tejidos cambia con el tiempo debido a procesos fisiológicos. Ya que existe una relación estrecha entre las células y la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés) dentro de los tejidos, y la función de las células en una variedad de ambientes mecánicos, se han realizado estudios para investigar los mecanismos que las células utilizan para sentir y responder a los ambientes mecánicos (Bathia, 2012 página 21). Los andamios de ingeniería de tejidos son usados extensamente como análogos tridimensionales de la ECM (Harley & Gibson, 2008). Las propiedades mecánicas como el modulo de Young han mostrado influencia significativa en el compartimiento de las células, como por ejemplo en la adhesión, crecimiento y diferenciación *in vitro*, e influencia la bioactividad de un andamio in vivo (Harley & Gibson, 2008). Se puede calcular el Módulo de Young de un andamio con la siguiente ecuación (Hollister & Lin, 2007):

$$E_{superior}^{isotropico} = \frac{2E\varphi(7 - 5\nu)}{\varphi(15\nu^2 + 2\nu - 13) - 15\nu^2 - 12\nu + 27} \quad (4.19)$$

Donde E es el modulo de Young del material base en bulto, φ es la fracción de volumen del material solido ($0 < \varphi < 1$), y ν es la razón de Poisson del material base en bulto (también isotrópico). La ecuación 4.19 es tal como la expresa Hollister & Lin, 2007.

4.4.1.3.2. Ángulo de contacto

Una superficie lisa de un material es considerada una superficie ideal y a este ángulo de contacto se le llama ángulo de contacto de Young (Choi *et al.* 2009). Mientras que el ángulo de contacto una superficie rugosa es llamado el ángulo de Wenzel. Cassie y Baxter fueron los primeros en correlacionar la medida de ángulos de contacto aparentes para una interfaz compuesta con los detalles de la textura de una superficie sólida, basándose en la suposición de que tras la formación de una interfaz de un compuesto, una gota de líquido alcanza un “equilibrio” que define el ángulo de contacto aparente θ_E^* para minimizar la energía libre total del sistema como en superficies planas. Siempre que el tamaño de la textura de la superficie es mucho más pequeño que el de la gota de líquido la energía libre del sistema alcanza el mínimo global cuando el ángulo de contacto aparente θ_E^* de la interface del compuesto alcanza un valor descrito por la relación de Cassie-Baxter (CB):

$$\cos\theta_E^* = r_\phi \phi_s \cos\theta_1 + (1 - \phi_s) \cos\theta_2 \quad (4.20)$$

De esta manera el ángulo de contacto de una superficie con textura puede ser determinado por medio de la ecuación 4.22:

$$\theta = \cos^{-1}(-1 + (r')(\cos\theta_{Material\ base} + 1)) \quad (4.21)$$

Donde r' es la fracción de superficie ocupada por el material, la cual se puede calcular restando el área abierta fraccionaria de la red (ϵ) a 1, y $\theta_{Material\ base}$ es el ángulo de contacto de Young (es decir de una superficie ideal).

$$\theta = \cos^{-1}(-1 + (1 - \epsilon)(\cos\theta_{Material\ base} + 1)) \quad (4.22)$$

4.5. Conclusiones del diseño del Modelo de Optimización y del GA

Se realizó el diseño del modelo de optimización y del algoritmo genético considerando que nuestro individuo debe estar representado por los parámetros de

electrohilado, así como de la configuración y la aptitud del andamio. Se seleccionaron las ecuaciones necesarias para poder realizar la construcción del andamio por medio de un algoritmo. Ya que en el presente proyecto se pretende desarrollar un algoritmo que genere resultados que se puedan aplicar de manera experimental, para poder reproducirlos, en el siguiente capítulo se presenta la caracterización del polímero polihidroxibutirato (PHB), por medio de la cual se obtuvieron las características del mismo y poder determinar datos para programar nuestro algoritmo. De esta manera en el siguiente capítulo se presenta también la adaptación del modelo de optimización y del Algoritmo Genético a nuestro problema específico, es decir maximizar el crecimiento de Osteoblastos Normales Humanos (NHOst, de Normal Human Osteoblasts) sobre andamios de PHB. En dicho capítulo se establecen los rangos en los cuales puede ser ejecutado el algoritmo y ciertos detalles experimentales, lo que se realizó primero por medio de una revisión de la literatura y posteriormente por un ajuste de condiciones después de reproducir los resultados obtenidos. Así mismo, se presentan los resultados obtenidos por medio del algoritmo genético, su análisis y la aplicación de manera experimental del mismo con las NHOst.

Capítulo 5. Resultados

["La conjunción de hombres y máquinas, cerebros humanos y cerebros electrónicos, ya no le parecía extraña y provocativa. Se trataba simplemente de medios para seguir progresando, para llevar a cabo la investigación."
Michael Crichton]

Capítulo 5. Resultados y análisis de resultados

En este capítulo se presentan los resultados del proceso de investigación posteriores al diseño del modelo de optimización y del Algoritmo Genético. Primero, encontramos la caracterización de los materiales (sección 5.1), que nos sirvió para decidir que polímero utilizar para realizar el andamio y para obtener los parámetros del modulo de Young del material base del andamio (usado en la Ecuación 4.19) y la del ángulo de contacto del material base del andamio (usado en la Ecuación 4.22). Después se presentan los resultados computacionales del proceso de optimización de los andamios para cultivo de osteoblastos (sección 5.2). Por último, se presentan la aplicación de los resultados obtenidos por medio el proceso de optimización (sección 5.3).

5.1. Caracterización del polihidroxibutirato

Se decidió utilizar al polímero biodegradable y biocompatible PHB, como se mencionó en el capítulo 3 de la presente tesis. Se caracterizó una serie de 12 PHBs de origen bacterial (donados por investigadores del IBT-UNAM) y uno de origen comercial (Sigma-Aldrich). Esto se realizó para determinar cuál podría ser el PHB más factible para usarlo como material base para los andamios. Los PHBs caracterizados provienen de bacterias *Azotobacter vinelandii* pertenecientes a una cepa denominada OP (Myshkina, 2005) y una cepa derivada de *ptsN::Kmr* nombrada OPN (Peña, 2014), así como de la cepa SOPI *rsma::Sm* (Hernandez-Eligio, 2012), y de OPNA *ptsN::km-rsMA::Sp* (Garcia, 2014). Las bacterias fueron cultivadas en medios PY y Burk (más información de las cepas y los medios de cultivo en el apéndice A de la presente tesis). Las cepas fueron cultivadas en frascos Erlenmeyer de 500 mL durante 72 horas. A continuación se presenta un estudio de las propiedades de los PHBs mencionados y finalmente se muestra cual fue el PHB que se decidió utilizar para obtener los andamios, así como el porqué de esto.

5.1.1. Determinación de peso molecular

El peso molecular de un polímero es importante debido a que influye en sus propiedades. Es decir, un polímero de igual estructura química pero diferente peso molecular puede presentar diferentes características.

5.1.1.1. Protocolo experimental

Se caracterizó una serie de polihidroxibutiratos (PHBs), para lo cual primero se midió el peso molecular promedio de todos por medio de viscosimetría capilar con un viscosímetro Ubbelohde (Cannon Instrument Company Inc., State College PA, USA). Las medidas de viscosidad fueron realizadas con cloroformo como solvente a 30 °C. El peso molecular promedio M_w fue determinado de los valores de la viscosidad intrínseca, $[\eta]$, por medio de la ecuación de Mark–Houwink (Ecuación 4.1), usando los coeficientes $k = 0.77 \times 10^{-4}$ y $\alpha = 0.82$ (Marchessault, 1970).

$$[\eta] = k \cdot \overline{M_w^\alpha} \quad (5.1)$$

5.1.1.2. Resultados y análisis de resultados

Los PHBs que se caracterizaron presentan diferentes condiciones de síntesis bacteriana, que varían debido a la composición, la condición de aireación y condiciones de cultivo, del medio en que crecieron, así como también por el tipo de cepa bacterial utilizada (Tabla 5.1). Debido a lo anterior los pesos moleculares obtenidos tienen un amplio rango que va desde PHBs de bajo peso molecular promedio (160 a 640 kDa), peso molecular promedio a alto (1400 a 1660 kDa) hasta peso molecular ultra alto (mayor a 2000 kDa).

Tabla 5.1. Condiciones de síntesis bacteriana de una serie de PHBs y pesos moleculares promedio de cada uno de ellos.

Muestra de PHB	Mw (kDa)	Condiciones de cultivo de bacterias		
		Cepa bacteriana	Medio de cultivo	Condiciones de aireación
Sigma-Aldrich	50	-----	-----	-----
PHB160	160	SOP1	Burk	Alta
PHB190	190	OP	Burk	Alta
PHB230	230	OP	Burk	Alta
PHB260	260	OP	Burk	Alta
PHB420	420	OPNA	PY	Alta
PHB430	430	OP	PY	Alta
PHB460	460	SOP1	PY	Alta
PHB500	500	OP	PY	Alta
PHB640	640	OPN	PY	-----
PHB1400	1400	-----	PY	Baja
PHB1660	1660	OP	PY	Baja
PHB2030	2030	OPN	PY	Baja

Los pesos moleculares bajos (190 a 260 kDa) se obtuvieron a partir de los cultivos con la cepa OP en medio Burk bajo condiciones de alta aireación, los PHBs con alto y ultra alto peso molecular (de 1660 a 2030 kDa) fueron obtenidos utilizando el medio PY y condiciones de baja aireación, con cepas OP y OPN. Este amplio rango de pesos moleculares de los PHBs es interesante ya que las propiedades físicas que tengan varían y esto los hace candidatos para diversos tipos de aplicaciones, que pueden ir desde embalaje de productos hasta aplicaciones en el campo de la medicina.

5.1.2. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier

El estudio de la composición de los PHBs por medio de Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) nos ayuda a verificar que el producto que estamos considerando PHB realmente lo sea, así como para verificar si no existen residuos de algún tipo en los PHBs.

5.1.2.1. Protocolo experimental

Se utilizó un FTIR Nicolet iS10 de Thermo Scientific (EE.UU.) en modo de reflectancia total atenuada (ATR). Para cada espectro se realizaron dieciséis barridos entre 4000 y 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , los cuales fueron promediados.

5.1.2.2. Resultados y análisis de resultados

Por medio de FTIR se puede observar que tanto los PHBs obtenidos de las cepas bacterianas como un PHB comercial (50 kDa) muestran las mismas bandas asociadas a PHB (Figura 5.1, Tabla 5.2). Se observa que los PHBs muestran una parte cristalina y una amorfa debido a que el PHB es un polímero semicristalino. En 1719 cm^{-1} se encuentra la banda de estiramiento deformación C=O (A, correspondiente a la región amorfa), de 1800 a 1700 cm^{-1} la región de estiramiento C=O y de 1300 a 1000 cm^{-1} se encuentran las bandas de estiramiento C-O-C y C-C, y deformación CH (Domínguez-Díaz *et al.* 2012; Furukawa *et al.* 2005).

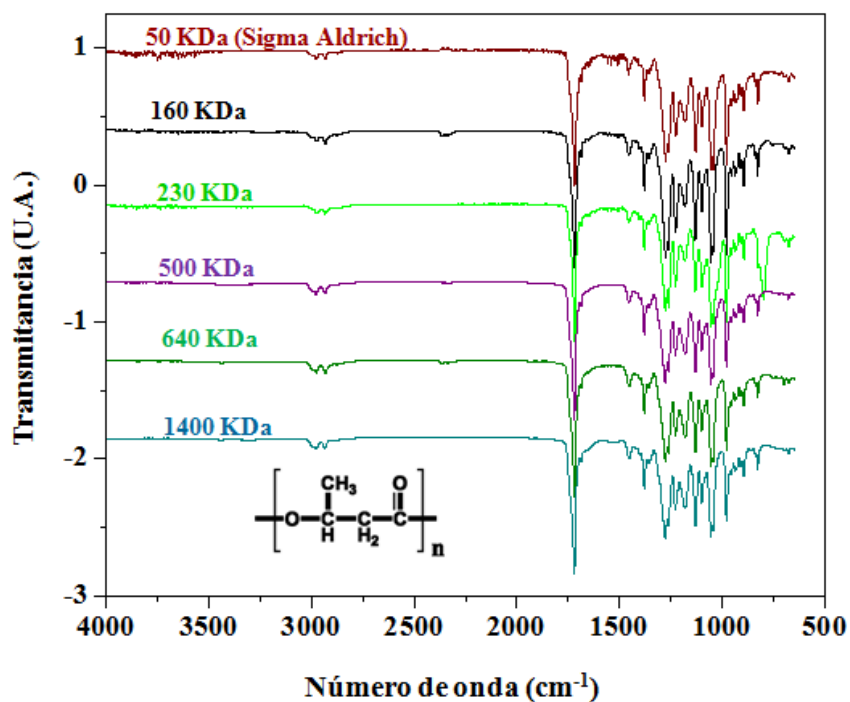


Figura 5.1. Espectro de FTIR de PHBs de diferentes pesos moleculares.

Tabla 5.2. Bandas de PHB de diferentes pesos moleculares.

Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de asignación
1747	C=O extensión (A)
1718	C=O extensión (C)
1450	CH ₃ deformación asimétrica
1380	CH ₃ deformación simétrica
1356	CH deformación y CH ₃ deformación simétrica
1289	CH deformación (C)
1276	C-O-C extensión (C)
1271	C-O-C extensión (A)

La región de 1800 - 1200 cm⁻¹ se puede ver con más detalla en la Figura 5.2, en la cual se observó que la deformación asimétrica CH₃ en 1450 cm⁻¹, en el caso de

PHBs de bajo peso molecular (PHB comercial de 50 kDa y PHB160 de 160 kDa) presenta la deformación asimétrica CH_3 en 1457 cm^{-1} , en el caso del PHB de 230 kDa se encuentra en 1456 cm^{-1} , para los PHBs de alto peso molecular (640 kDa y 1400 kDa) se muestra a 1457 cm^{-1} . La deformación simétrica CH_3 se detectó a 1379 cm^{-1} para todos los PHBs, mientras que la región de estiramiento C-O-C (parte cristalina de PHB) parece aumentar de 1275 a 1278 cm^{-1} con el aumento de peso molecular.

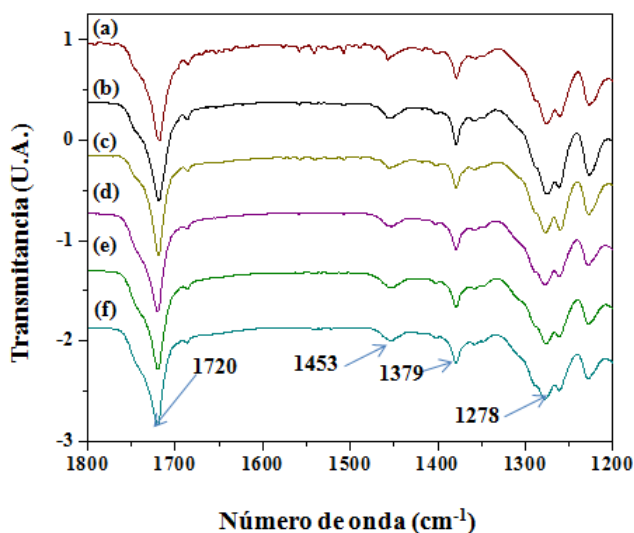


Figura 5.2. Región de $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ de los PHBs de diferentes pesos moleculares.

5.1.3. Análisis de las temperaturas de descomposición de los PHBs

La temperatura de descomposición de los PHBs sirve para determinar las temperaturas de trabajo que pueden utilizarse para procesar o tratarlos, sin que dichos procesos los degraden.

5.1.3.1. Protocolo experimental

Para determinar las temperaturas de descomposición (T_{dec}) se utilizó análisis termogravimétrico (TGA), usando un TGA Q500 (manufacturado por TA Instruments, Newcastle DE, EUA). Los experimentos se realizaron en atmosfera de nitrógeno a una tasa de 10 °C/min y con barridos de temperatura de 0°C a 500°C.

5.1.3.2. Resultados y análisis de resultados

Por medio de la técnica de termogravimetría, podemos analizar la pérdida de masa en función de la temperatura. Los resultados obtenidos (Figura 5.3) muestran que los PHBs de peso molecular bajo fueron estables hasta 225°C, mientras que los PHBs de peso molecular alto comenzaron a perder masa cerca de 150 °C. La temperatura de degradación (T_{dec}) de los materiales fue de 250 °C para el PHB de 260 kDa (peso molecular bajo), mientras que para el de 2030 kDa (peso molecular alto) fue de 228 °C. De esta manera se puede observar que la estabilidad térmica decrece con el incremento del peso molecular.

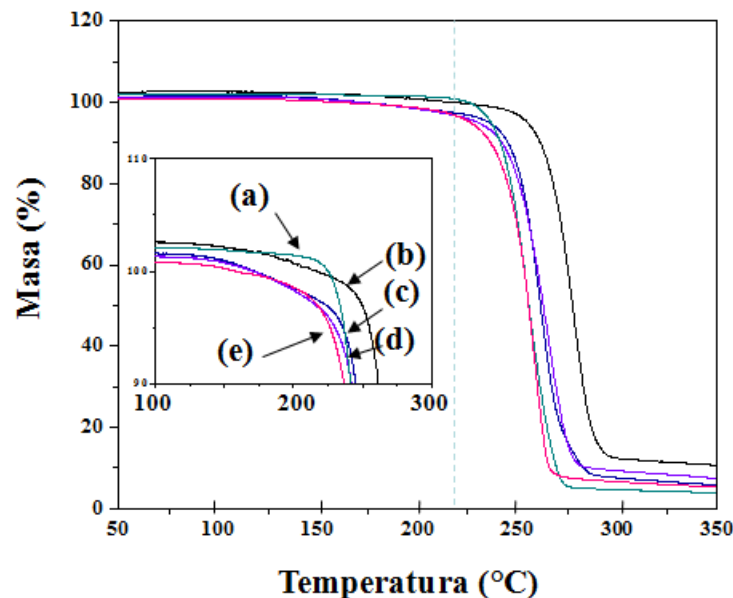


Figura 5.3. Pérdida de masa de PHBs de (a) 160 kDa, (b) 230 kDa, (c) 500 kDa, (d) 640 kDa y (e) 1400 kDa.

Todos los PHBs de origen bacteriano se descomponen rápidamente con una máxima tasa de pérdida de masa entre 250 °C y 280 °C, como se ve en las graficas de las derivadas de la pérdida de masa como función de la temperatura (Figura 5.4).

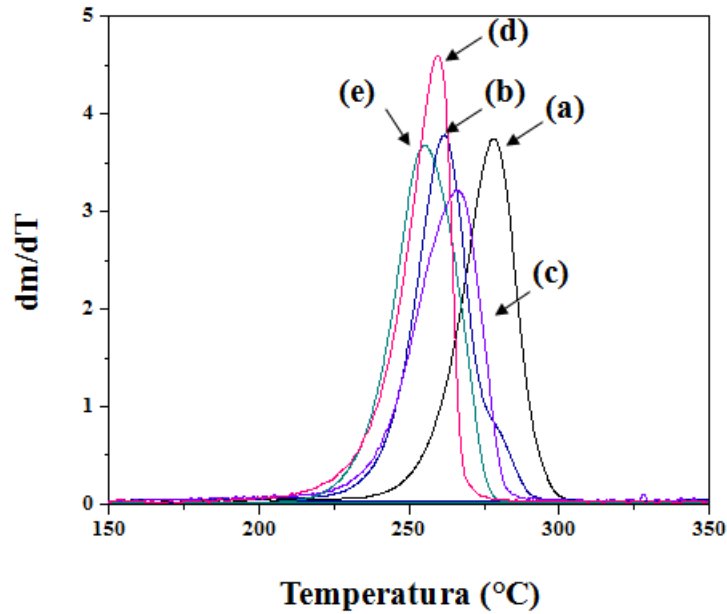


Figura 5.4. Derivadas de la pérdida de masa de PHBs de (a) 160 kDa, (b) 230 kDa, (c) 500 kDa, (d) 640 kDa y (e) 1400 kDa.

5.1.4. Análisis de las temperaturas de transición térmica de los PHBs

Como se vio en la sección 3 del capítulo de Metodología de Investigación se pueden determinar las temperaturas de transición térmica de los materiales por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

5.1.4.1. Protocolo experimental

Las transiciones térmicas de los materiales fueron determinadas usando un calorímetro DSC6000 (manufacturado por Perkin Elmer, Waltham MA, EUA). La calibración del equipo se realizó usando indio de grado analítico (con temperatura de fusión $T_m = 156.6$ °C). La masa de las muestras utilizadas fue de 4 mg y se reportan los datos del segundo calentamiento y del primer enfriamiento. Los barridos de temperatura fueron hechos a una tasa de 10 °C/min sobre atmósfera de nitrógeno. El grado de cristalinidad χ fue calculado de los valores de la entalpía de fusión a 100 % de cristalinidad para el PHB, reportado en la literatura como $H_o = 146$ J/g, por medio de la ecuación 5.2.

$$\chi(\%) = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_o} \right) \cdot 100\% \quad (5.2)$$

5.1.4.2. Resultados y análisis de resultados

Los resultados del barrido de calentamiento de las muestras (Figura 5.5) muestran que los PHBs de peso molecular bajo tienen un endotérma de fusión de aproximadamente 174 °C, y que esta transición no se ve afectada por el peso molecular del polímero. Sin embargo, a altos pesos moleculares (1660 kDa y 2030 kDa) este comportamiento cambia hacia una temperatura de fusión (T_m) más baja de aproximadamente 150 °C.

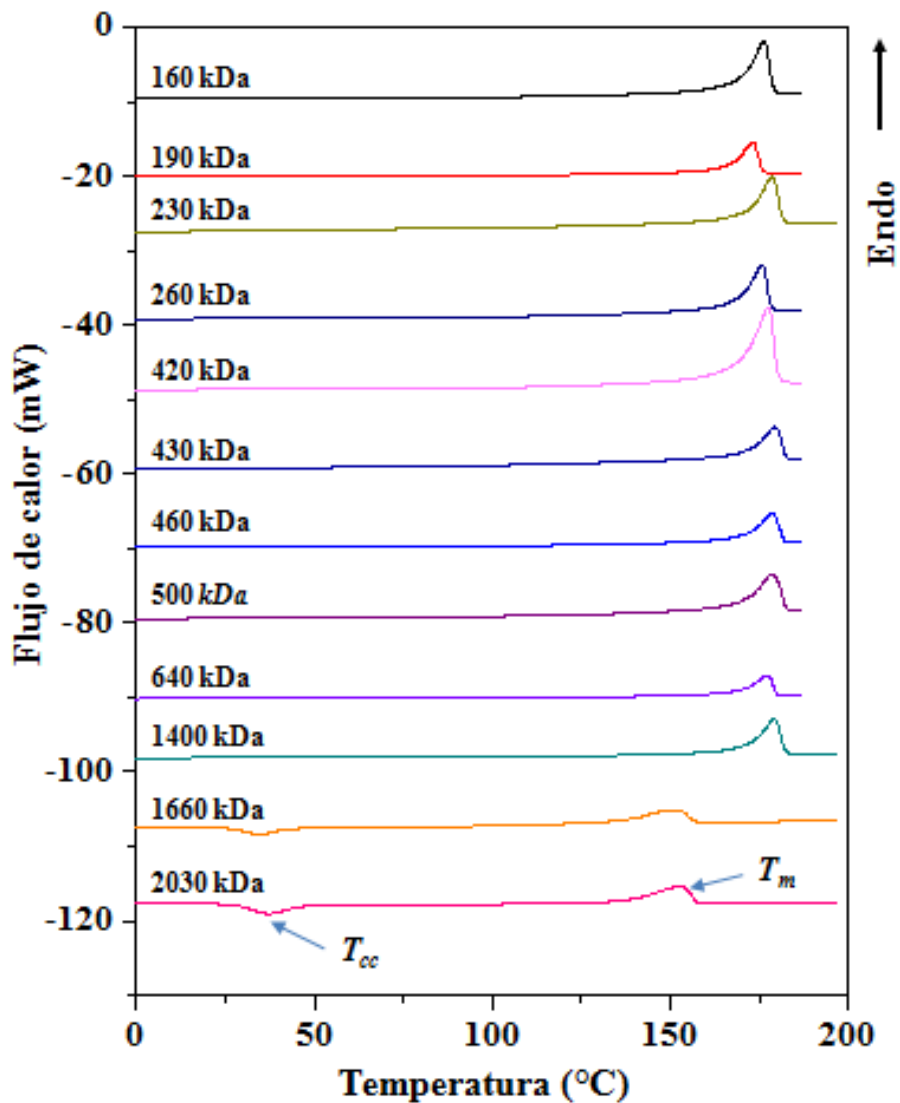


Figura 5.5. Temperaturas de fusión de PHBs de diferentes pesos moleculares.

Además, a diferencia de los demás PHBs, los PHBs de 1660 kDa y 2030 kDa muestran un pico exotérmico de cristalización en frío (T_{cc}) de aproximadamente 32°C (Figura 5.6).

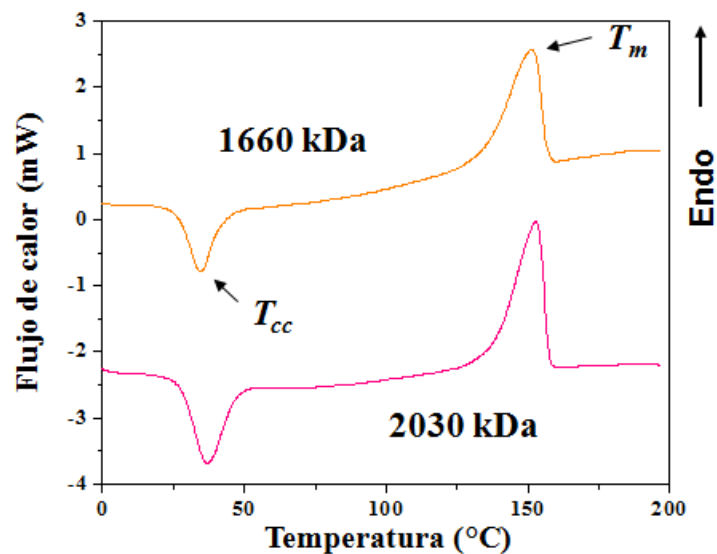


Figura 5.6. Cristalización en frío de PHBs de alto peso molecular.

Los exotermas de cristalización en frío y las bajas temperaturas de fusión de los PHBs de pesos moleculares altos sugieren dificultad para cristalizar. Por lo cual, se realizó el cálculo de las entalpías de fusión usando la ecuación 5.2 para obtener el grado de cristalinidad de los PHBs. Los cálculos realizados (Tabla 5.3) muestran que los pesos moleculares altos de PHB tienen de 20 a 30 % menos cristalinidad que los de bajo peso molecular.

Los barridos de enfriamiento (Figura 5.7) muestran la capacidad de cristalizar de los PHBs. Los PHBs de bajo peso molecular muestran picos exotérmicos definidos durante la cristalización, mientras que las temperaturas de cristalización (T_c) fueron de aproximadamente 105 °C independientemente del peso molecular del PHB. Los PHBs de alto peso molecular (Figura 5.8) muestran picos de cristalización exotérmica definidos a bajas temperaturas de cristalización (T_c) de aproximadamente 55 °C, lo cual favorece la hipótesis de que la tasa de cristalización en estas muestras es mucho más baja.

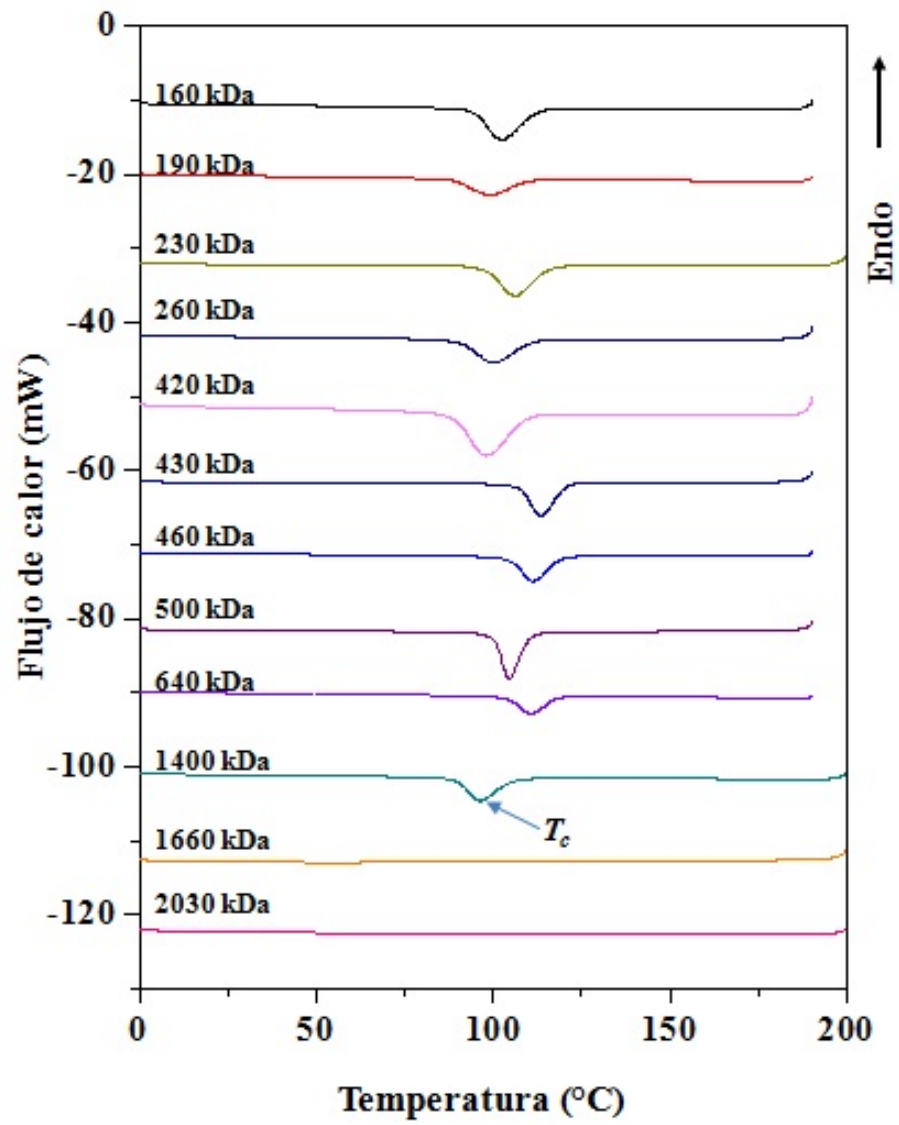


Figura 5.7. Temperaturas de cristalización de PHBs.

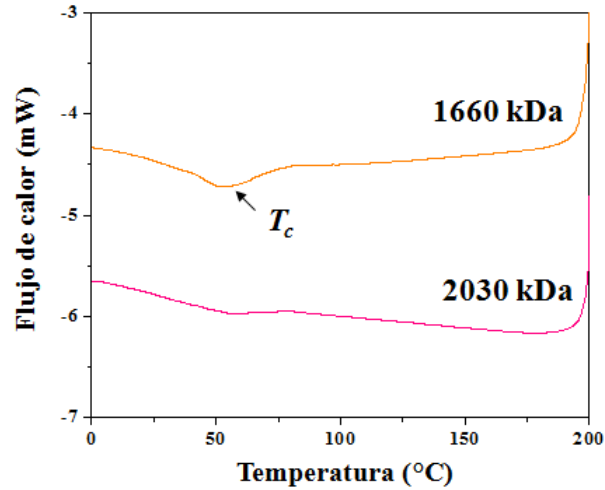


Figura 5.8. Temperaturas de cristalización de PHBs de alto peso molecular.

Se puede notar una influencia clara del peso molecular de los PHBs sobre sus transiciones térmicas. Las temperaturas de fusión (T_m) y las de cristalización (T_c) (Figura 5.9 (a) y (b), respectivamente) de los PHBs disminuyen con el aumento del peso molecular promedio.

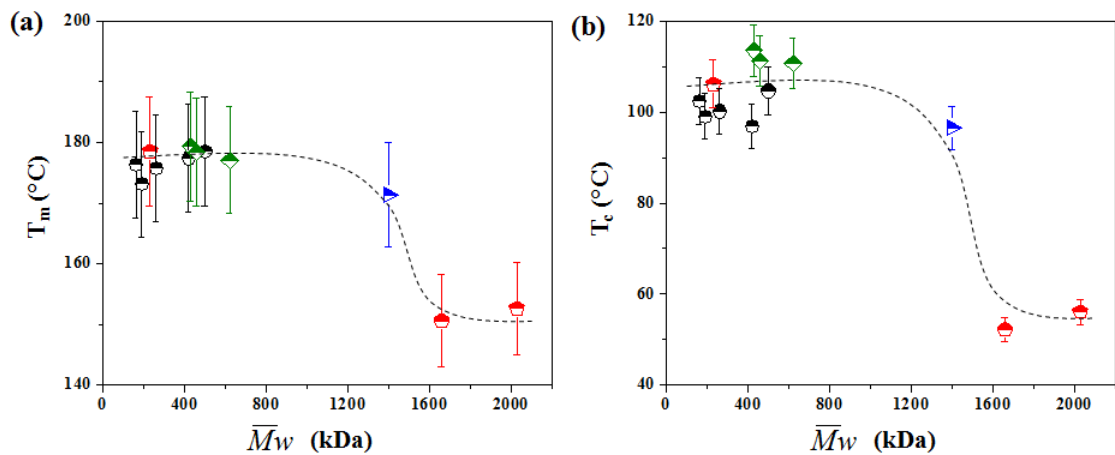


Figura 5.9. Influencia del peso molecular promedio sobre las transiciones térmicas de PHB (a) T_m y (b) T_c .

La disminución de las T_m y T_c a altos pesos moleculares sugiere que en dichos casos las uniones moleculares afectan la cristalización y el grado de cristalinidad es más pequeño. Esto puede ser debido a dos posibles causas:

- (a) Para que se dé la cristalización cuando el polímero fundido se va enfriando requiere difusión y un nuevo arreglo macromolecular, las uniones moleculares de la red actúan como barreras para el movimiento molecular. Esto hace que pocas cadenas puedan cristalizar mostrando un exoterma de cristalización débil como el que se muestra en la Figura 5.8. Cuando se completa la transición de fundido a sólido algunas cadenas en fase amorfa pueden encontrarse en estado metaestable. Por lo cual, cuando se realiza el recalentamiento de la muestra estas cadenas tienen suficiente energía para cristalizar y ocurre la cristalización en frío, la cual se observa en la Figura 5.6.
- (b) Otra posibilidad para la reducción de la T_m y del grado de cristalinidad es debido a la estereoregularidad del PHB. Ya que se ha reportado que la reducción de la T_m puede estar asociada a la reducción de la cristalinidad, siendo reportado por Natta (Natta, 1959; Shalaby, 1981) en el caso de polipropileno fraccionado.

Estudios más profundos al respecto son necesarios para poder concluir de manera rotunda cual de los dos mecanismos mencionados es el que genera el efecto de la disminución de la T_m y la T_c . Los resultados obtenidos de las propiedades térmicas y la cristalinidad de los PHBs son mostrados de manera resumida en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Propiedades térmicas y cristalinidad de PHBs.

Muestra	T_{dec} (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	Cristalinidad χ (%)
PHB	237	159	60	103	61	41
PHB160	250	176	71	102	59	49
PHB190	---	173	64	99	53	44
PHB230	---	178	67	106	66	46
PHB260	---	176	66	100	54	45
PHB420	---	177	71	97	58	49
PHB430	238	179	85	114	71	58
PHB460	---	178	75	111	60	51
PHB500	---	178	84	105	67	58
PHB640	233	177	88	111	68	60
PHB1400	228	171	104	97	65	71
PHB1660	---	151	63	52	11	43
PHB2030	228	153	55	56	5	38

5.1.5. Microscopía óptica con polarizadores cruzados

Durante la solidificación de los polímeros fundidos se pueden formar estructuras conocidas como esferulitas, las cuales pueden ser observadas por medio de microscopía óptica con luz polarizada. El tamaño de dichas esferulitas depende del peso molecular del polímero y del tratamiento térmico que se le aplique, ya que a distintas tasas de calentamiento un mismo polímero con idéntico peso molecular formara esferulitas de diferentes tamaños.

5.1.5.1. Protocolo experimental

Se hicieron películas delgadas de solución, con cloroformo como solvente, y fueron calentadas hasta 200 °C, permaneciendo 3 minutos a esta temperatura, y enfriadas a 30 °C a una tasa de 10 °C/min con una platina de calentamiento FP82HT y controlador FP90 de Mettler Toledo (Columbus OH, EUA). Las películas se observaron con un microscopio óptico Eclipse E600 de Nikon Instruments (Melville NY, USA) con polarizadores cruzados y una cámara digital Motic 2.0 (Motic, China).

5.1.5.2. Resultados y análisis de resultados

Al observar muestras cristalizadas de PHB por medio de microscopía óptica con polarizadores cruzados, se observa que la morfología de estos es de tipo esferulita (Figura 5.10), la cual presenta una cruz “maltesa” típica de polímeros semicristalinos como polietileno (Stein, 1960). En particular los PHBs de alto peso molecular (Figuras 5.10 (b) y (d)) muestran una estructura interna de “anillo”.

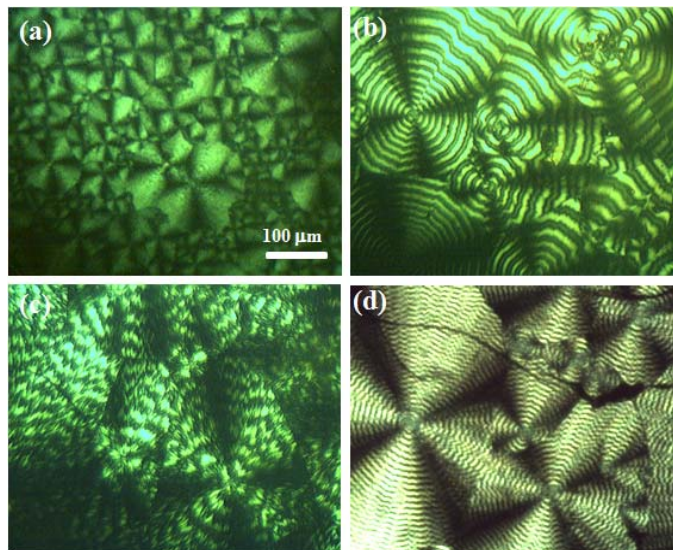


Figura 5.10. Micrografías ópticas polarizadas de películas de PHB recristalizadas: (a) 260 kDa, (b) 460 kDa, (c) 500 kDa, (d) 1400 kDa.

Se observa que para el PHB de 260 kDa (Figura 5.10 (a)) el diámetro de las esferulitas es de entre 10 y 100 μm , para las del PHB de 460 kDa (Figura 5.10 (b)) el diámetro de las esferulitas es de 300 μm , para el PHB de 1400 kDa e diámetro es de 500 μm . De esta manera se puede ver que el diámetro de las esferulitas aumenta con el aumento del peso molecular de los PHBs.

5.1.6. Dispersión de luz a ángulo pequeño

Los patrones de dispersión de luz a ángulo pequeño pueden indicarnos la estructura y la orientación de polímeros.

5.1.6.1. Protocolo experimenta

Se obtuvieron patrones de dispersión de luz a ángulo pequeño (SALS) por medio de un laser He-Ne (con longitud de onda $\lambda = 632.8 \text{ nm}$), modelo 1500 manufacturado por JDS Uniphase Corp., Santa Rosa CA, EUA). El haz del láser fue colimado usando colimadores circulares. Los patrones de SALS in polarización H_v y grabados con un dispositivo CCD, modelo PC-23C (Super Circuits, Taiwan), a una resolución de 200 $\mu\text{m}/\text{pixel}$.

5.1.6.2. Resultados y análisis de resultados

Los patrones de las películas recristalizadas de PHB de 260 kDa (Figura 5.11 (a)) y 460 kDa (Figura 5.11 (c)) fueron analizados por medio de dispersión de luz a ángulo pequeño (SALS).

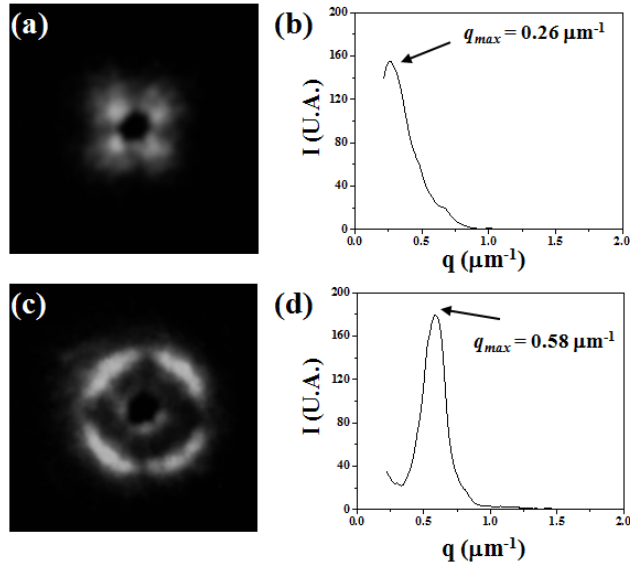


Figura 5.11. Patrones de dispersión de luz a ángulo pequeño (SALS) de PHBs de (a) 260 kDa y (b) 460 kDa.

El patrón de SALS del PHB de 260 kDa muestra una morfología de “trébol de cuatro hojas” con una intensidad máxima en el ángulo acimutal de $\phi = 45^\circ$ con respecto a la dirección vertical de la muestra, y presenta microestructura de esferulita la cual es típica de polímeros semicristalinos (Stein, 1960; Stein, 1964), como se vio por medio de microscopía óptica con polarizadores cruzados. Se graficó la intensidad extraída de patrones 2D de SALS (Figura 5.11 (b) y (c)) en función de la magnitud del vector de dispersión $|\vec{q}| = q$ (ecuación 5.3).

$$q = \frac{4\pi \cdot \text{sen}\theta}{\lambda} \quad (5.3)$$

La intensidad llega hasta un máximo de $q_{max} = 0.26 \mu m^{-1}$ y entonces decae monótonamente. De acuerdo a la teoría de Stein (Stein, 1960), para la dispersión de ángulo pequeño de polímeros esferulíticos, la posición de los máximos de los patrones que presentan la forma de “trébol de cuatro hojas” es una medida del radio de las esferulitas, la cual se puede obtener de la ecuación 5.4.

$$\bar{R} = \frac{3.9}{q_{max}} \quad (5.4)$$

Se encontró que el radio promedio de esferulitas para el PHB de 260 kDa fue de 15 μm , es decir que el diámetro es de 30 μm , lo cual corresponde a lo determinado por medio de microscopía óptica con polarizadores cruzados (POM por sus siglas en inglés de *Polarized Optical Microscopy*) (Figura 5.10).

El patrón de SALS de 460 kDa (Figura 5.11 (c)) muestra que el diámetro de esferulita es mayor que para 260 kDa. Además de esto se puede ver que la estructura interna de las esferulitas es de “anillo”. El patrón es anisotrópico y presenta cuatro reflexiones arqueadas con una dispersión máxima posicionada en el eje azimutal a 45° para las direcciones de polarización indicativas de morfología esferulítica no deformada. Stein et al. muestran que las estructuras tipo “anillo” surgen de la orientación radialmente periódica de cristales dentro de las esferulitas (Stein, 1960; Stein, 1964). La propagación acimutal de las reflexiones es indicativa de la morfología cristalina imperfecta de la muestra. El barrido de intensidad radial del PHB de 460 kDa (figura 5.12 (d)) obtenido a lo largo de la dirección de polarización de 45°, es decir a través de los máximos de intensidad, muestra que la intensidad máxima es $q_{max} = 0.58 \mu\text{m}^{-1}$. Lo cual concuerda con la predicción de la teoría de Stein et al. (Stein, 1960; Stein, 1964) sobre un máximo de dispersión y muestran que el espacio promedio del anillo (d_{ring}) puede ser obtenido desde la posición de la máxima reflexión del vector de dispersión q por medio de la ecuación 5.5.

$$d_{ring} = \frac{4 \cdot \pi}{q_{max}} \quad (5.5)$$

De esta manera se obtuvo un espacio de anillo promedio de 21.7 μm para el PHB de 460 kDa, lo cual es comprobado observando el espacio real de la micrografía de POM (Figura 5.10 (b)).

5.1.7. Propiedades mecánicas de los PHBs

Para obtener el módulo de Young de los PHB se utilizó el tensiómetro digital (sección 3). Esta propiedad de películas de PHB se utilizó posteriormente por medio de la ecuación 4.20 (que se discutió en la sección 4 de la presente tesis), para obtener el ángulo de contacto teórico de andamios de PHB.

5.1.7.1. Protocolo experimental

Las propiedades mecánicas de películas de PHB fueron probadas en deformación uniaxial a 5 mm/min, en un TST-350 mini-tensiómetro manufacturado por Linkan Scientific Instruments (Tadworth, Surrey, Inglaterra). Se realizaron 5 mediciones por muestra a temperatura ambiente, usando una muestra nueva cada vez y se reportó el promedio de las pruebas. El Módulo de Young (E) fue obtenido del régimen lineal elástico en las curvas de tensión-deformación.

5.1.7.2. Resultados y análisis de resultados

El Módulo de Young (E) (cuadros oscuros de la figura 5.12) crece como función del peso molecular del PHB, excepto para las muestras de mayor peso molecular (1660 kDa y 2030 kDa). Además se puede observar que existe una correlación entre los datos del módulo mecánico con el grado de cristalinidad (círculos vacíos de la figura 5.12), determinado de los valores de entalpía de fusión por medio de la ecuación 5.2. Al parecer los cristales presentes en los PHBs actúan como reforzantes, por lo cual el módulo de Young aumenta al aumentar el grado de cristalinidad, a excepción de los PHBs de 1660 kDa y 2030 kDa en los cuales existen más regiones amorfas (debido al menor grado de cristalinidad) por lo cual en esos casos el Módulo de Young disminuye significativamente.

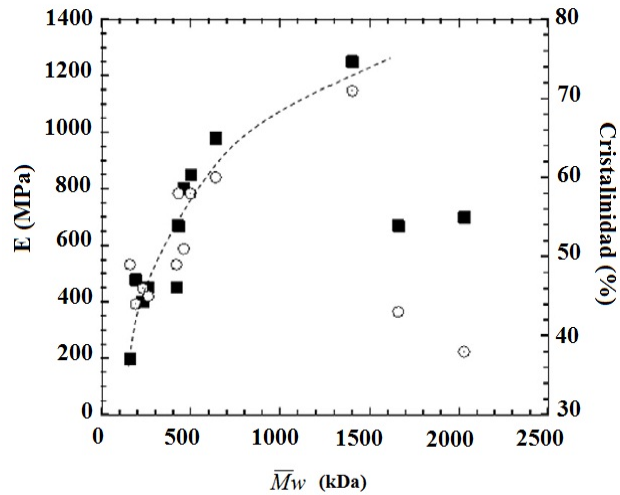


Figura 5.12. Módulo de Young E (■) y grado de cristalinidad χ (○) como función del peso molecular de los PHBs.

Sin embargo, al graficar la deformación a la fractura (ϵ_f) en función de la variación del peso molecular de los PHBs (Figura 5.13), se puede ver que los PHBs son quebradizos, con deformaciones a la fractura que van desde 2 % en los PHBs de bajo peso molecular, hasta 1.6 % de deformación para los PHBs de alto peso molecular. El alto grado de cristalinidad es una causa de la fragilidad de los PHBs, pero no es el único mecanismo que afecta a esta. Por ejemplo, el polietileno teraftalato (PET) no orientado es relativamente frágil, pero se vuelve duro y dúctil con pequeñas cantidades de orientación molecular (Stearne et al., 1969). Por otra parte, los polímeros altamente cristalinos (como pueden ser las poliolefinas estereo regulares no ramificadas) pueden ser razonablemente dúctiles en algunas formas de procesado (Albertsson, 2004). De esta manera, a pesar de que a mayor peso molecular tenemos PHBs con mayor Módulo de Young también presentan mayor fragilidad.

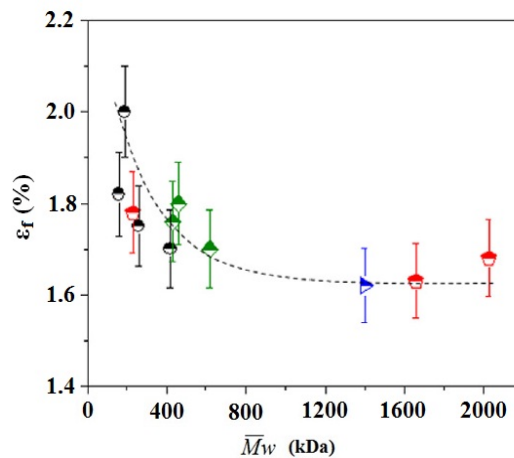


Figura 5.13. Deformación a la fractura ϵ_f como función del peso molecular de los PHBs.

5.1.8. Medición de ángulo de contacto

El ángulo de contacto obtenido de películas de la serie de PHBs se utilizó posteriormente para calcular el ángulo de contacto de andamios, obtenidos por medio electrohilado, utilizando la ecuación 4.23 (del capítulo 4 de la presente tesis).

5.1.8.1. Protocolo experimental

La medición de ángulo de contacto de una gota de agua sobre películas de PHB fue realizada por medio de la técnica de la gota sésil, utilizando un microscopio digital con cámara incluida de la marca MicroView®, con magnificación máxima de 800X y 2.0 MP. Se utilizó agua destilada para las pruebas, con un volumen de gota de 1 μ L (utilizando una micropipeta para depositarla). Las medidas se repitieron 5 veces para realizar un promedio de los resultados.

5.1.8.2. Resultados y análisis de resultados

Al medir el ángulo de contacto de una gota de agua destilada sobre los PHBs (Figura 5.14) se encontró que los PHBs de bajo peso molecular tienen un ángulo de contacto mayor, llegando hasta un ángulo de 110° para el caso del PHB de 160 kDa, lo cual indica que estos PHBs son predominantemente hidrofóbicos. Sin embargo la mayoría de los PHBs presentaron un comportamiento hidrofílico (menor de 90°).

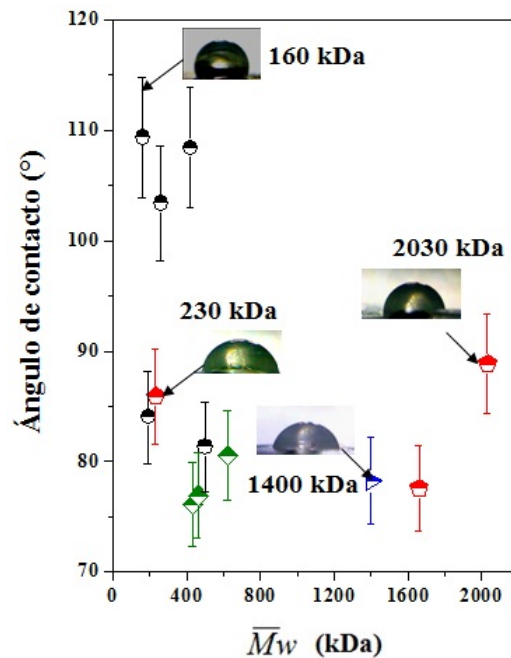


Figura 5.14. Ángulo de contacto de los PHBs de origen bacteriano.

Se propone que la morfología inducida por la técnica de deposición de las películas, es decir por medio de evaporación del disolvente, es responsable de la humectación de los PHBs. En los PHBs que tienen un peso molecular bajo el disolvente se evaporaría mucho más rápido, produciendo defectos superficiales (como microhuecos) que causarían ángulos de contacto mayores. Para probar lo anterior se tomaron imágenes de SEM (Figura 5.15) a los PHBs de 160 kDa (Figura 5.15 (a)), 500 kDa (Figura 5.15 (b)) y 1660 kDa (Figura 5.15 (c)). En el caso de la muestra de PHB de 160 kDa se puede observar una morfología porosa, mientras que

en el de 1660 kDa no se observan microhuecos. Este efecto de disminución de los microhuecos hace que el ángulo de contacto de los materiales disminuya de 110° (PHB de 160 kDa) hasta aproximadamente 75° (PHB de 1660 kDa).

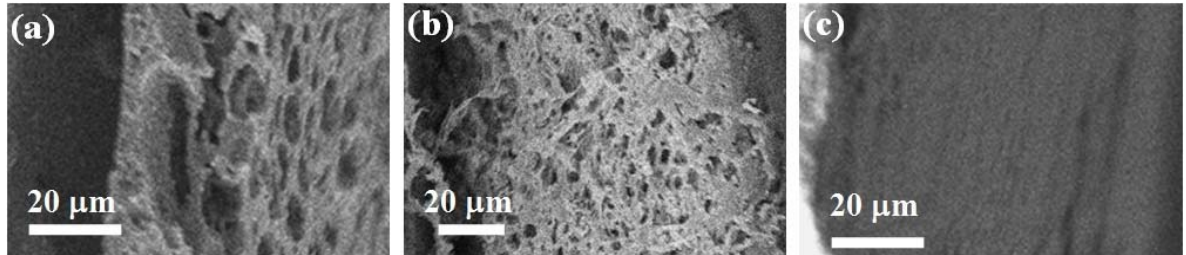


Figura 5.15. Morfología de PHBs vistos por medio de SEM de (a) 160 kDa, (b) 500 kDa y (c) 1660 kDa.

5.1.9. PHB elegido

Todos los PHBs presentan la misma composición química, sin trazas de compuestos diferentes a los que normalmente deberían encontrarse en ellos. Los PHBs de bajo peso molecular son más estables térmicamente (presentando estabilidad a 225 °C aproximadamente), siendo su temperatura de degradación de 250 °C y disminuyendo la estabilidad térmica con el aumento de peso molecular. Las temperaturas de fusión de los PHBs son mayores a menor peso molecular (aproximadamente de 174 °C), mientras que en el caso de los PHBs de más alto peso molecular (1660 kDa y 2030 kDa) la temperatura de fusión es de 150 °C. Los PHBs de peso molecular bajo cristalizan a mayor temperatura, aproximadamente de 105 °C contra la temperatura de 55 °C en el caso de los de más alto peso molecular. Los PHBs de menos de 300 kDa presentan Módulos de Young menores a 500 MPa, condición que estamos buscando para aplicar el material en cultivo de osteoblastos, y cristalinidades de menos del 50% lo cual hace al material menos rígido. La

deformación a la fractura es mayor para los PHBs de menor peso molecular. Entre los PHBs de menor peso molecular encontramos que los que tienen menor ángulo de contacto son los de 190 y 230 kDa, con ángulos de contacto de aproximadamente 86° , presentando mayor hidrofiliidad lo cual es una condición deseada para su aplicación en cultivo de células. A pesar de que los PHBs entre 400 y 1700 kDa presentan ángulos de contacto menores a 85° presentan módulos de Young de más de 500 MPa y menor deformación a la rotura que los de menor peso molecular. Ya que necesitamos un material que resista la temperatura de esterilización por auto clave (aproximadamente 120°C) sin deformarse y que tenga las propiedades para cultivo de osteoblastos se decidió utilizar el PHB de 230 kDa para hacer los andamios. No se eligió el PHB de 190 kDa ya que el módulo de Young de este es de 200 MPa contra los 400 MPa para el de 230 kDa y se desea que al electrohilar el material el módulo de Young se mantenga entre 100 y 500 MPa, lo cual restringe el rango de aplicación del PHB de 190 MPa puesto que en bulto tiene aproximadamente 200 MPa (valor casi en el límite de los rangos requeridos para cultivo de osteoblastos). A continuación se presentan los resultados de la optimización de andamios para cultivo de osteoblastos, aplicando el modelo de optimización presentado de manera general en la sección 3.2.2. y posteriormente generados por medio de un Algoritmo Genético para maximizar el crecimiento de osteoblastos en andamios de PHB.

5.2. Optimización de andamios para crecimiento de osteoblastos

Para realizar la optimización de un material para un propósito específico se puede realizar un proceso de prueba y error. Sin embargo, en diversas aplicaciones el costo de realizar un barrido de parámetros experimentales numerosos es muy alto, por lo cual los métodos computacionales de optimización nos ofrecen la posibilidad de diseñar los materiales de manera guiada previa a la realización física de los mismos. En especial en el cultivo de células sobre andamios los costos experimentales, así

como el cuidado requerido en las pruebas experimentales, hacen deseable contar con herramientas que nos den posibles resultados que sean más favorables de probar. Para esto podemos hacer uso de los métodos de la optimización, que se sirven, entre otras cosas, de modelos de optimización y métodos, como pueden los heurísticos, para obtener soluciones a problemas de diversas áreas. A continuación, se presenta el modelo de optimización para cultivo de células cuyo esqueleto general se explico en el capítulo 3 (sección 3.2.2.) y que en esta sección se adapta específicamente con restricciones para crecimiento de osteoblastos.

5.2.1. Modelo de optimización para crecimiento de osteoblastos

El modelo de optimización de la sección “4.2.2. Modelo de optimización para maximizar el crecimiento de células en un andamio”, fue adaptado de manera específica a las ecuaciones correspondientes para optimizar la configuración de un andamio para cultivo de osteoblastos. Además, se utilizaron específicamente ecuaciones para la obtención de los andamios por medio de la técnica de electrohilado (Ecuaciones 4.10 a 4.22).

El modelo de optimización busca maximizar el crecimiento de los osteoblastos por medio de encontrar la configuración del andamio que sea más adecuada para su crecimiento. Se desearía que dicho andamio posea la proporción más alta de cada uno de los parámetros de configuración del andamio, es decir que llegue al límite máximo permitido por cada restricción. Si esto sucedía la aptitud de dicha solución obtenida sería igual 1, que es el máximo valor de aptitud que se puede obtener. Sin embargo, el valor posible de la función objetivo se restringe ya que los parámetros correspondientes a la arquitectura del andamio, el diámetro de poro (P) y la porosidad (φ), y los parámetros correspondientes a las propiedades del andamio, el modulo de Young (E) y el ángulo de contacto (θ), presentan relaciones complejas entre ellos y esto no permitirá que se obtengan los valores máximos de todos los

parámetros de configuración a la vez. Además, dependiendo del tipo de células que se requiera utilizar las restricciones cambian sus valores y la dirección en que es mejor que crezcan dichos valores. Específicamente para los osteoblastos hay que tomar en cuenta el hecho de que no todos los parámetros deben alcanzar el máximo valor posible, sino que en el caso del diámetro de poro y del ángulo de contacto se busca que su valor sea lo más cercano posible al límite inferior de dichos parámetros y en el caso de las otras dos condiciones (porosidad y Módulo de Young) que sea lo más cercano posible al límite superior, por lo cual hay que tomar en cuenta las condiciones expresadas a continuación en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Condiciones en que mejora el crecimiento de los osteoblastos (modificado de Domínguez-Díaz & Chávez-Cruz, 2015).

Parámetros de la configuración de un andamio	Símbolo y unidades	Rango	Mejora el andamio	
			Hacia...	Debido a que...
Diámetro de poro	P (μm)	100-400	Límite inferior	El diámetro de poro es más cercano al tamaño de los osteoblastos pero no tanto como para que no se difundan a través del mismo.
Porosidad	ϕ (%)	50-90	Límite superior	A mayor porosidad del andamio existe mejor transporte de nutrientes y liberación de desechos metabólicos de las células.
Módulo de Young	E (MPa)	100-400	Límite superior	La resistencia del andamio es mayor.
Ángulo de contacto	θ ($^\circ$)	0-106	Límite inferior	Se ha observado experimentalmente que los osteoblastos mejoran su crecimiento mientras menor es el ángulo de contacto.

Considerando esto la función objetivo del problema queda representada como se puede ver en la ecuación 5.6. Mientras que las restricciones del modelo son las

mismas que los rangos presentados en la tabla 5.4, como se puede ver en las ecuaciones 5.7 a 5.10.

$$F. O. \quad \max f(P_i, \varphi_i, E_i, \theta_i) = \frac{P_i \alpha_i + \varphi_i \beta_i + E \gamma_i + \theta_i \delta_i}{4} \quad (5.6)$$

Sujeto a

$$100 \leq P \leq 400 \quad (5.7)$$

$$50 \leq \varphi_i \leq 90 \quad (5.8)$$

$$100 \leq E_i \leq 400 \quad (5.9)$$

$$0 \leq \theta_i \leq 106 \quad (5.10)$$

Donde P_i es el diámetro de poro, φ_i es la porosidad, E_i es el Módulo de Young, θ_i es el ángulo de contacto, y $\alpha_i, \beta_i, \gamma_i, \delta_i$ son valores de peso dados que confieren a determinado parámetro un valor de contribución proporcional para la aptitud de la configuración de un andamio determinado. Se considero el hecho de que el sentido del mejor valor obtenidas por las restricciones puede ser de izquierda a derecha o viceversa. Por ejemplo, para la porosidad (φ_i) sería deseable obtener un valor lo más alto posible (el mejor valor se encuentra al lado derecho de la desigualdad 4.8), para que esta tuviera mayor capacidad de transporte de nutrientes y desechos celulares, mientras que para osteoblastos el ángulo de contacto (θ_i) es mejor mientras tenga un valor más cercano a 0° (el mejor valor se encuentra al lado izquierdo de la desigualdad 5.10). Además de esto, los 4 parámetros que utilizamos para definir la configuración del andamio tienen distintas unidades por lo cual los valores de peso dados se encargan a su vez de hacer que los rangos sea ajusten a un número adimensional que va de 0 a 1 para el caso en que es mejor cuando el resultado tienda al límite superior, como es para la porosidad y el modulo de Young, mientras

que vaya de 1 a 0 para el caso en que es mejor que el resultado tienda al límite inferior, como es para el diámetro de poro y el ángulo de contacto.

Sobre el modelo de optimización propuesto, hay que recalcar que no se trata de un modelo lineal, aunque en apariencia se presente como tal. Ya que las ecuaciones que se utilizan para calcular la configuración del andamio no son lineales (ecuaciones 4.10 a 4.22 en el capítulo 4 de la presente tesis). En donde primero los parámetros de entrada de las variables correspondientes al proceso de electrohilado entran en la ecuación 4.10 para calcular el diámetro de hilo del andamio y a través de este se calcula la configuración del andamio, en donde se obtiene el diámetro de poro por medio de la ecuación ecuación 4.13, la porosidad por medio de la ecuación 4.18, el Módulo de Young por medio de la ecuación 4.19, y el ángulo de contacto por medio de la ecuación 4.22. La ecuación 4.10 es exponencial, la ecuación 4.13 tiene un componente logarítmico, la ecuación 4.18 tiene componentes exponenciales y logarítmicos, al igual que la ecuación 4.10, y la ecuación 4.22 es una función coseno inversa. Dichas ecuaciones se plantearon específicamente para obtener el andamio por medio de la técnica de electrohilado de la cual se trato en la sección 3.3.2 de la presente tesis (“Método de procesado del andamio (electrohilado)”), sin embargo podrían adaptarse ecuaciones que nos permitan obtener la configuración del andamio por medio de otras técnicas de procesado como las mencionadas en la introducción (capítulo 1) de la presente tesis.

5.2.2. Rangos e intervalos para el funcionamiento del algoritmo

Al programar el algoritmo se debe considerar diferentes rangos e intervalos en los que puede trabajar, los cuales pueden ser de dos clases: a) los medibles y realizables experimentalmente, b) los que se computaran en el programa. Estas consideraciones con respecto a los rangos pueden aplicarse a las restricciones correspondientes al modelo de optimización, que restringen las características del

andamio a ciertos parámetros de arquitectura y propiedades en los cuales se ha encontrado que existe mejor crecimiento de osteoblastos. Así mismo se debe considerar lo anterior con respecto a las variables de entrada utilizadas en la técnica de procesamiento de los andamios (en este caso el electrohilado), en los cuales hay que definir los intervalos utilizados. Para escoger los rangos de procesamiento del andamio se consideraron los recomendados en la literatura para llevar a cabo el proceso de electrohilado (Thompson et al., 2007; Bhardwaj & Kundu, 2010; Maleki et al., 2011) y cuyos intervalos programados son los presentados en la tabla 4.5. Sin embargo al obtener las soluciones del problema se deben aproximar a los valores más cercanos que se pueden generar experimentalmente con las condiciones con que cuenta el equipo de electrohilado utilizado. Esto se hace redondeando al valor que puede ser implementado experimentalmente y que sea más cercano al computado. La consideración de intervalos menores a los que se pueden realizar experimentalmente ayuda en la exploración de las soluciones del problema. Dichas soluciones del problema se pueden observar en el espacio de búsqueda del problema que se presenta más adelante en el punto “5.2.5. El espacio de búsqueda del problema”.

Tabla 5.5. Rangos e intervalos de parámetros de electrohilado considerados para implementar el algoritmo.

Parámetro de electrohilado	Símbolo y unidades	Rangos	Intervalos	
		Literatura y programados	Medible	Programado
Voltaje	V (kV)	5-30	0.5	0.01
Concentración	C (%p/vol)	1-20	0.5	0.01
Distancia	Z (cm)	5-20	0.1	0.01
Flujo	Q (ml/hr)	0.1-12	0.1	0.001

5.2.3. Algoritmo iterativo para generar las propiedades de un andamio

Un algoritmo que genere las soluciones (andamios) de manera iterativa debe calcular la arquitectura y propiedades de un cierto número de andamios, empezando desde los límites que se encuentran indicados de las restricciones a la izquierda de las inecuaciones. Hay que notar que en este punto no estamos hablando del GA, sino de cómo sería el funcionamiento de un algoritmo que genere de manera iterativa diferentes configuraciones de andamios. Este procedimiento se presenta a continuación en el pseudocódigo de la Figura 5.16.

Algoritmo iterativo para generar la configuración de un andamio

1. **Inicio**
 2. **Generación de parámetros de electrohilado empezando por los límites a la izquierda de las inecuaciones y barriendo todos los valores**
 - Voltaje
 - Concentración
 - Distancia
 - Flujo
 3. **Cálculo de diámetro de hilo**
(Ecuación 4.10, sección 4.5.1.1)
 4. **Cálculo de la arquitectura del andamio**
 - Diámetro de poro (Ecuación 4.13, sección 4.5.1.2)
 - Porosidad (Ecuación 4.19, sección 4.5.1.2)
 5. **Cálculo de las propiedades del andamio**
 - Modulo de Young (Ecuación 4.20, sección 4.5.1.3.1)
 - Ángulo de contacto (Ecuación 4.23, sección 4.5.1.3.2)
 6. **Calcular el valor de la aptitud de la solución s_l**
(Ecuación 5.6, sección 5.2.1)
 7. **Parar hasta terminar de barrer el rango de posibles soluciones**
(determinados por los rangos de la tabla 5.5)
-

Figura 5.16. Pseudocódigo general del algoritmo iterativo para calcular la configuración de un andamio.

5.2.4. Generación de soluciones de manera aleatoria

Aplicando las condiciones de las tablas 5.4 y 5.5 al algoritmo iterativo para generar la configuración de un andamio, pero tomando valores de las condiciones de electrohilado de manera aleatoria, se generó el programa para producir soluciones iniciales. Dicho programa generador de soluciones iniciales se utiliza más adelante como base para obtener la población inicial del Algoritmo Genético. Además manteniendo constantes 2 parámetros de electrohilado y generando de manera aleatoria 2 más, se puede utilizar este algoritmo para comprobar si el comportamiento de las propiedades de los andamios corresponde a lo que se espera según la literatura. Se deben probar si los resultados que generan la configuración del andamio muestran comportamientos esperados según la literatura ya que, de no hacerlo, se puede incurrir en errores de llegar a programar un GA que funciona de manera adecuada pero que genera resultados que no nos servirán realmente. Es por esto que en los siguientes puntos se analizó que los parámetros de procesamiento generen diámetros de hilo acordes a lo que la literatura muestra (sección 5.2.4.1), así como algunos parámetros de la arquitectura del andamio afectan a las propiedades (sección 5.2.4.2). Estos resultados que se presentan a continuación son teóricos.

5.2.4.1. Relación entre los parámetros de procesamiento y el diámetro de hilo obtenido

Al mantener constante la distancia entre la punta de la aguja y la pantalla colectora en 5 cm (Figura 5.17), y con dos casos a diferentes concentraciones de la solución polimérica, en este caso de 1 % peso/volumen (Figura 5.17 (a)) y 5 % peso/volumen (Figura 5.17 (b)), y generando de manera aleatoria los parámetros de electrohilado de voltaje y flujo (con los rangos de la tabla 5.5), se observa que el diámetro de hilo obtenido por medio del programa de generación de soluciones corresponde a las tendencias esperadas y reportadas en la literatura para diferentes polímeros. La figura 5.17 muestra el resultado de 100 soluciones, en las cuales se

puede observar, que con distancias y flujos constantes, al aumentar el flujo (Q) el diámetro de hilo aumenta, mientras que al aumentar el voltaje aplicado (V) el diámetro de hilo disminuye.

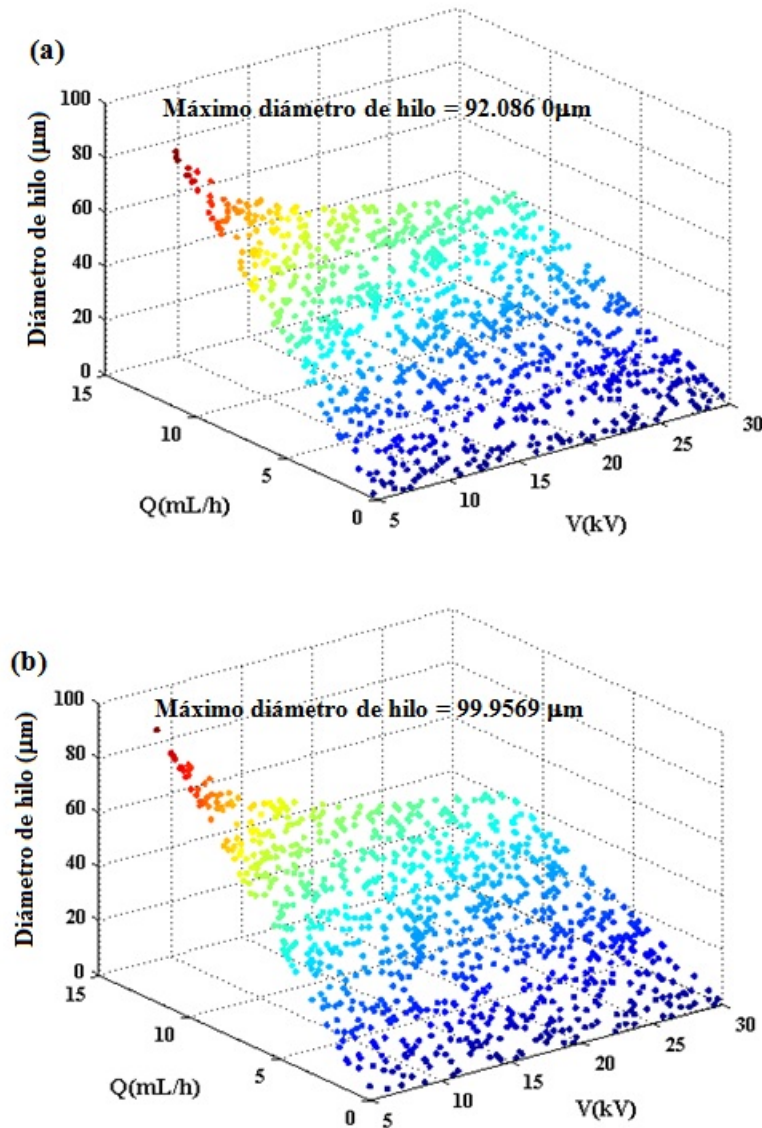


Figura 5.17. Cambio del diámetro de hilo de 100 soluciones a 5 cm de distancia y concentraciones de (a) 1 % peso/volumen, (b) 5% peso/volumen, con los parámetros de electrohilado de flujo (Q) y voltaje (V) generados de manera aleatoria.

De las 100 soluciones teóricas generadas de manera aleatoria con una distancia de 5 cm y flujo de 1 % peso/volumen el diámetro de hilo más grande fue de aproximadamente 92 micras. Mientras tanto para una distancia de 5 cm y flujo de 5 % peso/volumen el diámetro de hilo teórico más grande fue de aproximadamente 100 micras. De esta manera se ve que al aumentar la concentración de la solución polimérica el diámetro de hilo aumenta. Entonces el comportamiento modelado por el algoritmo es correspondiente a lo que se espera, ya que se conoce que a mayor voltaje aplicado se obtienen hilos más delgados, así como también a mayor flujo, mayor distancia entre la punta de la aguja y la pantalla colectora, y mayor concentración (Cramariuc et al., 2013). Por ejemplo en un PHB de 922 kDa, con parámetros de electrohilado de voltaje de 30 kDa, flujo de 5 ml/hr, distancia de 15 cm y concentraciones de 2 a 8 % en peso los diámetros de hilo incrementan de 0.45 a 3.14 μm al aumentar la concentración (Volova et al., 2014).

5.2.4.2. Relación entre la arquitectura y propiedades del andamio

La relación entre la arquitectura y propiedades del andamio se puede ver claramente en el caso del diámetro de hilo, el cual afecta el diámetro de poro (Figura 5.18 (a)), ya que ha sido reportado que a mayores diámetros de hilo los diámetros de poro aumentan (Volova et al., 2014). A su vez el diámetro de poro afecta la porosidad del material (Figura 5.19 (b)), aumentando la misma (Tai et al., 2007). En la figura 5.18 tenemos representadas 100 soluciones (andamios) generadas de manera aleatoria.

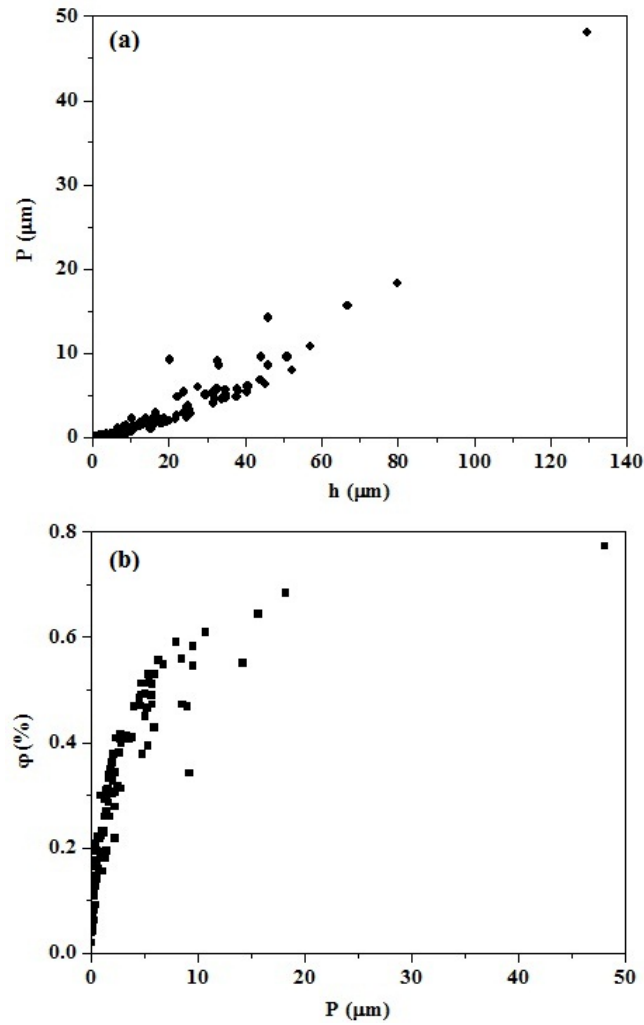


Figura 5.18. Relación de (a) el diámetro de poro contra el diámetro de hilo, (b) la porosidad contra el diámetro de poro.

5.2.5. El espacio de búsqueda del problema

Para visualizar el espacio de búsqueda del problema debemos representar las soluciones de manera que en dicha representación estén presentes las variables de entrada del problema y la capacidad de las soluciones para resolver el problema. En algunos problemas la capacidad que tienen las soluciones es llamada costo de la

función objetivo del problema, mientras que en el caso de métodos evolutivos es llamada aptitud.

En la presente tesis utilizamos un algoritmo genético en el cual trabajamos con la aptitud de individuos que se encuentran en poblaciones, por lo cual para representar el espacio de búsqueda en 3 dimensiones utilizaremos 2 variables de entrada que generen el individuo, las cuales representaremos en los ejes X y Y , mientras que en el eje Z colocaremos la aptitud de las soluciones (individuos) del problema. Debido a que en este problema tenemos más de dos variables de entrada para obtener una solución escogeremos solamente 2 de ellas, que son variables que intervienen en el proceso de producción de los andamios por medio de la técnica de electrohilado. En este caso utilizaremos las variables de electrohilado de voltaje (V) y flujo (Q).

Para poder obtener las soluciones que integraran nuestra representación del espacio de búsqueda se generaron 100,000 soluciones de manera aleatoria y se calculo la aptitud correspondiente a cada una de ellas para poder obtener la Figura 5.20. El espacio de búsqueda del problema (Figura 5.20) nos muestra que el mayor número de soluciones (generadas de manera aleatoria) son las que tienen la peor aptitud (área (a) indicada en la figura 5.20), mientras que las mejores soluciones, en esta muestra de 100000 mil soluciones, son pocas (área (b) en la figura 5.19).

Al observar el espacio de soluciones del problema se podría pensar que el “landscape” presenta un comportamiento suave y por lo tanto el espacio no sea de difícil exploración. Sin embargo la representación del espacio de búsqueda es diferente a problemas como el agente viajero (Garey & Johnson, 1979), en el cual tenemos simas y valles. Lo anterior es debido a que en la manera en que estamos representando nuestro problema requeriría graficar las cuatro variables de entrada (parámetros de procesado) y la aptitud (obtenida por medio de la F.O. de la ecuación 5.6) de manera simultánea para observar la variación de máximos y mínimos (simas y valles observados en el landscape).

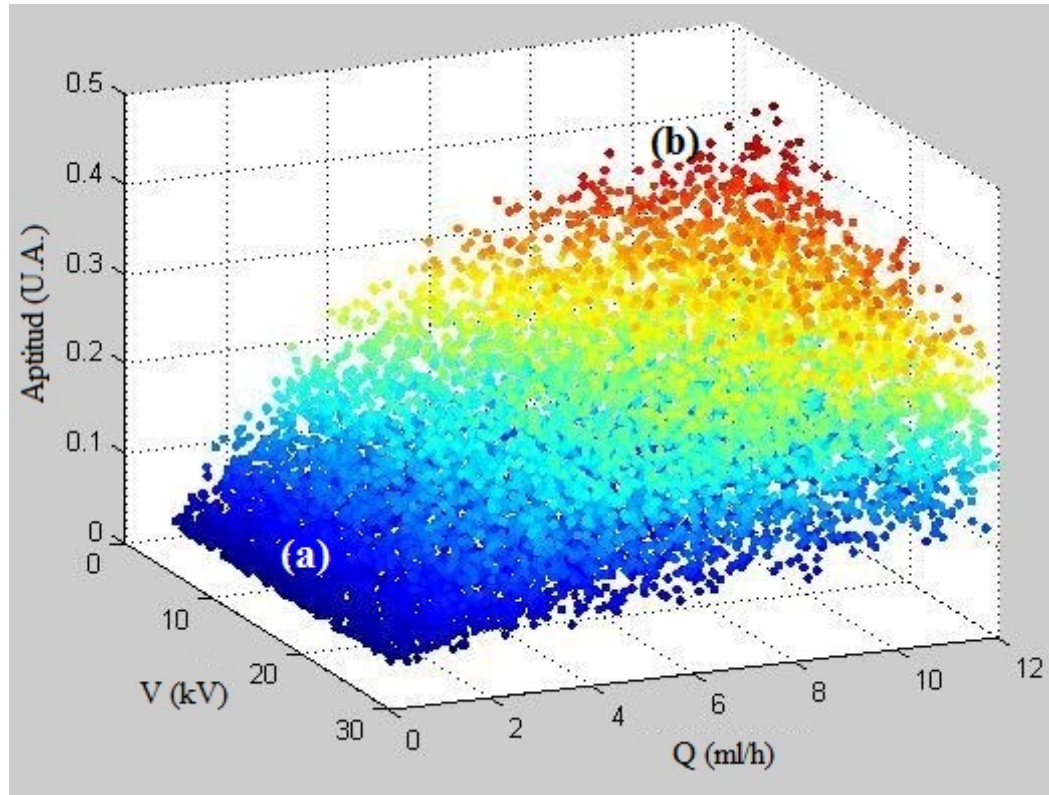


Figura 5.19. Espacio de búsqueda del problema con 100000 soluciones aleatorias.

Cuando restringimos los parámetros del espacio de búsqueda por ejemplo a concentración de 5 % peso/volumen, distancia de 10 cm (Figura 5.20) y voltaje y flujo aleatorios, podemos apreciar más el hecho de que el que el espacio presenta buenas soluciones en diferentes zonas (círculos rojos de la figura 5.20), las cuales corresponderían a simas si contáramos solo con 2 variables de entrada para representar el espacio de búsqueda.

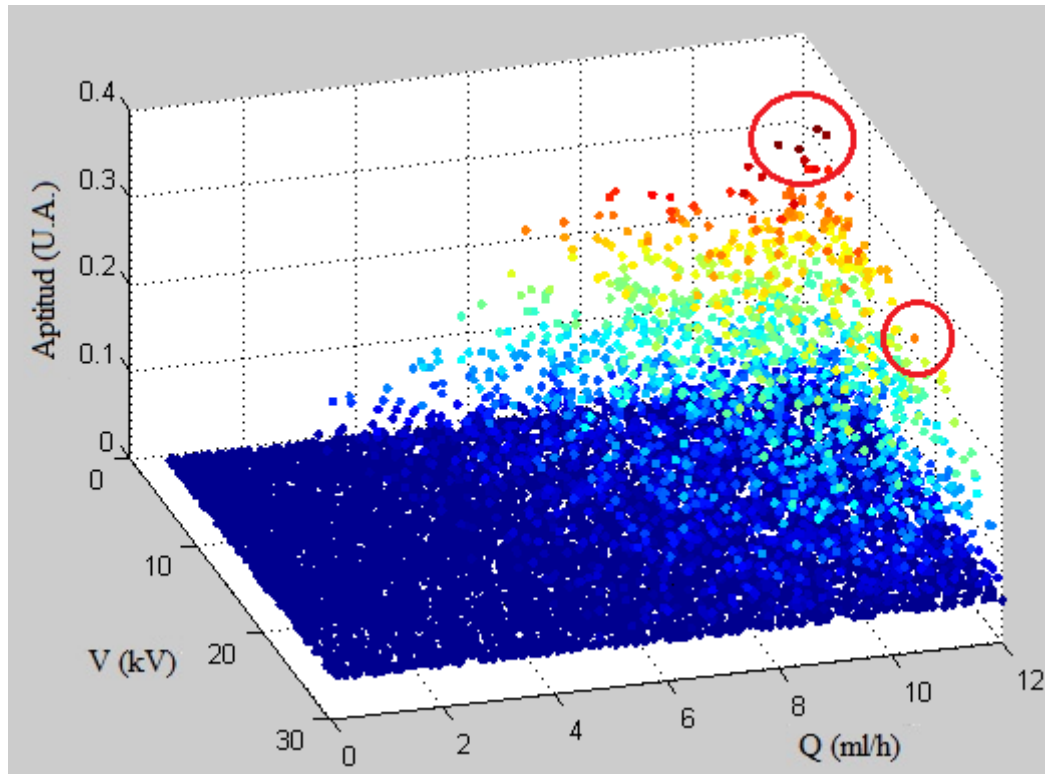


Figura 5.20. Espacio de búsqueda del problema con 10000 soluciones aleatorias, donde las áreas marcadas en rojo indican máximos encontrados en el “landscape”.

5.2.6. Algoritmo Genético (GA)

El esquema general del Algoritmo Genético se encuentra en la Figura 5.21, el cual consta de los siguientes pasos:

1. Dependiendo del polímero que se requiera utilizar se deben guardar los parámetros bases de dicho material, como son el Módulo de Young y el ángulo de contacto del material base del que están hechos.
2. Se inicializa el número de individuos con cero.

3. Se generan de manera aleatoria los parámetros de electrohilado según los rangos de la tabla 5.5, para calcular la arquitectura, propiedades y aptitud de los individuos con respecto a las ecuaciones anteriormente mencionadas en el pseudocódigo de la figura 5.16.
4. Se llena un número determinado de individuos (n) en la población inicial.
5. Se realiza el proceso de creación de nuevos individuos con los operadores genéticos de selección, cruzamiento, mutación y copia, de manera como se indico en la sección de la presente tesis “4.4.2. Diseño de los operadores genéticos”.
6. A cada individuo que es cambiado por la interacción con uno de los operadores genéticos, a excepción de la copia, se le debe calcular nuevamente la arquitectura, propiedades y aptitud, debido a que los parámetros de entrada (del proceso de electrohilado) han sido modificados, y se genera la nueva población.
7. Además, se procede a comparar cada individuo generado y se guarda en un archivo aparte el mejor individuo de cada generación, de manera que se pueda analizar el comportamiento que está presentando nuestro algoritmo.
8. El proceso de creación de nuevos individuos se repite hasta que se llega a un número (m) dado (el cual se decidirá por medio del análisis de sensibilidad de los parámetros del GA al igual que en el caso del número de individuos n que constituyen la población inicial). Este número m es el criterio de paro (o de terminación).
9. Cuando se llega al criterio de paro m se imprime la mejor solución. Además, en nuestro caso también se obtendrán una solución intermedia y una peor, para poder compararlas de manera experimental realizando cultivo celular con osteoblastos.

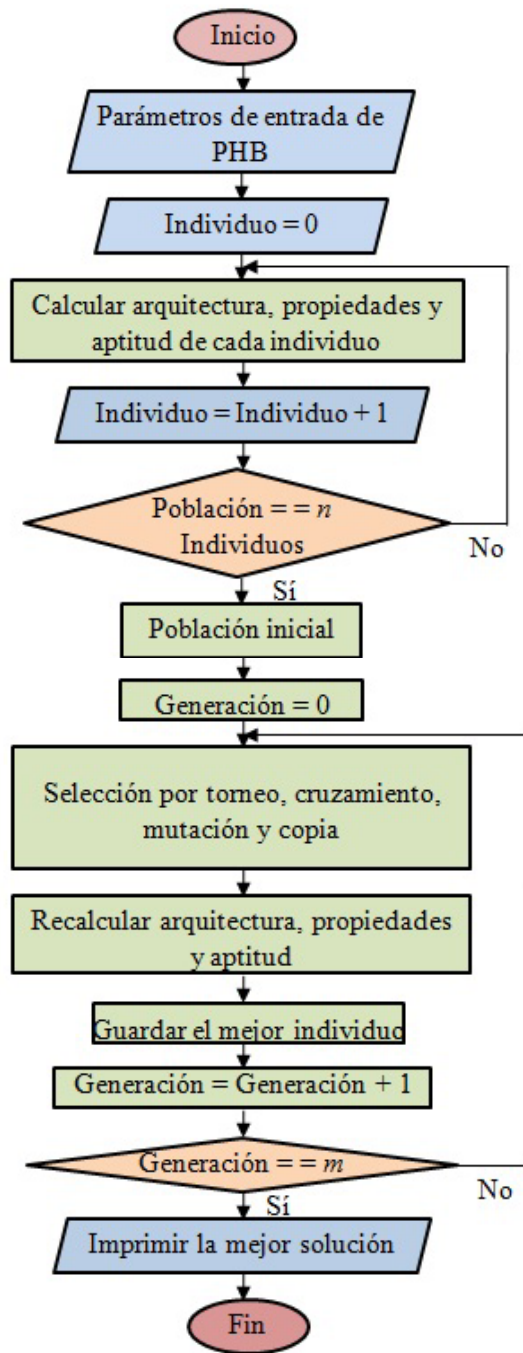


Figura 5.21. Funcionamiento básico del Algoritmo Genético para buscar la mejor configuración de un andamio para cultivo de osteoblastos.

5.2.7. Análisis de sensibilidad del GA

Se realizó el análisis de sensibilidad del algoritmo para determinar las condiciones en que el presenta mejor desempeño. Para esto (como se vio en la sección “3.3.1.2. Análisis de sensibilidad del algoritmo” de la presente tesis) primero se requiere seleccionar los parámetros de control a sintonizar, establecer los rangos y los intervalos de evaluación, lo cual se explica a continuación.

5.2.7.1. Condiciones de realización del análisis de sensibilidad del GA

A continuación se presentan las condiciones por medio de las cuales se llevo a cabo el análisis de sensibilidad del GA. De manera que al realizarse un estudio posterior que tome con base este trabajo se consideren los parámetros de control del GA, la arquitectura computacional y el lenguaje de programación utilizado, así como el proceso de sintonización que se llevo a cabo. Así se puede comparar un estudio posterior de manera más adecuada, ya que existen diferentes trabajos en los cuales no se contemplan estos datos y dificulta al lector la comprensión de las diferencias y de las mejoras que se hayan podido realizar.

5.2.7.1.1. Parámetros de control del GA

Los parámetros a sintonizar para este algoritmo son el tamaño de la población (Tp), la probabilidad de cruzamiento los dos tipos de cruzamiento utilizados ($Pc1$ y $Pc2$), la probabilidad de mutación (Pm) y el máximo número de generaciones ($MaxGen$). La muestra de la selección se mantuvo constante con $p = 2$, por lo cual no se sintonizo. En la Tabla 5.6, se muestran los rangos utilizados para las pruebas de sintonización de los parámetros mencionados, así como el valor mínimo, el valor máximo y los incrementos en que se exploraran dichos parámetros.

Tabla 5.6. Parámetros, rangos e intervalos a sintonizar del Algoritmo Genético.

Parámetro	Mínimo	Máximo	Incremento
<i>Pc1</i> (probabilidad de cruzamiento 1)	10	80	10
<i>Pc2</i> (probabilidad de cruzamiento 2)	10	80	10
<i>Pm</i> (probabilidad de mutación)	10	30	10
<i>Tp</i> (número de individuos)	100	1000	100
<i>MáxGen</i> (número de generaciones)	100	1000	100

Los rangos de los dos tipos de cruzamiento utilizados van de 10 a 80 %, debido a que se espera que juntos como máximo generen el 80% de la nueva población. Esto es debido a que más del 70% de la nueva población suele ser generada usando el mecanismo de cruzamiento (Kicinger *et al.*, 2005). Es por esto que se dio la condición de que la suma de ambos cruzamientos no superen el 80%.

Los rangos de mutación van de 10 a 30 % ya que en un GA se utilizan tasas de mutación pequeñas. Esto es debido a que en la literatura existen estudios en que se encontró que las tasas de mutación que generan mejores resultados para un GA son pequeñas (De Falco *et al.*, 2002).

El tamaño de la población es un parámetro crítico en un GA, si el tamaño de la población es demasiado pequeño el usuario paga una penalización en la calidad de la solución (el algoritmo converge a soluciones pobres), mientras que si es demasiado grande el usuario paga una penalización de tiempo (uso innecesario de recursos computacionales) (Lobo *et al.*, 2004), como se puede ver representado en la figura 5.22. Debido a lo anterior es necesario realizar experimentos con un número de diferentes tamaños de población y ver cual funciona mejor. Por lo cual en nuestro caso utilizamos rangos de *Tp* entre 100 y 1000, para identificar cual sería el tamaño de población óptimo. De igual manera el máximo número de generaciones debe ser sintonizado, por lo cual se trabajo con un rango de 100 a 1000 generaciones, para encontrar la mejor condición.

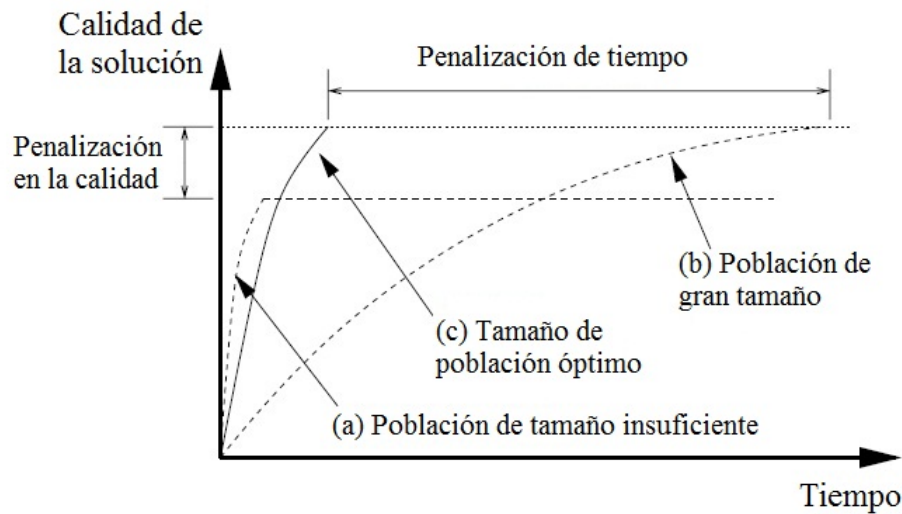


Figura 5.22. El tamaño de la población en los algoritmos genéticos, (a) demasiado pequeña y el usuario paga una multa de calidad, (b) demasiado grande y el usuario paga una penalización de tiempo, (c) tamaño óptimo de la población (modificado de Lobo *et al.*, 2004).

5.2.7.1.2. Arquitectura computacional y lenguaje de programación

La arquitectura computacional utilizada en la presente tesis doctoral para fue una computadora Intel Celeron 925, con 3 GB de memoria RAM, velocidad de procesador de 2.30 GHz y con Sistema Operativo Windows 7. El lenguaje de programación utilizado fue ANSI C.

5.2.7.1.3. Proceso de sintonización del GA

La sintonización de los parámetros de control del GA se comenzó con una población de 1000 individuos y 1000 generaciones. Empezamos sintonizando el porcentaje del primer cruzamiento ($Pc1$), con un porcentaje de 10 % (el valor mínimo de la tabla 5.6 para el primer tipo de cruzamiento) hasta llegar a 80 % de cruzamiento con un intervalo de 10 (valor máximo e intervalo para el primer tipo de cruzamiento)

y se evalúa el valor de la función objetivo (F.O.) en todas las posibles combinaciones con $Pc2$ y Pm . Se procede de igual forma para cada valor diferente de los parámetros de control el algoritmo (realizando todas las permutaciones de los parámetros) y se deben ejecutar cada una de las condiciones 30 veces. Una vez sintonizado un parámetro de control se pasa al siguiente y así hasta terminar de sintonizar todos los parámetros, para finalmente volver a sintonizar los parámetros juntos con el valor de población inicial y número de generaciones sintonizados. A continuación se presentan los resultados de la sintonización de los parámetros de control del algoritmo (Figuras 5.23 a 5.27) donde se observa cuales son los mejores resultados obtenidos para la Función Objetivo.

5.2.7.2. Resultados del análisis de sensibilidad del GA

Al realizar la sintonización del primer tipo de cruzamiento ($Pc1$), el cual es un cruzamiento elitista, se aprecia que al aumentar el porcentaje de $Pc1$ de 10 a 80 %, a un mismo porcentaje de cruzamiento $Pc2$ (cruzamiento aleatorio) y con mutación (Pm) de 10 % la aptitud disminuye con el aumento de $Pc2$ más allá del 30%, como se puede ver en la figura 4.24. Sin embargo no se debe restringir $Pc2$ sino más bien conseguir un balance entre $Pc1$ y $Pc2$, ya que en la figura 4.24(e) con 10 % de $Pc1$ y $Pc2$ se observa el mismo resultado de aptitud que en la figura esto puede ser debido a que al aumentar $Pc1$ la aptitud se va aumentando de manera significativa en las primeras generaciones pero en generaciones posteriores esto genera problemas con la diversidad de la población, ya que se incluyen menos individuos con baja aptitud, y dificulta lograr por medio de ellos el proceso de la construcción de mejores soluciones. Con los porcentajes de cruzamientos y mutación mostradas en el caso de la figura 5.23 el mejor resultado se obtuvo con 10 % de $Pc1$, 50 % de $Pc2$ y 10 % de Pm .

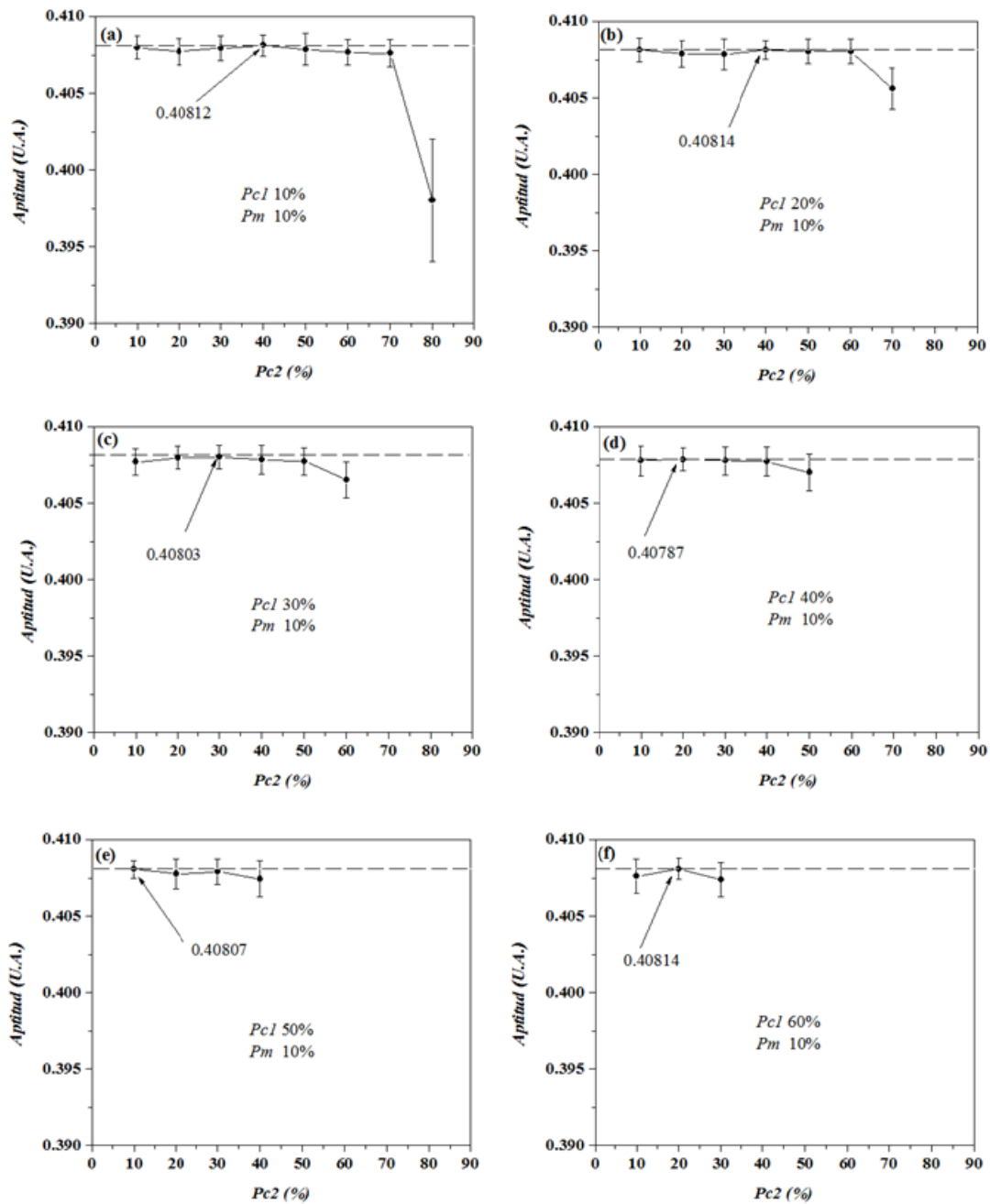


Figura 5.23. Aptitud del primer tipo de cruzamiento (*Pc1*) con el segundo tipo de cruzamiento (*Pc2*) a (a) 10 %, (b) 20 %, (c) 30 %, (d) 40 %, (e) 50 %, (f) 60 %, y con mutación del 10%.

Por otra parte al aumentar el porcentaje de cruzamiento $Pc2$ de 10 a 80 % y a un determinado porcentaje de cruzamiento $Pc1$ (Figura 5.24), se tienen los mejores resultados a 40 % de $Pc2$ y 20 % de $Pc1$.

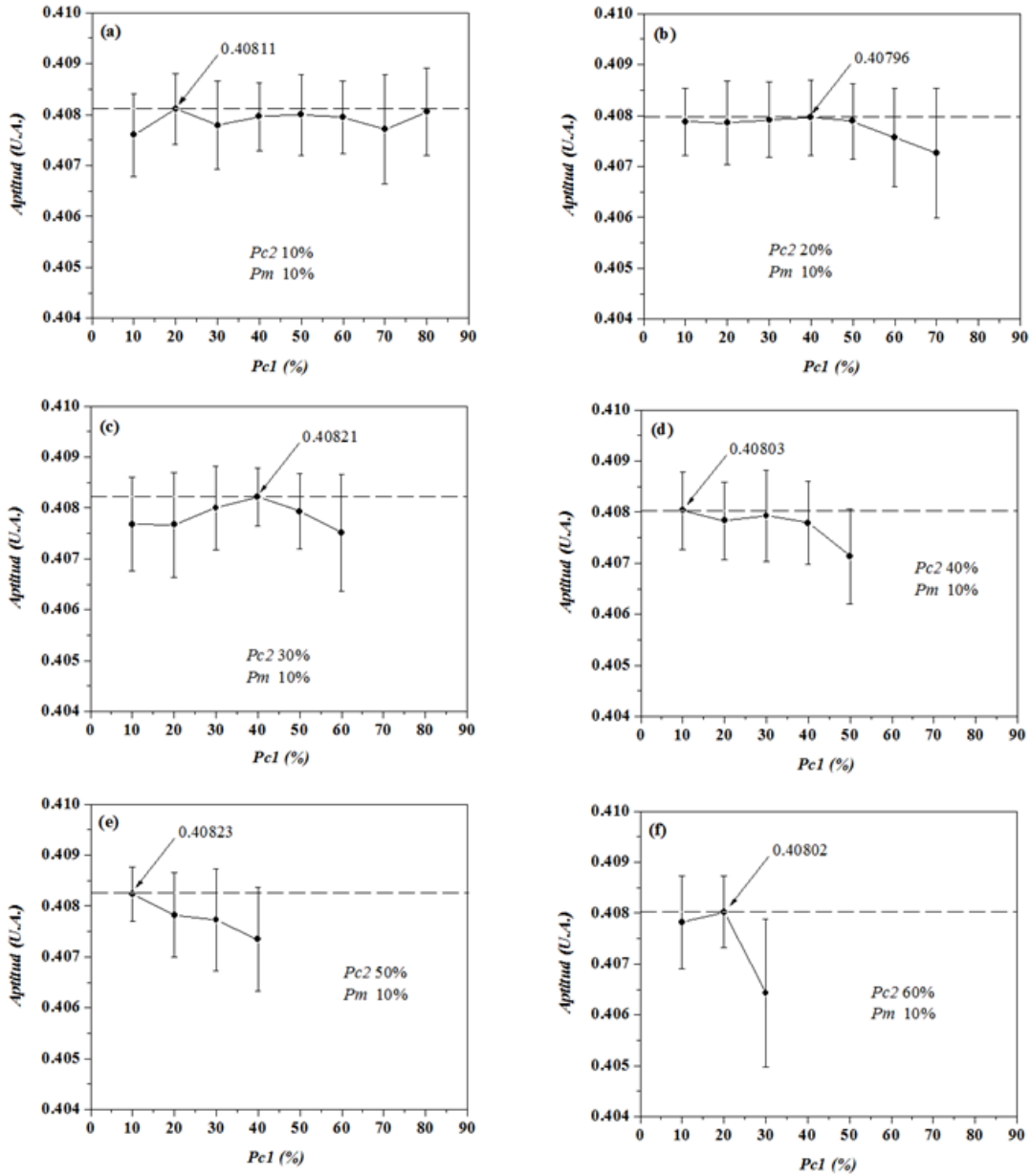


Figura 5.24. Aptitud del segundo tipo de cruzamiento ($Pc2$) con el primer tipo de cruzamiento ($Pc1$) a (a) 10 %, (b) 20 %, (c) 30 %, (d) 40 %, (e) 50 %, (f) 60 %, y con mutación del 10%.

En cuanto a la mutación se encontró que al aumentarla, a una misma tasa de cruzamiento (Figura 5.25), la aptitud disminuye más allá del 30 % de Pm .

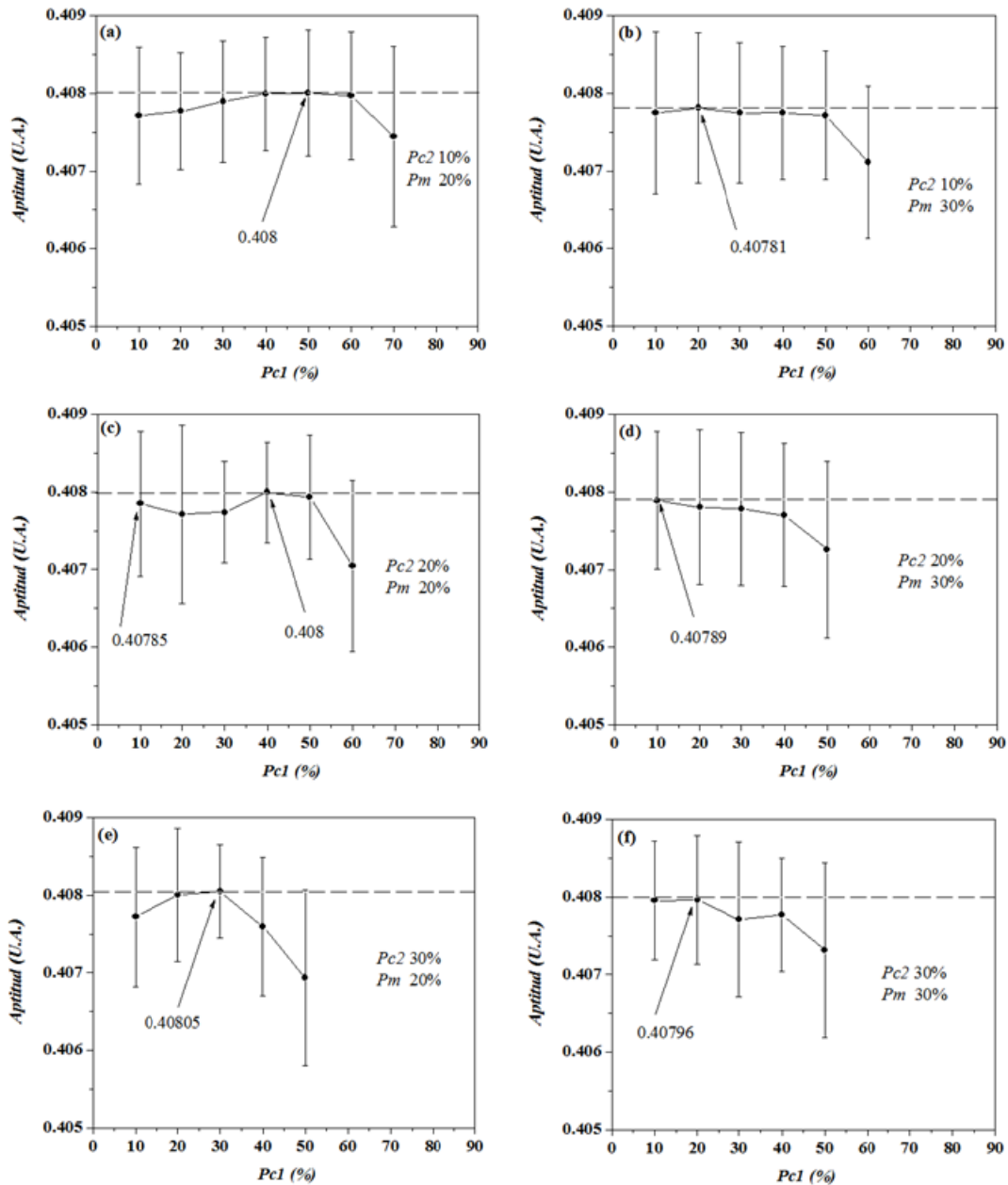


Figura 5.25. Resultados de sintonización con $Pc1$ de 10 a 80 % y (a) $Pc2 = 10\%$ y $Pm = 20\%$, (b) $Pc2 = 10\%$ y $Pm = 30\%$, (c) $Pc2 = 20\%$ y $Pm = 20\%$, (d) $Pc2 = 20\%$ y $Pm = 30\%$, (e) $Pc2 = 30\%$ y $Pm = 20\%$, (d) $Pc2 = 30\%$ y $Pm = 30\%$.

De esta manera se encontró que las mejores condiciones para el algoritmo son $Pc1 = 10 \%$, $Pc2 = 20 \%$ y $Pm = 20 \%$. Se escogió 10% de $Pc1$ en vez de 40% (Figura 5.25 (c)) debido a que el rango de cambio del resultado de la aptitud es el mismo que con 40% y debido a que el cruzamiento $Pc1$ consume mayor tiempo de computo, al ser de tipo elitista, es preferible que el porcentaje de este sea lo más pequeño posible.

Después de este proceso, para poder identificar el tamaño adecuado de la población tenemos que evitar 2 tipos de errores (Lobo *et al.*, 2004), (a) error de tipo I, en donde la población tiene un tamaño insuficiente y se puede identificar debido a que el GA pierde la calidad de la solución prematuramente y converge a soluciones subóptimas (el usuario paga una penalización de calidad), (b) error de tipo II, en donde el tamaño de la población es grande y se puede identificar en el GA con un gasto innecesario de recursos computacionales (el usuario paga una penalización de tiempo). De esta manera se ejecutaron las pruebas de sintonización del tamaño de la población (Tp) para el GA con los rangos e incrementos de la Tabla 5.6 y los resultados se muestran en la Figura 5.26, en donde se observa que los mejores resultados de desempeño del algoritmo son con un tamaño de población de 800 individuos.

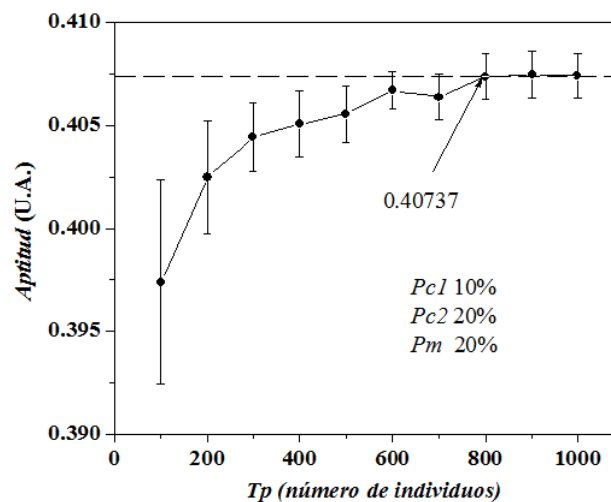


Figura 5.26. Resultados de sintonización del tamaño de la población (Tp).

Con los resultados de los parámetros de los dos tipos de cruzamiento ($Pc1$ y $Pc2$), de la mutación (Pm), así como del tamaño de la población inicial se volvió a ejecutar el algoritmo a 1000 generaciones. De esta manera se pudo identificar que el algoritmo converge en 400 generaciones (Figura 5.27).

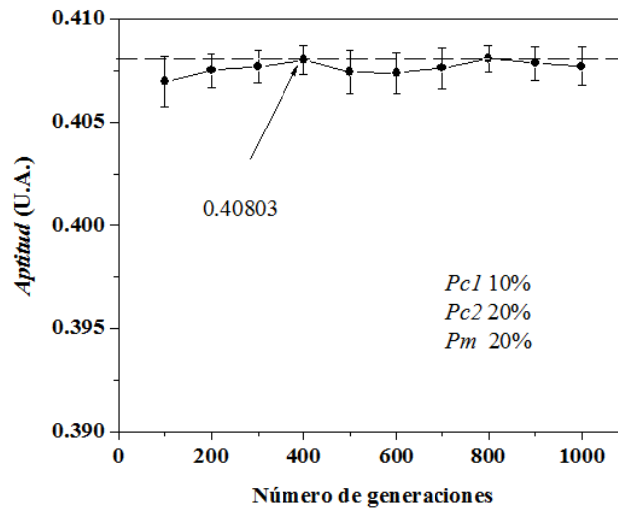


Figura 5.27. Resultados de sintonización del máximo número de generaciones ($MáxGen$).

5.2.7.3. Resultados y análisis de convergencia del GA

Una pregunta fundamental acerca de un GA es sobre sus tasas de convergencia: la rapidez con que las poblaciones pueden llegar a incluir los individuos con el valor más alto de aptitud (He & Kang, 1999). El algoritmo converge cuando se llega a uno de los siguientes dos criterios: (1) el número de generaciones excede un valor límite, o (2) la función objetivo mejora un valor definido (cota), a la que previamente alguien llegó (Abraham, 2009). Debido a que del problema que se trata en la presente tesis doctoral no existen cotas previamente establecidas se tomó el primer criterio para decidir en qué momento se llega a la convergencia. La sintonización del algoritmo Genético (resultado del análisis de las pruebas anteriormente presentadas) mostró que el GA converge con 800 individuos,

400 generaciones, 10 % de cruzamiento elitista ($pc1$), 20 % de cruzamiento aleatorio ($pc2$), 20 % de mutación (pm) y que con mejor aptitud (en promedio) de 0.407. Posteriormente se volvió a ejecutar el algoritmo con todos los parámetros ajustados y se encontró que en promedio se llega al mejor resultado antes de las 200 generaciones (Figura 4.29), ya que la diferencia entre los resultados decimales de la Aptitud y del resultado de los parámetros de procesado de uno y otro resultado es insignificante más allá de la generación 170 (Figura 5.28). Debemos recordar que la capacidad informática que se necesita para resolver un problema está relacionado con la dificultad de los problemas (Lobo & Goldberg, 2004), por lo cual los resultados del análisis de convergencia del algoritmo nos pueden indicar que el problema que estamos tratando no es difícil de resolver. Sin embargo para poder decir que este problema sea difícil o fácil de resolver de manera certera es necesario realizar más estudios al respecto.

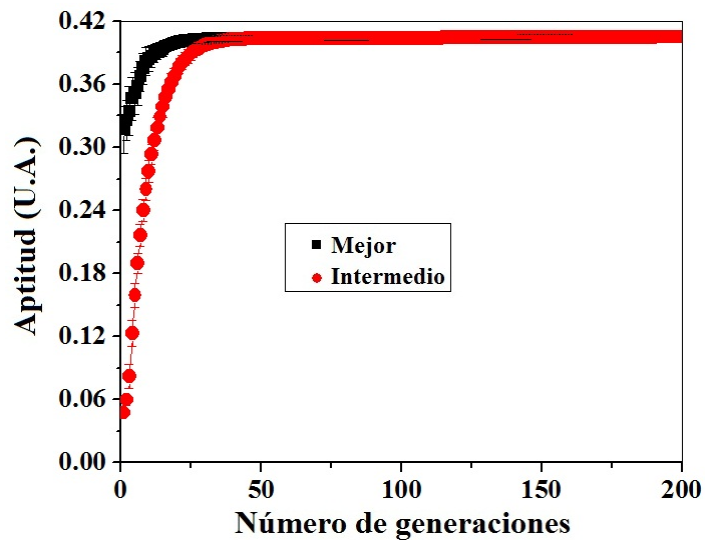


Figura 5.28. Convergencia el Algoritmo Genético (30 pruebas).

Posteriormente, se analizaron los resultados para obtener no solo el mejor individuo sino también un individuo con aptitud intermedia y otro con la peor aptitud. De esta manera las características de dichos individuos (andamios) se pueden ver en la tabla 5.7.

Tabla 5.7. Resultados obtenidos del Algoritmo Genético de los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud, ^a son los parámetros de procesamiento para realizar el andamio por medio de electrohilado, ^b son parte de la arquitectura del material y ^c son parte de las propiedades del material. La *Aptitud* es la capacidad teórica que tiene cada uno de estos andamios para el crecimiento de osteoblastos.

Individuo	V^a (kV)	C^a (%p/V)	Z^a (cm)	Q^a (ml/hr)	P^b (μm)	ϕ^b (%)	E^c (MPa)	θ^c ($^\circ$)	<i>Aptitud</i> (U.A.)
Mejor	5	19.9	4.9	12	95	82	283.30	85.87	0.406
Intermedio	6	18.5	16	7.54	13.03	59	170.75	85.87	0.168
Peor	16.3	19	7.5	0.34	0.48	05	12.01	85.87	0.047

Se puede notar que el mejor andamio tiene un diámetro de poro de 95 μm , alta porosidad de 82 %, modulo de Young de 283.3 MPa y una aptitud de 0.406. Dichas cantidades son los valores máximos a los que se puede llegar teóricamente con las condiciones programadas de los parámetros de procesamiento del andamio. Sin embargo, al realizar el proceso de electrohilado de los andamios se encontró que no se podía utilizar todas las condiciones de flujo, ya que al aplicar el flujo no se movía el embolo de la jeringa de vidrio, porque la solución era demasiado viscosa, debido a que la mejor condición teórica fue a 19.9 % peso/volumen. Por esta razón se debió modificar los rangos de electrohilado de los materiales. Finalmente se obtuvo el rango

de las condiciones adecuadas para el proceso de electrohilado las cuales se pueden ver a continuación en la tabla 5.8.

Tabla 5.8. Rangos de parámetros de electrohilado modificados para la implementación del Algoritmo Genético.

Parámetro de electrohilado	Símbolo y unidades	Rangos
Voltaje	V (kV)	12-20
Concentración	C (%p/vol)	1-4
Distancia	Z (cm)	5-20
Flujo	Q (ml/hr)	0.1-2

Con los nuevos rangos de los parámetros de procesado encontrados se procedió a realizar nuevamente la sintonización del algoritmo. Estos son parámetros en los cuales se encontró que al realizar el proceso de electrohilado la solución polimérica es eyectada de manera adecuada de la jeringa. Hay que considerar que probablemente los parámetros de electrohilados expuestos en la literatura se puedan utilizar al variar la temperatura a la que se electrohila el material. Sin embargo, en nuestro caso no realizamos un estudio monitoreando diferentes temperaturas de electrohilado. Así mismo con PHBs que tengan una diferencia considerable de pesos moleculares cambiaran los rangos en que el proceso de electrohilado se pueda realizar.

5.2.7.4. Análisis de sensibilidad del GA con parámetros de electrohilado modificados

Los parámetros presentados en la Tabla 5.8 fueron utilizados para volver a ejecutar el GA y realizar nuevamente el análisis de sensibilidad. Se mantuvieron los mismos parámetros de control del GA explicados en la sección 5.2.7.1.1., así como la arquitectura computacional y el lenguaje de programación (sección 5.2.7.1.2), y la manera en que se realizó el proceso de sintonización del GA (sección 5.2.7.1.3).

5.2.7.4.1. Cambio del rango de las restricciones

Al realizarse las pruebas del algoritmo con las modificaciones en los parámetros de electrohilado los resultados mejoran modificando los valores mínimos de las restricciones, para diámetro de poro de 0-400 μm , para porosidad de 0 a 90 %, para modulo de Young de 0 a 400 MPa y para ángulo de contacto se dejó la restricción tal cual. Lo anterior debido a que dejando los rangos de las restricciones sin modificar se obtiene aptitudes menores a las que se pueden obtener con los rangos modificados.

5.2.7.4.2. Resultados del análisis de sensibilidad del GA obtenidos con los nuevos rangos de procesado

Al realizar la sintonización del primer tipo de cruzamiento ($Pc1$) y del segundo tipo de cruzamiento ($Pc2$) se encontraron los mejores resultados con un 10% de ambos, como se puede ver en la Figura 5.29. Podemos observar que a bajas tasas de cruzamiento se pueden encontrar buenos resultados, lo cual es conveniente debido a que el cruzamiento 1 ($Pc1$) requiere mayor tiempo de ejecución debido a su comportamiento elitista y de esta manera obtener buenas soluciones a bajas tasas mejora la eficiencia del algoritmo sin que el mismo pierda su eficacia.

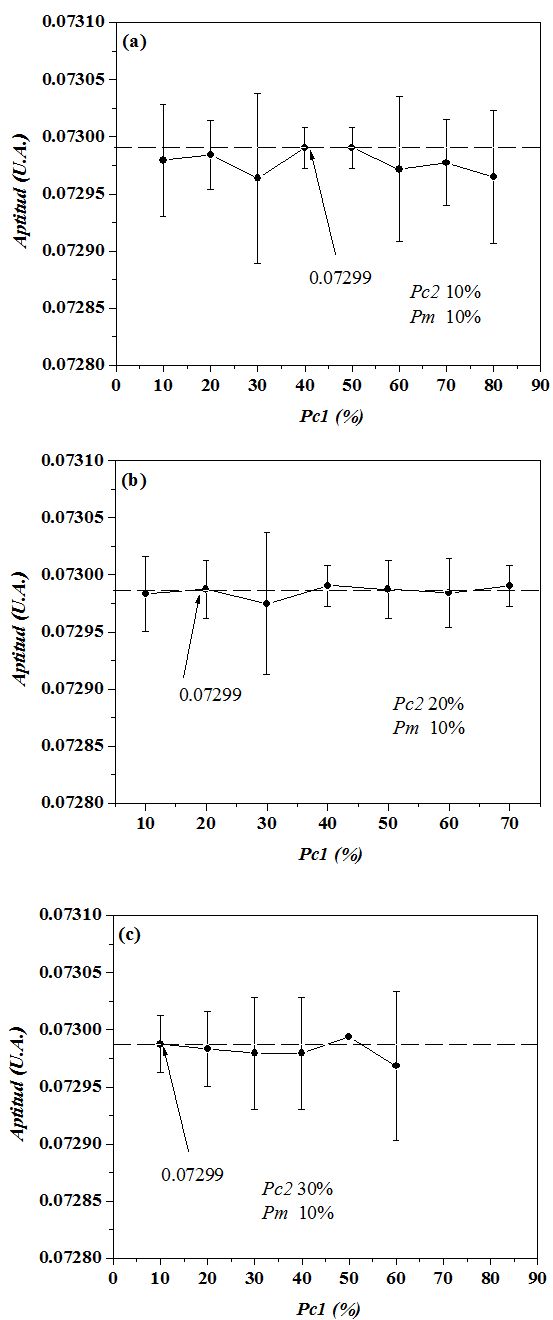


Figura 5.29. Aptitud del primer tipo de cruzamiento ($Pc1$) con el segundo tipo de cruzamiento ($Pc2$) a (a) 10 %, (b) 20 %, (c) 30 %, y con mutación del 10%.

Al realizar la sintonización de la mutación (Pm) se encontraron los mejores resultados con un 10% (Figura 5.30 (a)) de la misma y que a mayor porcentaje (Figura 5.30 (b)) se requiere aumentar $Pc2$ para mantener la misma aptitud que con el caso anterior.

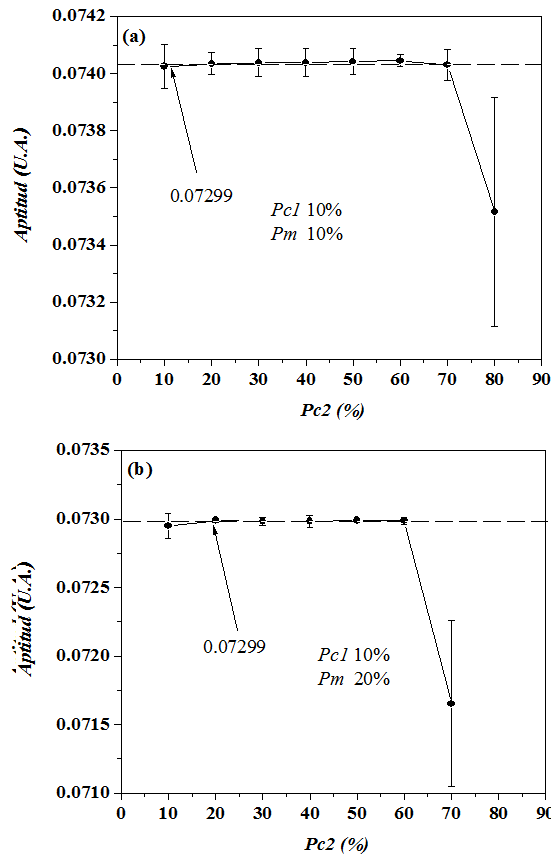


Figura 5.30. Resultados de sintonización del porcentaje de mutación (pm).

Al realizar las pruebas de sintonización del tamaño de la población (TP) para el GA con los rangos e incrementos de la tabla 4.6 se encontraron que los mejores resultados de desempeño del algoritmo son con un tamaño de población de 600 individuos (Figura 5.31), ya que a mayor tamaño de población no se logra una mejora significativa de la aptitud obtenida.

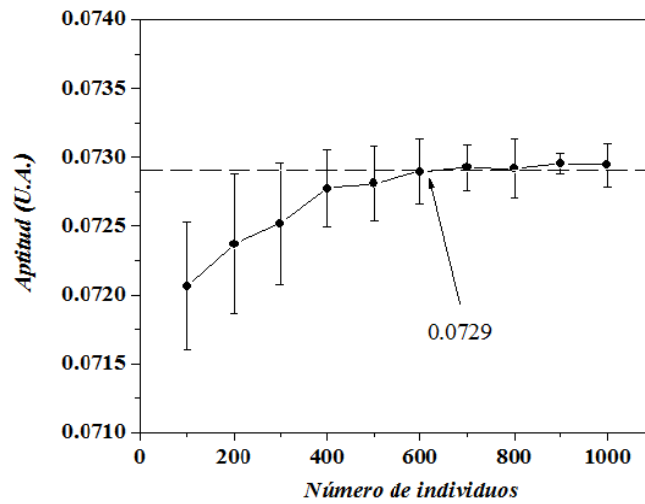


Figura 5.31. Resultados de sintonización del tamaño de la población (T_p).

Con los resultados de los parámetros de los dos tipos de cruzamiento ($Pc1$ y $Pc2$), del porcentaje de mutación (Pm), así como del tamaño de la población inicial se volvió a ejecutar el algoritmo a 1000 generaciones. De esta manera se pudo identificar que el algoritmo converge en 500 generaciones (Figura 5.32).

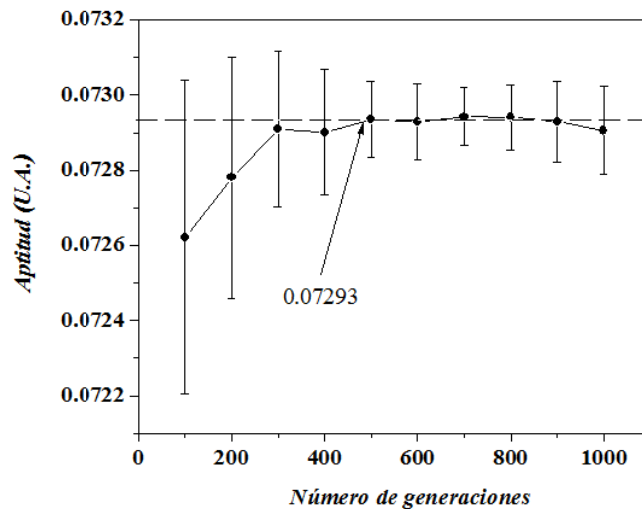


Figura 5.32. Resultados de sintonización del máximo número de generaciones ($MáxGen$).

5.2.7.5. Resultados y análisis de la convergencia del GA con parámetros de electrohilado modificados

Al analizar los resultados del Algoritmo Genético con los parámetros de electrohilado modificados se encontró que se llega al mejor resultado con una población inicial de 600 individuos, un número de generaciones menor a 200, 10% en ambos tipos de cruzamiento, mutación de 10% y que la máxima aptitud fue en promedio de 0.07213 obtenida aproximadamente en la generación 70 (Figura 5.33). Esto es porque más allá de la generación 70 no se encuentra un cambio significativo de la aptitud obtenida, así como de los parámetros de procesamiento de electrohilado por medio de los cuales se obtendrá el andamio. Los parámetros de procesamiento obtenidos permiten realizar el electrohilado de manera adecuada (es decir que con el mejor resultado obtenido se pueden generar hilos sin gotas o aglomerados) y se analizan en el siguiente apartado de la tesis.

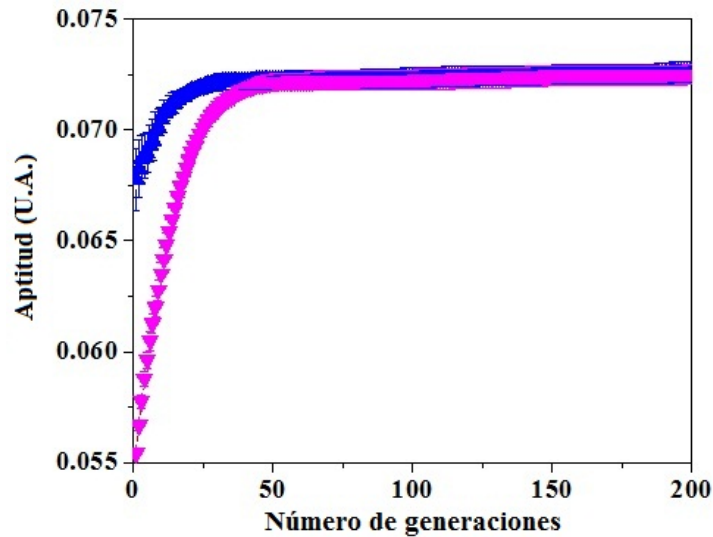


Figura 5.33. Resultados de la convergencia del Algoritmo Genético (30 pruebas).

5.2.7.6. Análisis de resultados de los andamios obtenidos por medio del GA

Los resultados del Algoritmo Genético se resumen en la tabla 5.7. El mejor andamio tiene un diámetro de poro teórico de 0.23 μm , mientras que el intermedio es de 0.059 μm y el peor de 0.004 μm . La porosidad teórica de los andamios es pequeña, debido a que (como se vio en la figura 4.19 (b) del presente capítulo) el diámetro de poro afecta directamente a la porosidad del material, de manera que a menor diámetro de poro menor es la porosidad del andamio. De la misma manera a menor porosidad el módulo de Young del material disminuye. En este caso se puede ver que el ángulo de contacto obtenido es el mismo para todos los resultados, lo que podría indicar que es necesario trabajar con ecuaciones que calculen el ángulo de contacto de manera más realista.

Tabla 5.7. Resultados obtenidos del Algoritmo Genético de los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud, ^a son los parámetros de procesamiento para realizar el andamio por medio de electrohilado, ^b son parte de la arquitectura del material y ^c son parte de las propiedades del material. En este caso la *Aptitud* representa la capacidad teórica que tiene cada uno de estos andamios para el crecimiento de osteoblastos.

Individuo	V^a (kV)	C^a (%p/V)	Z^a (cm)	Q^a (ml/hr)	P^b (μm)	ϕ^b (%)	E^c (MPa)	θ^c (°)	<i>Aptitud</i> (U.A.)
Mejor	12	3.9	5	2	0.23	6	12.48	85.87	0.072
Intermedio	13	3.8	13.9	1.7	0.059	2.9	5.96	85.87	0.059
Peor	13.3	3.9	12.2	0.1	0.004	0.02	0.38	85.87	0.048

La *Aptitud* de los andamios (Mejor, Intermedio y Peor) es consistente a lo que se espera de los resultados teóricos obtenidos, ya que presenta mayor diámetro de

poro (0.23 μm), porosidad (6 %) y Módulo de Young (12.48 MPa) con respecto a los otros dos. Sin embargo las condiciones de arquitectura y propiedades del andamio son muy bajas a lo que se esperaría de un andamio ideal para el crecimiento de osteoblastos, lo cual se puede ver reflejado en la baja aptitud que presenta (0.072). Aún así los resultados de las condiciones intermedia y peor son menores a los del mejor (0.059 y 0.048).

5.2.8. Cálculo de la complejidad algorítmica del GA

La complejidad del tiempo computacional es un tema importante en los Algoritmos Evolutivos (EA) en general, debido a que se requiere obtener la solución del problema en un tiempo razonable (He & Yao, 2001). En particular se ha mostrado (He *et al.*, 1998; He *et al.*, 1999) que los algoritmos genéticos (GAs) pueden necesitar tiempo promedio exponencial para resolver algunos problemas engañosas. Por lo cual es conveniente conocer la complejidad de los algoritmos que se utilizan. La ecuación temporal correspondiente al Algoritmo Genético de esta tesis se encuentra representado a continuación en la ecuación 5. 11.

$$T_{sec}(n) = 284 + 33n + 12n^2 + \log(n) \quad (5.11)$$

5.2.9. Conclusiones del GA

El espacio de soluciones del problema cuando se grafican de manera aleatoria los 4 parámetros de entrada parece que es suave. Sin embargo, esto es debido a que para diferentes configuraciones de andamios se puede obtener valores de aptitud similares, ya que mientras mayor sea un parámetro de procesamiento determinado aumenta la aptitud del individuo. Los resultados del GA son los esperados cualitativamente. Es necesaria la corrección de los rangos de los parámetros de

electrohilado para poder obtener de manera experimental los andamios. El problema converge en una generación menor a 200. Este tipo de comportamiento se ha visto en problemas no lineales, como el que estamos tratando (sección 4.4.1 del capítulo 4 de la presente tesis).

5.3. Prueba de resultados de los andamios obtenidos por medio del GA

Después de obtener los resultados del algoritmo, se procedió a probarlos experimentalmente. Primero se realizó el electrohilado para obtener el mejor, intermedio y peor andamios, y posteriormente se realizó cultivo de osteoblastos normales humanos para probar cuál de ellos presentaba mayor proliferación celular, lo que sería probar la *Aptitud* experimental de dichos andamios para el crecimiento de osteoblastos.

5.3.1. Electrohilado de andamios de PHB

Como se menciona en el capítulo 3, el método de procesamiento de los andamios es el electrohilado. A continuación se detalla el protocolo utilizado para llevar a cabo el experimento.

5.3.1.1. Protocolo de electrohilado de andamios

Se realizó el electrohilado de los andamios con las condiciones de la tabla 5.7, con un sistema de electrohilado implementado con una fuente de voltaje Spellman que va de 0 a 30 kV y una bomba de flujo que funciona con un programa implementado en lenguaje de programación Pascal. El electrohilado se realizó a temperatura de 25°C, en condiciones normales de presión atmosférica.

5.3.1.2. Análisis de andamios electrohilados por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Para determinar el diámetro de poro de los andamios se utilizó Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

5.3.1.2.1. Protocolo de SEM

Una vez electrohilados los andamios se analizaron por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) modelo JEOL JSM 6610LV. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ® para determinar el diámetro de hilo y el diámetro de poro de los andamios.

5.3.1.2.2. Resultados del análisis de las imágenes de SEM de los andamios

El andamio con mayor aptitud teórica (Figura 5.34 (a)) para cultivo de osteoblastos tiene un diámetro de hilo teórico de $2.31 \mu\text{m}$ mientras que de manera experimental se generaron dos diámetros de hilo distintos. El diámetro de hilo promedio mayor es de $55.8 \pm 11.05 \mu\text{m}$ y el diámetro de hilo promedio menor fue de $4.68 \pm 0.68 \mu\text{m}$. De esta manera, se puede ver que tanto el diámetro de hilo como el de poro teóricos difieren de los resultados experimentales y los mismo pasa con los andamios de aptitudes intermedia y peor. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 5.8. Podemos ver que a pesar de que los resultados teóricos difieran de los experimentales, las tendencias de diámetro de hilo y de diámetro de poro son consecuentes con el hecho de que el andamio de mejor aptitud presenta mayor diámetro de poro y que en los otros dos andamios (Figura 5.34 (b) aptitud intermedia y Figura 5.34 (c) peor aptitud) se disminuye el diámetro de poro.

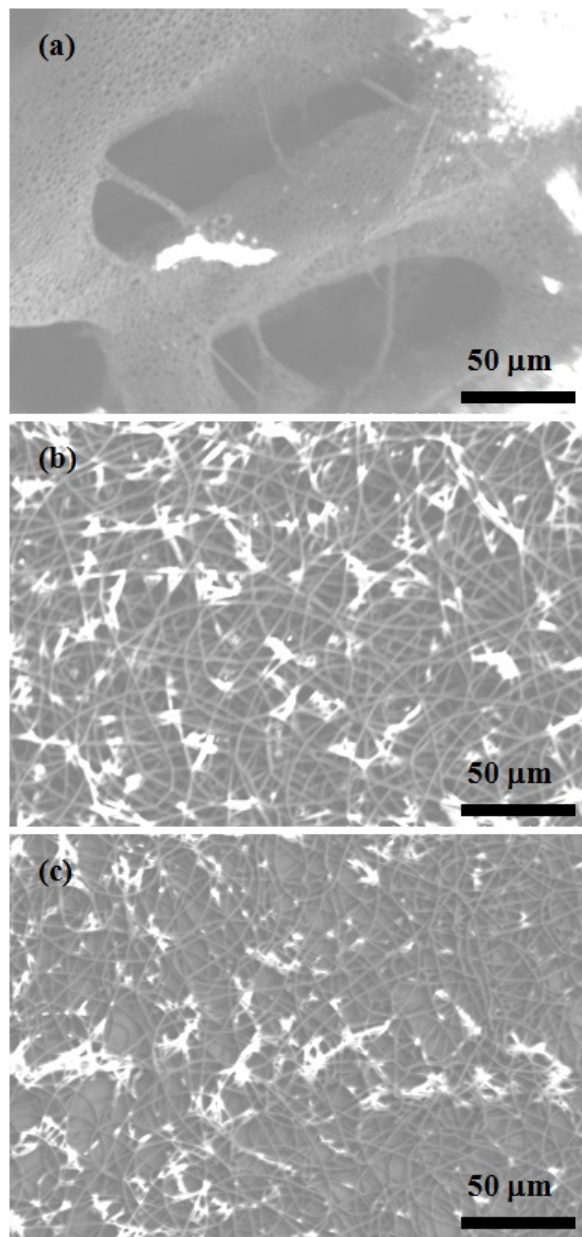


Figura 5.34. Microscopia óptica de barrido de los andamios con (a) mejor, (b) intermedia, (c) peor aptitud.

Tabla 5.8. Resultados teóricos y experimentales del diámetro de hilo y del diámetro de poro de los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud.

Andamio	Diámetro de hilo		Diámetro de poro	
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental
Mejor	2.31	55.8 ± 11.05	0.23	36.742 ± 28.936
		4.68 ± 0.68		
Intermedio	1.074	2.413 ± 0.394	0.59	7.429 ± 2.008
Peor	0.069	1.485 ± 0.394	0.004	5.233 ± 2.172

5.3.2. Prueba de resultados de la *Aptitud* de los andamios para el crecimiento de osteoblastos

Los andamios obtenidos por medio del GA se probaron en cultivo de osteoblastos normales humanos (NHOst por sus siglas en ingles). Para realizar el cultivo celular con las NHOst se siguió el protocolo que indica el manual del producto de Lonza® (protocolo completo en el Apéndice A). Las NHOst se descongelaron y se colocaron en una caja de cultivo de área de 25 cm² (T-25) con 5 ml de medio de cultivo y se espero a que tuvieran el 80% de confluencia (es decir cuando la superficie de la caja T-25 se encuentra casi totalmente cubierta) para subcultivar nuevamente. Al realizar el pase de las células, de la primera caja T-25 en la que se colocaron, se dejaron la mitad de las células en la caja que se estaba usando para así poder obtener mayor cantidad de células. Este proceso de subcultivar las células (denominado pases) se realizo 5 veces antes de poder obtener una cantidad de NHOst suficientes para el experimento.

5.3.2.1. Protocolo de cultivo celular de la línea NHOst

Para una caja de 25 cm² se debe seguir el protocolo de Lonza® el cual en resumen es el siguiente: Cuando las células llegan a 80% confluencia se debe retirar el medio de cultivo de la caja, después se deben lavar las células con 5 ml de HEPES-BSS y retirarse, colocar 2 ml de tripsina/EDTA para despegar las células (el proceso tarda de 2 a 6 minutos), después de que las células se despegan se deben colocar 4 ml de solución para neutralizar la tripsina (TNS por sus siglas en inglés) y colectar la solución con las células. Posteriormente, se colocan 2 ml más de HEPES-BSS para colectar las células residuales y centrifugar las células cultivadas a 220 x g por 5 minutos para obtener el botón celular. Entonces se resuspenden las NHOst en 2 a 3 ml de medio de cultivo nuevo y se reparte en dos proporciones iguales entre dos cajas de cultivo de 75 cm². Cada vez que se subcultivan las NHOst y se vuelven a colocar en una nueva caja de cultivo se considera que se realiza un pase, por lo cual para obtener una cantidad adecuada de células para nuestro experimento se deben hacer entre 2 a 5 pases, dependiendo del experimento que se desee realizar. Hay que recordar que la vida media de la línea celular es hasta de 10 pases y después de esto pierden su potencialidad para crecer, así que se debe colocar un número suficiente de cajas con células por pase para poder obtener la densidad de sembrado de células adecuada para los experimentos.

5.3.2.2. Mantenimiento y proliferación de las NHOst

Se realizó el mantenimiento de las NHOst y se muestran imágenes de microscopia óptica del crecimiento de las mismas durante 168 horas (Figura 5.35). Se observó un crecimiento normal de las NHOst, las cuales presentan formas alargadas y a las 168 horas de cultivo celular, cuando van llegando a confluencia (es decir que cubran casi completamente la superficie en donde están creciendo), se observa que se pliegan entre ellas.

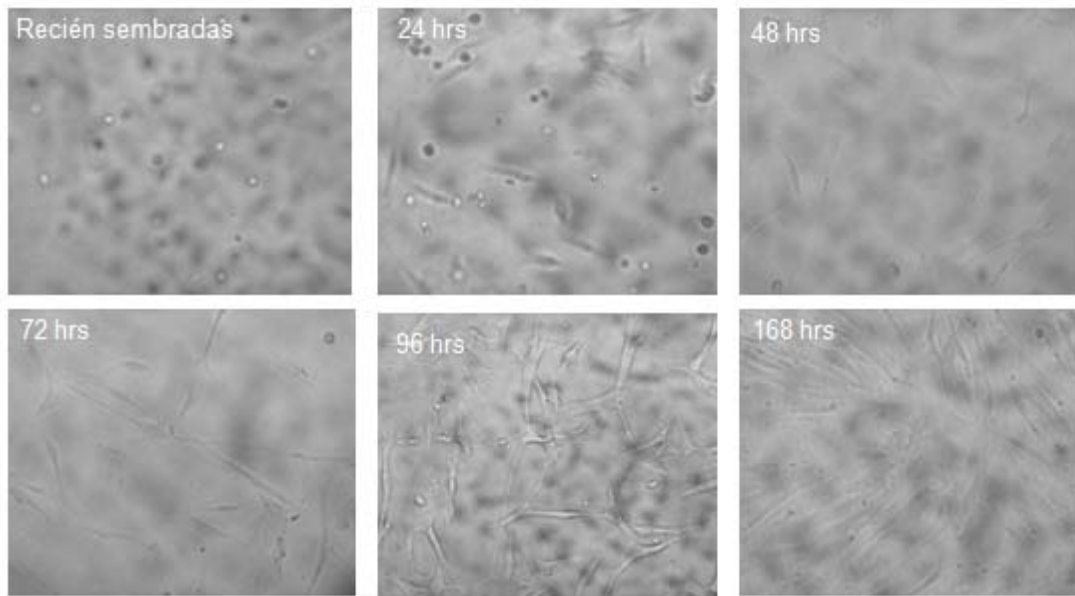


Figura 5.35. Mantenimiento y proliferación de las NHOst por 168 horas.

5.3.2.3. Pruebas biológicas implementadas para evaluar el crecimiento de las NHOst en los andamios

Se utilizaron los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud del PHB de 230 kDa para verificar si el andamio con mejor aptitud presenta mayor proliferación celular que los que tienen una actitud intermedia y una peor. Los andamios fueron cortados en cuadros de 0.5 cm de lado y se esterilizaron por medio de luz UV (20 minutos de un lado y 20 minutos del otro) dentro de una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Después de ser esterilizados, los andamios se colocaron en cajas de 24 pozos marca Corning®, utilizando el pase 5 para realizar el experimento. Además de los andamios se utilizó un control que corresponde a pozos sin andamios. El experimento (Figura 5.36) se realizó en cajas de 24 pozos con 1 ml de medio con células por pozo y una densidad de sembrado de 10000 células/ml. Los experimentos con los NHOst se realizaron por triplicado, considerando poder realizar las siguientes

pruebas: 4 tiempos de medición para conteo celular por azul tripano, a las 24, 72, 120 y 148 horas de cultivo celular; así como también se tomaron andamios con las diferentes condiciones (mejor, intermedia y peor) de las cajas de cultivo a las 148 horas, para poder verlas en un microscopio de epifluorescencia. Además se observó la evolución del crecimiento de las NHOst utilizando un microscopio óptico invertido Olympus con un objetivo de 10X a lo largo del transcurso de todo el experimento.

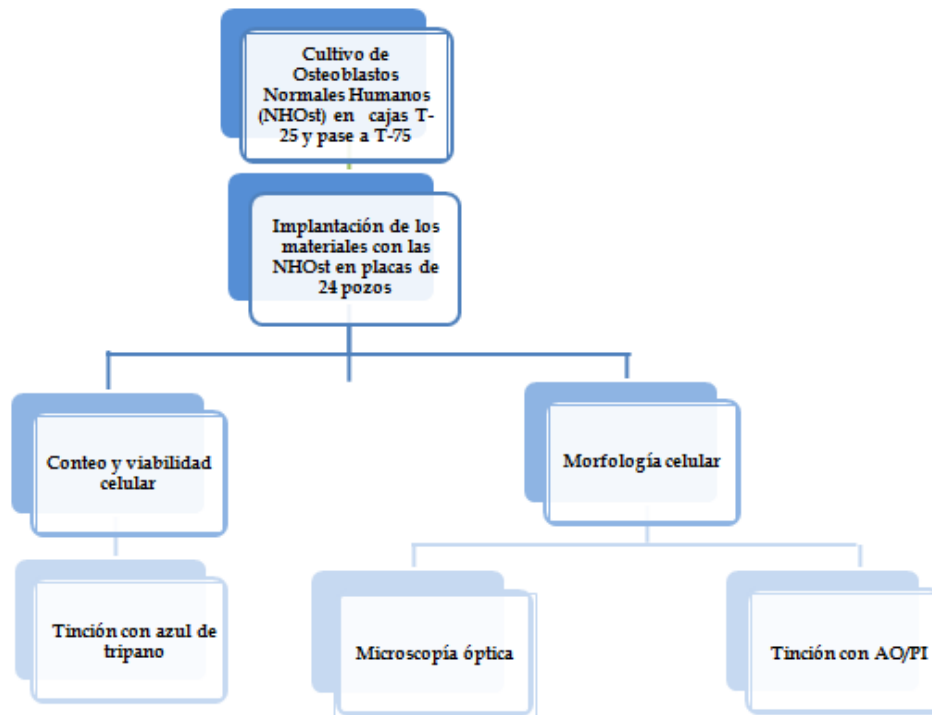


Figura 5.36. Estrategia de comprobación de los resultados del GA.

5.3.2.4. Resultados de las pruebas con las NHOst

A continuación se presentan los resultados obtenidos por microscopía óptica, conteo celular por azul tripano y epifluorescencia, de la línea celular NHOst en interacción con los andamios de PHB.

5.3.2.4.1. Observación del crecimiento de las NHOst por Microscopia óptica

Se realizó la observación de las NHOst con Microscopia óptica, debido a que esta es primordial para monitorear que las células no estén presentando algún problema, como puede ser contaminación por bacterias u hongos.

5.3.2.4.1.2. Protocolo experimental de Microscopia Óptica

La morfología de las células se observó en un microscopio invertido Olympus, con un objetivo de 10X durante 148 horas de cultivo en cajas de 24 pozos, con 1 ml de medio por pozo, sin cambio de medio.

5.3.2.4.1.3. Resultados de Microscopia Óptica

Los osteoblastos normales humanos se pueden apreciar como bastones alargados (Figura 5.37). A 24 horas de cultivo celular se observa que la mayoría de las NHOst se encuentran adheridas a la superficie de la caja de cultivo en todos los casos. Mientras que a 96 horas de cultivo celular se empieza a observar deterioro en los andamios, sobre todo en los de aptitud mejor e intermedia, donde se puede ver que se van formando huecos en los andamios. Así mismo a 96 y 148 horas de cultivo celular no se nota a simple vista mucha diferencia entre el crecimiento de NHOst en las diferentes condiciones. En el caso del andamio con mayor aptitud se aprecia a 148 horas que el material presenta huecos más grandes, mientras que para el caso de la peor aptitud no se aprecian huecos grandes en la superficie del andamio.

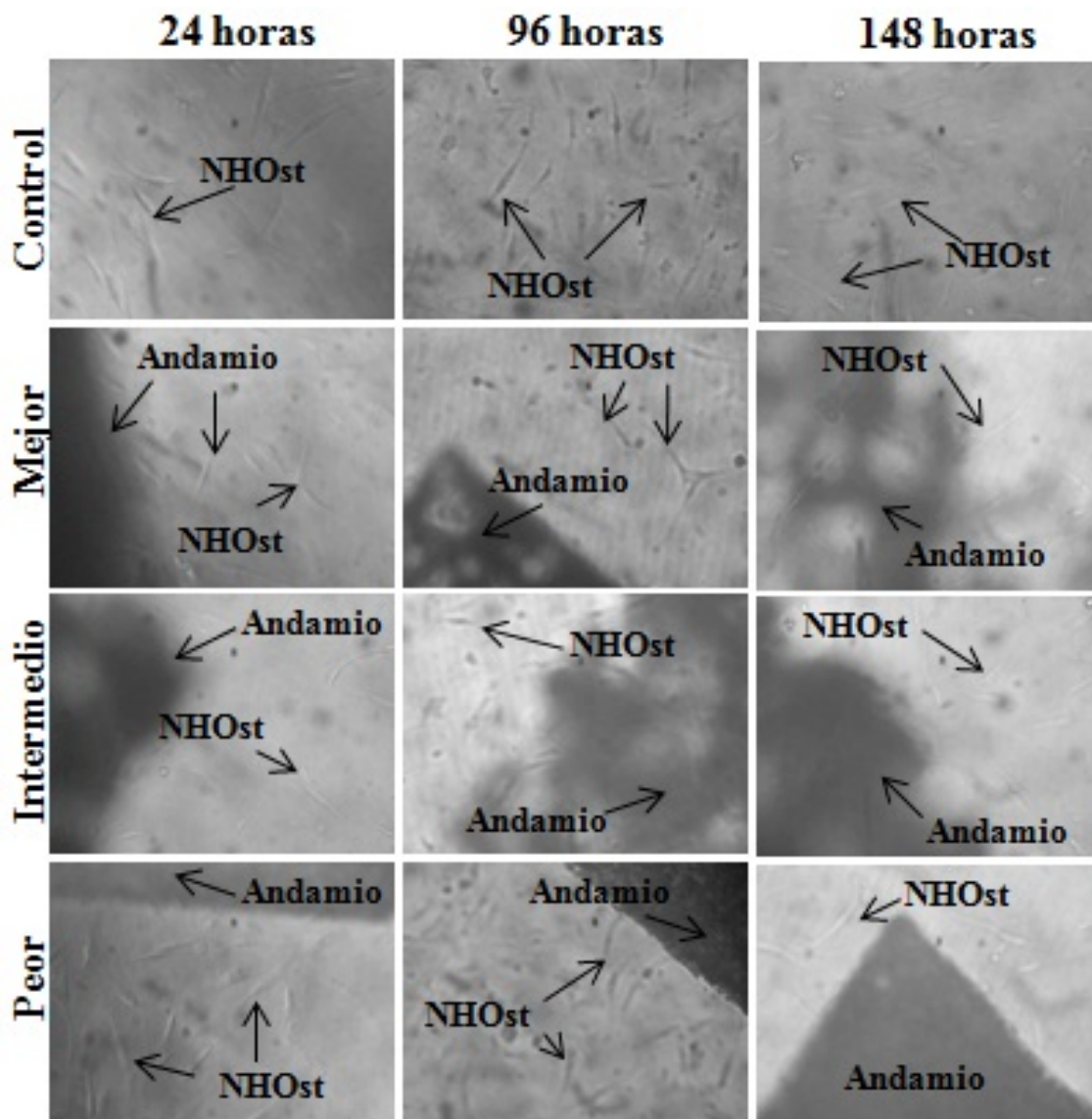


Figura 5.37. Las diferentes condiciones experimentales (control, con andamios: mejor, intermedias y peores) de los osteoblastos humanos normales en cajas de 24 pozos a las 24, 96 y 148 horas.

5.3.2.4.2. Conteo celular con azul tripano

La *Aptitud* obtenida por medio del Algoritmo Genético nos indica que tan adecuada es la configuración de un andamio para el crecimiento de osteoblastos. Sin embargo, dicho número no se puede determinar de manera directa con experimentos de cultivo celular. Una manera de identificar si las condiciones de un cultivo celular son adecuadas para el crecimiento de las células es por medio del conteo celular, de esta manera dicho conteo puede servirnos para determinar que tan apto es un andamio para el crecimiento de osteoblastos. El método de conteo celular por azul tripano es uno de los más utilizados para realizar conteo celular, por lo cual se optó por este método. Se utiliza un control sin andamios como otra condición experimental, aparte de los andamios con mejor, intermedia y peor aptitud, para observar si el crecimiento de las células no se ve afectado por los andamios.

5.3.2.4.2.1. Protocolo de Conteo celular

Para realizar el conteo celular se utilizó azul tripano, el cual es un colorante que tiñe de azul las células muertas, y se realizó el experimento por triplicado de las condiciones control (sin andamio) y las condiciones con andamio (mejor, intermedio y peor). Para el conteo celular se utilizaron una cámara Neubauer y un microscopio óptico Axiostar con objetivo de 10x. Las mediciones se realizaron por triplicado en cada uno de los casos.

5.3.2.4.2.2. Resultados de conteo celular

Después de 24 horas de cultivo celular los pozos que contienen el andamio con la mejor aptitud presentan un mayor crecimiento de los osteoblastos (Figura 5.38 (a)), mientras que la condición que sigue en cantidad de células fue la de pozos sin andamios. A las 72 horas de cultivo celular los andamios con aptitudes media y peor tienen un mayor crecimiento de los NHOst y los pozos que contienen el andamio con

mejor aptitud y el control tienen aproximadamente el mismo número de células (aproximadamente 40000 células/ml). Después de 120 horas de crecimiento celular se ve que en los pozos con andamios la proliferación celular es ligeramente mayor que en los pozos sin andamios. Por otra parte, la viabilidad celular (cantidad de células vivas sobre muertas que se puede apreciar en la 5.39 (b)) es aproximadamente la misma en todos los casos y horas, excepto a las 72 horas en la cual la viabilidad celular es mayor en los pozos que contenían los andamios con mejor aptitud.

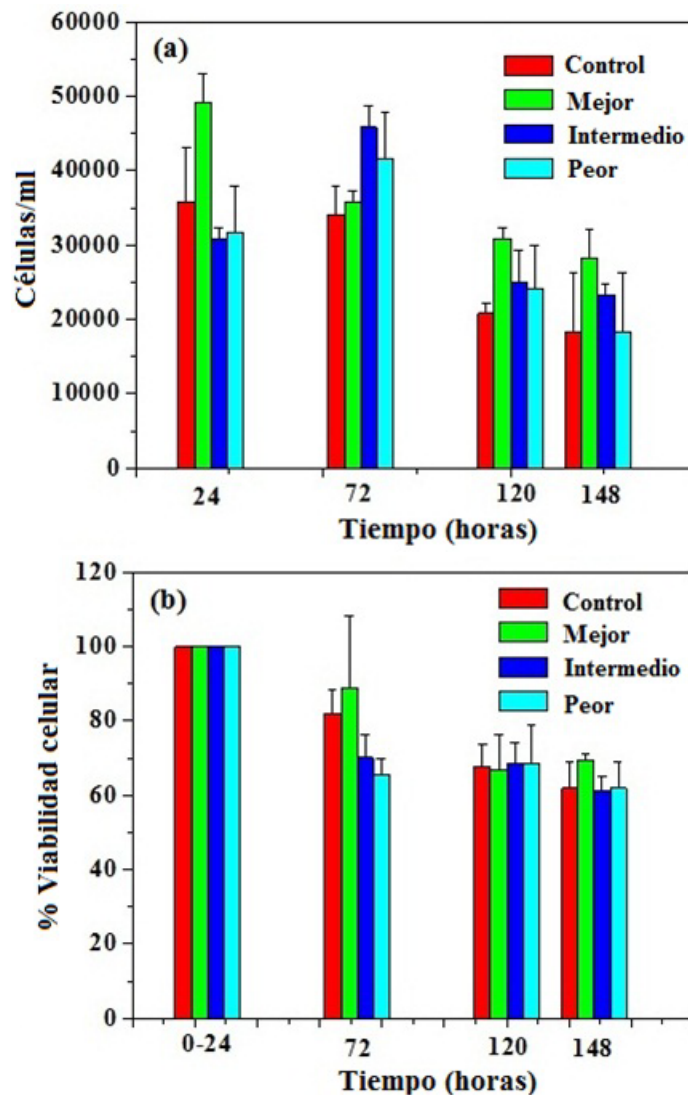


Figura 5.38. Resultados del conteo celular de las NHOst (a) células/ml, (b) % viabilidad celular.

5.3.2.4.3. Microscopia de epifluorescencia

Se realizó microscopia de epifluorescencia a las muestras extraídas de cultivo celular, para observar si quedan células vivas en los andamios. Las células vivas se tiñen de verde y las muertas de rojo.

5.3.2.4.3.1. Protocolo de Microscopia de epifluorescencia

Por último a las 148 horas de cultivo celular con los osteoblastos se extrajeron muestras de andamios de los pozos, se tiñeron con naranja de acridina y yoduro de propidio y se observaron con un microscopio de epifluorescencia.

5.3.2.4.3.1. Resultados de Microscopia de epifluorescencia

Se puede observar como después de 148 horas en cultivo celular los andamios con aptitud mejor e intermedia (Figuras 5.39 (a y b)) presentan degradación, mientras que en el andamio con peor aptitud (Figura 5.39 (c)) la forma de las fibras se mantuvo. Por medio de la epifluorescencia se observa que tanto células vivas como muertas permanecen en el andamio después de extraerlos del medio de cultivo. Sin embargo, esto no es una prueba cuantitativa del número de células vivas y muertas, como si lo es el conteo celular por azul tripano, el cual se presentara a continuación.

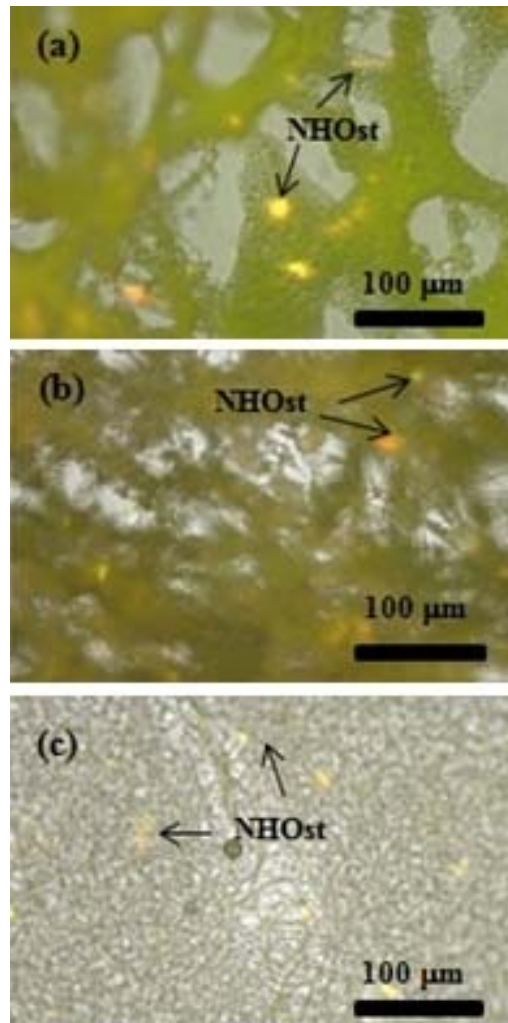


Figura 5.39. Andamios de PHB con aptitudes (a) mejor, (b) intermedia, (c) peor, después de cultivo con NHOst por 148 horas vistas en microscopio de epifluorescencia.

5.3.3. Conclusiones de la prueba de cultivo de NHOst en andamios

La morfología celular a lo largo del experimento no pareció sufrir ningún cambio (Figura 5.37) entre los pozos sin y con andamios de PHB. Por medio de conteo celular con azul tripano se puede observar que las células crecieron en todos los andamios y que a las primeras 24 horas el crecimiento de los NHOst fue de 5 veces el inicial (de 10000 a 50000 células/ml, aproximadamente) en el caso del andamio con mejor aptitud, seguida del control con aproximadamente 40000 células/ml, y por los andamios con aptitud intermedia y peor (Figura 5.38 (a)) de entre 30000 y 40000 células/ml. Sin embargo a las 72 horas de cultivo celular los andamios con aptitud intermedia y peor presentan un ligero aumento en la proliferación celular con respecto a las otras dos condiciones. A las 120 horas se ve que la condición con mejor aptitud presenta ligeramente mayor proliferación celular que las demás condiciones y a las 148 horas no existe mucha diferencia entre los resultados de todos los casos. Con respecto a la viabilidad celular se puede notar que a las 72 horas es mayor en el caso con el andamio de mejor aptitud que en los demás casos y que después de esto todas las condiciones experimentales tienen aproximadamente la misma viabilidad celular. Se observó (Figura 5.39) que después de 148 horas de cultivo celular los andamios habían sufrido degradación, sobre todo en el caso del andamio con mejor aptitud. Esto puede ser debido a que en el caso de los andamios con mejor aptitud los poros del andamio son más grandes, mientras que en el caso con peor aptitud los poros son pequeños (36.7 a 5.2 μm aproximadamente). Debido a la degradación de los andamios, las condiciones iniciales propuestas por el modelo de optimización cambian, lo cual puede influir en el hecho de que a los primeros días de cultivo celular el andamio con mejor aptitud presente mayor crecimiento de NHOst, pero que al ir cambiando la arquitectura y propiedades del material dichas condiciones ya no sean las mejores.

Capítulo 6.

Conclusiones y trabajo futuro

*["Un científico debe tomarse
la libertad de plantear
cualquier cuestión, de dudar
de cualquier afirmación, de
corregir errores."
Robert Oppenheimer]*

Capítulo 6. Conclusiones y trabajo futuro

6.1. Conclusiones

Se logro proponer un modelo de optimización para maximizar el crecimiento de células sobre andamios, el cual funciona buscando la mejor configuración (arquitectura y propiedades) de un andamio para el crecimiento de determinado linaje celular. La función objetivo corresponde a la aptitud de una configuración de un andamio para el crecimiento de osteoblastos, definiendo la arquitectura del andamio por medio del diámetro de poro y la porosidad, y las propiedades por medio del Modulo de Young y el ángulo de contacto del andamio. Este modelo puede ser utilizado como esqueleto básico para buscar la maximización del crecimiento de diferente tipo de células, así como para ser aplicado por medio de diversas técnicas de procesado de andamios, siempre que se puedan encontrar ecuaciones que nos permitan calcular la arquitectura y propiedades de los andamios por la técnica de procesado utilizada para construir los andamios.

El modelo de optimización propuesto se logro adaptar a un algoritmo genético (GA), considerando que los individuos del GA son diferentes configuraciones de andamio generadas por medio de los parámetros de la técnica de electrohilado. La adaptación del modelo de optimización requiere considerar el material que se utilizará para procesar el andamio. Debido a que esto impondrá límites de las propiedades del andamio a los cuales se puede llegar, siendo (en el caso específico de esta tesis) una de las características más importantes a considerar la viscosidad de la solución polimérica y el efecto de esta sobre el proceso de electrohilado de los andamios. Se encontró que para un PHB de peso molecular de 230 kDa la concentración máxima de la solución para realizar un adecuado proceso de electrohilado va de 1 a 4 % peso/volumen, así mismo que para que se puedan obtener hilos electrohilados sin gotas o gramos se deben utilizar voltajes de 11 a 20 kV, distancias de 5 a 20 cm, y flujos de 0.1 a 2 ml/hr. Sobre el espacio de búsqueda del problema se encontró que no es de fácil exploración debido a que cambios pequeños en las restricciones del modelo de optimización nos pueden llevar a espacios de búsqueda diferentes. Aplicar

un Algoritmo Genético en este tipo de problemas nos permite resolverlo de manera fácil e intuitiva sin necesidad de resolver las ecuaciones no lineales que se utilizan en este problema. Por otra parte, se encontró que los mejores resultados para el algoritmo genético se obtienen a porcentajes de cruzamiento menores a 50 % y de mutación menores a 30 %, con poblaciones de menores a 800 individuos y generaciones menores a 1000. El Algoritmo Genético converge en menos de 200 generaciones, lo cual es un comportamiento consistente a lo esperado para problemas no lineales. El Algoritmo programado es eficiente en cuanto al tiempo de ejecución ya que la ecuación temporal del mismo en el peor de los casos es logarítmica. Las tendencias de la arquitectura y propiedades de los andamios corresponden con lo esperado según reportes de la literatura. Los resultados obtenidos por medio del GA no solo nos pueden servir para encontrar el mejor andamio para crecimiento de determinado linaje celular sino que además nos pueden ayudar a entender la relación entre las condiciones de procesado (por medio de la técnica de electrohilado) y la configuración de un andamio, así como la relación de esta con el crecimiento de células (en particular se trataron los osteoblastos), ya que dichas relaciones son dependientes de diferentes variables. Los resultados de la mejor configuración de un andamio para crecimiento de osteoblastos, obtenida por medio del GA, pueden compararse con diferentes soluciones que tengan menor aptitud, ya que los resultados del algoritmo Genético nos proveen (además de los resultados de la aptitud) las condiciones de procesado que se tienen que utilizar para obtener cada configuración, lo cual ha sido mencionado como deseable por otros autores en el tratamiento de este tipo de problemas.

El andamio con la mejor aptitud obtenido por electrohilado presenta tamaños de poro mucho mayores que los que tienen aptitud intermedia y peor, lo cual corresponde a una propiedad deseable para el crecimiento de osteoblastos, ya que se espera que estos puedan internalizarse dentro del andamio y poseer una buena difusión de nutrientes y desechos celulares. Así mismo los cambios entre las tres configuraciones (la mejor, la peor y una intermedia) de andamios seleccionadas para

cultivo de osteoblastos mostraron diferencias medibles, por medio de la técnica de conteo celular con azul tripano, en la proliferación celular de las mismas sobre todo a las 24 horas de cultivo, mientras que a más a más de 72 horas no se pueden apreciar diferencias notables. La viabilidad celular presenta mayor diferencia a las 72 horas de cultivo en el caso del andamio con la mejor aptitud, mientras que para los demás casos y horas no se aprecia diferencia notable entre ellos. De esta manera se confirmó que es posible optimizar el crecimiento de células sobre andamios para aplicaciones en cultivo celular y de ingeniería de tejidos por medio del control de su arquitectura y propiedades con ayuda de un Algoritmo Genético. Además, es una gran ventaja tener un programa que nos pueda indicar cuál es la mejor solución para crecimiento de un tipo de células, ya que los materiales utilizados para llevar a cabo este tipo de experimentos son caros y los tiempos necesarios para realizarlos son largos. Tanto el modelo de optimización como el Algoritmo están sujetos a modificaciones que podrían llevar a mejores resultados y este trabajo puede ayudar a dicho propósito con base a los resultados obtenidos. Así mismo, por medio de este tipo de técnicas se pueden llegar a crear aplicaciones que sean utilizadas en tiempo real para el diseño de dispositivos médicos basados en andamios.

6.2. Trabajo futuro

- Trabajar en un modelo de optimización que considere en su representación directamente las ecuaciones de electrohilado.
- Construir un modelo multiobjetivo que considere las distintas características de arquitectura y propiedades del andamio, ya que la función de objetivo actual da el mismo peso a cada una de ellas.
- Construir un modelo de optimización dinámico, de manera que considere en el mismo los cambios que se pueden producir en la arquitectura y propiedades del andamio con el tiempo de cultivo celular.

- Trabajar en los modelos físicos empleados para obtener la arquitectura y propiedades del andamio para que se obtengan resultados más cercanos a la realidad.
- Probar diferentes tipos de operadores genéticos en el algoritmo implementado para medir su eficiencia con respecto a los resultados previamente obtenidos.
- Utilizar diferentes tipos de algoritmos genéticos y en general otras heurísticas para resolver el modelo de optimización.
- Probar el algoritmo desarrollado con diferentes polímeros y células, considerando los parámetros necesarios para adaptarlo a cada uno de ellos.
- Probar con la paralelización del Algoritmo Genético, ya que se conoce que estos algoritmos tienen facilidad de paralelización en la parte referente al operador de cruzamiento.

Referencias

- Abraham A., Hassanien A.-E., Siarry P., Engelbrecht A. (Eds.) Foundations of Computational Intelligence Volume 3 Global Optimization, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Albertsson A.-C., editor (2004) Long-term properties of polyolefins (Adv Polym Sci 169). New York: Springer.
- Araujo L., Cervigón C. (2009) Algoritmos evolutivos, Un enfoque práctico. Alfaomega Rama.
- Arora S., Barak B. (2009) Computational Complexity: A Modern Approach. Primera edición, Cambridge University Press, ISBN-10: 0521424267.
- Abou-Zeid D.M., Müller R.J., Deckwer W.D. (2004) Biodegradation of aliphatic homopolyesters and aliphatic-aromatic copolyesters by anaerobic microorganisms. *Biomacromol.* 5(5): 1687-1697.
- Arkles B. (2006). Hydrophobicity, Hydrophilicity and silane surface Modification. *Gelest Int*, 4-6.
- Bailey B.M., Nail L.N., Grunlan M.A. (2013) Continuous gradient scaffolds for rapid screening of cell-material interactions and interfacial tissue regeneration. *Acta Biomater.* 9: 8254-8261.
- Bastidas O. (2016) Cell Counting with Neubauer Chamber, Basic Hemocytometer Usage. Technical Note de Celeromics. Recuperado de www.celeromics.com
- Bhatia S.K. (2012) En Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine, Novel Technologies for Clinical Applications. Springer p. 21.
- Beeby M., Cho M., Stubbe J., Jensen G.J. (2012) Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology* 194(5): 1092-1099.

- Ben Amor H. (2008) *En Intelligent Exploration for Genetic Algorithms, Using Self-Organization Maps in Evolutionary Computation*. VDM Verlag Dr. Müller.
- Bhardwaj N., Kundu S.C. (2010) Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28: 325-347.
- Blum C., Roli A. (2003) *Metaheuristics in Combinatorial Optimization*
- Birkner N., Wang Q. How an FTIR Spectrometer Operates.
- Bonartsev A.P., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Furina E.K., Makhina T.A., Livshits V.A., Boskhomdzhiev A.P., Ivanov E.A., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. (2007) Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers – natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 295-307.
- Boussaïd I., Lepagnot J., Siarry P. (2013) A survey on optimization metaheuristics. *Information Sciences* 237: 82-117.
- Broderick C.S., Nowers J., Vogel B., Mallapragada S, Narasimhan B, Rajan K. *Inofrmatics for combinatorial Materials Science*. JOM: 56-59.
- Burdick J.A., Mauck R.L., in *Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Springer-Verlag/Wien, 2011.
- Calude C.S., Calude E., Queen M.S. (2013) Inductive Complexity of the P versus NP problema. *Parallel Processing Letters* 23(1): 1350007-1 - 1350007-16.
- Chantarapanich N., Puttawibul P., Sitthiseripratip K., Sucharitpwatskul S., Jiamwatthanachai P. (2013) Particle Swarm Optimization for Tissue Engineering Scaffold Parameters Design. *Advanced Science Letter* 19: 3114-3118.
- Chen B.K., Knight A.M., Madigan N.N., Gross L.A., Dadsetan M., Nesbitt J.J., Rooney G.E., Currier B.L., Yaszemski M.J., Spinner R.J., Windebank A.J. (2011) Comparison of polymer scaffolds in rat spinal cord: A step toward quantitative

- assessment of combinatorial approaches to spinal cord repair. *Biomaterials* 32: 8077-8086.
- Choi W., Tuteja A., Mabry J.M., Cohen R.E., McKinley G.H. (2009) A modified Cassie-Baxter relationship to explain contact angle hysteresis and anisotropy on non-wetting textured surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 339: 208-216.
- Cramariuc B., Cramariuc R., Scarlet R., Manea L.R. Lupu I.G., Cramariuc O. (2013) Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*: 1-10.
- De Falco I., Cioppa A.D., Tarantino E. (2002) Mutation-based genetic algorithm: performance evaluation. *Applied Soft Computing* 1: 285-299.
- Dias M.R., Guedes J.M., Flanagan C.L., Hollister S.J., Fernandes P.R. (2014) Optimization of scaffold design for bone tissue engineering: A computational and experimental study. *Medical Engineering & Physics* 36: 448–457.
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, S. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*. doi:10.1155/2011/290602.
- Domínguez-Díaz M. (2011) Tesis de maestría: Caracterización microestructural y reológica de polímeros de polihidroxibutirato y su aplicación en electrohilado. Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Domínguez-Díaz M., Chávez-Cruz M.A. (2015) Scaffold Architecture and Properties for Osteoblasts Cell Culture: An Optimization Model and Application by Genetic Algorithm. *Mater. Res. Soc. Proc.* 1753.
- Domínguez-Díaz M., Romo-Uribe A. (2012) Viscoelastic behavior of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomateriales* 1(1): 214-220.

- Domínguez-Díaz M., Meneses-Acosta A., Romo-Uribe A. (2015) Adhesion and Cell Viability of Normal Human Osteoblasts (NHOb) on Scaffolds of Poly(3-hydroxybutyrate). *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 1721.
- Eichhorn S.J., Sampson W.W. (2005) Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *Journal of the Royal Society Interface* 2: 309-318.
- Eichhorn S.J., Sampson W.W. (2010) Relationships between specific surface area and pore size in electrospun polymer fibre networks. *Journal of the Royal Society Interface* 7: 641-649.
- Elaoud S., Teghem J., Loukil T. (2010) Multiple crossover genetic algorithm for the multiobjective traveling salesman problem. *Electronic Notes in Discrete Mathematics* 36: 939-946.
- Fisher J.P., Reddi A.H. (2003) Functional Tissue Engineering of Bone: Signals and Scaffolds, en *Topics in Tissue Engineering*, Ashammakhi N, Ferreti P, Eds, http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e/abstracts/fisher_1.pdf
- Gács P., Lovász L. (1999) Complexity of Algorithms. En *Lecture Notes Spring 1999*, recuperado de <http://www.cs.yale.edu/homes/lovasz/notes.html>
- García A., Segura D., Espin G., Galindo E., Castillo T., Peña C. (2014) High production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*: 117-123.
- Garey M.R., Johnson D.S. (1979) *Computers and Intractability: A guide to the theory of NP completeness*. Freeman WH, 1era edición.
- Gigerenzer G. (2008) Why Heuristics Work. *Perspectives on psychological science* 3(1): 20-29.
- Goldreich O. (2000) *Computational Complexity- A Survey*. Recuperado de <http://www.wisdom.weizmann.ac.il/~oded/cc-sur1.html>

- Greiner A.M., Richter B., Bastmeyer M. (2012) Micro-Engineered 3D Scaffolds for Cell culture Studies. *Macromolecular Bioscience* 12: 1301-1314.
- Gumbiner B.M. (1996) Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.
- Harley B.A.C., Gibson L.J. (2008) *In vivo* and *in vitro* applications of collagen-GAG scaffolds. *Chemical Engineering Journal* 137: 102-121.
- Heesuk K., Chia-Ying L., Hollister S.J. (2010). Topology optimization of three dimensional tissue engineering scaffold architectures for prescribed bulk modulus and diffusivity. *Struct Multidisc Optim* 42: 633–644.
- He J., Huang H. (1998) The computational time analysis of genetic algorithms, in: Proc. Fifth Chinese Joint Conference on Artificial Intelligence, Xi'an Jiaotong University Press, Xi'an: 440-443.
- He J., Huang H., Kang L. (1999) The computational time of genetic algorithms for fully deceptive problem. *Chinese J Comput* 21(9): 999-1003.
- He J., Kang L. (1999) On the convergence rates of genetic algorithms. *Theoretical Computer Science* 229: 23-39.
- He J., Yao X. (2001) Drift analysis and average time complexity of evolutionary algorithms. *Artificial Intelligence* 127: 57-85.
- Helgason C.D. (2012) Culture of Primary Adherent Cells and a Continuously Growing Nonadherent Cell Line, en *Basis Cell Culture Protocols*, 3era edición, *Methods in Molecular Biology*TM Volume 290. Humana Press.
- Hernandez-Eligio A., Moreno S., Castellanos M., Castañeda M., Nuñez C., Muriel-Millan L.F., Espin G. (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 158: 1953-1963.
- Hernández Pérez H., Salazar Gonz

- Hofmann S., Garcia-Fuentes M. (2011) Bioactive Scaffolds for the Controlled Formation of Complex Skeletal Tissues. En *Regenerative Medicine and Tissue Engineering-Cells and Biomaterials*. Pag 393-432.
- Hollister S.J. (2005) Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials* 4: 518-590.
- Hollister S.J., Lin C.Y. (2007) Computational design of tissue engineering scaffolds. *Comput. Methods Appl Mech Engrg* 196: 2991-2998.
- Houp R.C. (2008) Cell Culture. *Journal of Validation Technology* 14(5): 46-49.
- Jayakumar P., Di Silvio L. (2010) Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 224: 1415-1440. DOI: 10.1243/09544119JEIM821.
- Juárez-Chávez J.Y., Cruz-Chávez M.A., Serna-Barquera S.A., Campillo-Illanes B., Peralta-Abarca J., Martínez-Bahena B., Moreno-Bernal P. (2012) Electronics, Robotics and Automotive Mechanics Conference, CERMA2012, IEEE-Computer Society México. doi 10.1109/CERMA.2012.31.
- Jungnickel D. (2013) Graphs, Networks and Algorithms, 4ta edición. En *Algorithms and Computation in Mathematics*, Vol. 5, Editores: Bronstein M, Cohen AM, Cohen H, Eisenbud D, Sturmfels B. Springer Heidelberg New York.
- Karabed D., Yu I. (2014) Big O notation, en *Lecture Notes: INF 2220: algorithms and data structures Series 1*. UNC Wilmington. <http://folk.uio.no/joakimmj/files/INF2220-kompendium.pdf>
- Karp J.M., Paul D.D., Schoichet M.S. Karp, J.M., Dalton, P.D., Shoichet, M.S. (2003) Scaffolds for Tissue Engineering. *MRS Bulletin on Cellular Solids* 28(4):301-306.
- Kasuya J., Tanishita K. (2012) Microporous membrane-based liver tissue engineering for the reconstruction of three-dimensional functional liver tissues in vitro. *Biomatter* 2(4): 1-6.

- Kansiz M. (2015) Identify Defects and Characterize in Minutes with FTIR Imaging Microscopy. Agilent Technologies. Materials Today Webinar.
- Keane T.J., Badylak S.F. (2014) Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery* 23: 112-118.
- Khalil A.S., Bouma B.E., Kaazempur Mofrad M.R. (2006) A Combined FEM/Genetic Algorithm for Vascular Soft tissue Elasticity Estimation. *Cardiovasc Eng* 6(3): 93-102. DOI 10.1007/s10558-006-9013-5.
- Kicinger R., Arciszewski T., De Jong K. (2005) Evolutionary computation and structural design: a survey of the state-of-the-art. *Computer & Structures* 83: 1943-1978.
- Köppen M., Schaefer G., Abraham A. (2011) *Intelligent Computational Optimization in Engineering. Techniques and Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Chennai, India.
- Korte B., Vygen J. (2008) *Combinatorial Optimization, Theory and Algorithms*, 4ta edición, Volumen 21 de *Algorithms and Combinatorics*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kasuya J., Tanashita K. (2012) Microporous membrane-based liver tissue engineering for the reconstruction of threedimensional functional liver tissues in vitro. *Biomatter* 2(4): 1–6.
- Langer R., Tirrell D.A. (2004) Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428: 487-492.
- Lee S., Soak S., Kim K., Park H., Jeon M. (2008) Statistical properties analysis of real world tournament selection in genetic algorithms. *Appl Intell* 28: 195-205.
- Lemogni M. (1926) Products of dehydration and of polymerization of b-hydroxybutyric acid. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* 8: 770-782.
- Libelli S.M., Alba P. (2000) Adaptive mutation in genetic algorithms. *Soft Computing* 4: 76-80.

- Lim E.-H., Sardinha J.P., Myers S. (2014) Nanotechnology Biomimetic Cartilage Regenerative Scaffolds. *Archives of Plastic Surgery* 41(3): 231-240.
- Lewis H.R., Papadimitriou C.H. (1978) The Efficiency of Algorithms. *Scientific American* 238: 96-109.
- Linkam Scientific Instruments. Recuperado de <http://www.linkam.co.uk/tst350-features/>
- Lobo F.G., Goldberg D.E. (2004) The parameter-less genetic algorithm in practice. *Information Sciences* 167: 217-232.
- Louis K.S., Siegel A.C. (2011) Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods, en *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, Martin J. Stoddart (ed.), vol. 740, DOI 10.1007/978-1-61779-108-6_2
- Marchessault R.H., Okamura K., Su C.J. (1970) Physical Properties of poly(β -hydroxybutyrate) II conformational aspects in solution. *Macromolecules* 3: 735-740.
- Martínez-Oropeza A. (2010) Tesis de maestría: Solución al problema de máquinas en paralelo no relacionadas mediante un algoritmo de colonia de hormigas. Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mauney, J.R., & Adam R.M. (2015). Dynamic reciprocity in cell-scaffold interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 82–83, pp. 77–85
- Meredith J.C., Karim A., Amis E.J. (2002) Combinatorial Methods for Investigations in Polymer Materials Science. *MRS Bulletin*: 330-335.
- Mehta H.D., Patel R. (2015) Optimal Design of Transformer using Tournament Selection based Elitist Genetic Algorithms. *Indian Journal of Science and Technology* 8(12): 1-9.

- Michalewicz Z., Fogel D. B. (2004) How to Solve It: Modern Heuristics. Springer Science & Business Media, Berlin.
- Mitchell G.R., Tojeira A. (2013) Role of Anisotropy in Tissue Engineering. *Procedia Engineering* 59: 117-125.
- Mohamed J.S., Ramakrishna S., Chittibabu P. (2013) Approaches of meta heuristics optimization techniques. *i-manager's Journal on Computer Science* 1(4): 32-40.
- Mujahid T., Kuruvilla M. (2014) A Genetic Algorithm Analysis towards Optimization solutions. *International Journal of Digital Information and Wireless Communications* 4(1): 124-142.
- Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Makhina T.K., Bonartsev A.P., Bonartsev G.A. (2008) Effect of Growth Conditions on the Molecular Weight of Poly-3-hydroxybutyrate Produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(5): 482-486.
- Natta G. (1959) Properties of Isotactic, Atactic, and Stereoblock Homopolymers, Random and Block Copolymers of α -Olefins. *Journal of Polymer Science* 34: 531-549.
- Nicolescu B. (1996) *La Transdisciplinariedad. Manifiesto*. Ediciones Du Rocher.
- Ndukwe M. (2016) Probing the Bases of Polymer Glass Transitions. Recuperado de <http://www.slideshare.net/miles132/probing-the-bases-of-polymer-glass-transitions>
- Nessler R. (2016) Scanning Electron Microscopy. Recuperado de <http://cmrf.research.uiowa.edu/scanning-electron-microscopy>
- O'Brien F.J. (2011) Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14(3): 88-95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- Papadimitriou C.H., Steiglitz K. (1998) *Combinatorial Optimization: Algorithms and Complexity*. Dover Publications, INC. Mineola, New York.
- Parberry I. (2001) *Lecture Notes on Algorithm Analysis and Computational Complexity*, 4ta edición, Department of Computer Sciences, University of North Texas.

- Persano L., Camposeo A., Tekmen C., Pisignano D. (2013) Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering* 298: 504-520. DOI: 10.1002/mame.201200290.
- Peña C., Trujillo-Roldán M.A., Galindo E. (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology* 27(6): 390-398.
- Peña C., López S., García A., Espín G., Romo-Uribe A., Segura D. (2014) Biosynthesis of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology* 64: 39-47.
- Pham Q.O., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering* 12(5): 1197-1211.
- Pose M.G. (2000). *Introducción a los Algoritmos Genéticos*. Departamento de Tecnologías de la Información y las Comunicaciones, Universidad de Coruña.
- Potyrailo R., Rajan K., Stoewe K., Takeuchi I., Chisholm B., Lam H. (2011) Combinatorial and High-Throughput Screening of Materials Libraries: Review of State of the Art. *ACS Comb Sci* 13: 579-633.
- Rajan K. (2008) *Combinatorial Materials Sciences: Experimental Strategies for Accelerated Knowledge Discovery*. *Annu Rev Mater Res* 38: 299-322.
- Rezende R., Rezende M.C., Maciel Filho R., Bartolo P.J.S., Mendes A. (2007) Adopting genetic algorithms for optimizing scaffolds in alginate for biofabrication. *AIDIC Conference Series* 9: 243-252.
- Rezende M.C.A.F., Rezende R.A., Maciel Filho R., Bártolo P., Mendes A. (2010) Scaffolds in Alginate for Biofabrication Optimised by Genetic Algorithms. *20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE20*.

- Robinson P.C., Davidson M.W. (2015) Introduction to Polarized Light Microscopy. Microscopy U, The source for microscopy education. Recuperado de <http://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>
- Romanycia M.H.J., Pelletier F.J. (1985) What is a heuristic?. *Comput. Intell.* Vol. 1: 47-58.
- Romo-Uribe A., Alvarado-Tenorio B., Romero-Guzmán M.E. (2010) A small-angle light scattering instrument to study soft condensed matter. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 30(2): 190-200.
- Rudich S. (2000). Lecture 1: The Formal Foundations of Complexity, En *Lecture notes of Computational Complexity Theory*, Editor: Steven Rudich.
- Sachlos E., Czernuszka J.T. (2003) Making Tissue Engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of Tissue Engineering scaffolds. *European Cells and Materials* 5: 29-40.
- Sampson W.W. (Ed.) (2009) *Modelling Stochastic Fibrous Materials with Mathematica®*. Springer-Verlag, Londres, Inglaterra.
- Sawyer L.C., Grubb D.T., Meyers G.F. (2008) *Polymer Microscopy*, 3era ed. Springer New York.
- Schick C. (2009) Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. *Anal Bioanal Chem* 395: 1589-1611.
- Schrödinger, E. (2008) *¿Qué es la vida?*. Trad. y notas de Ricardo Guerrero. Tusquets, Barcelona 7ª ed. Colección Metatemas.
- Shalaby S.W. (1981) Thermal characterization of polymer materials. En *thermoplastic polymers*. Turi EA, editor. New York, Academic Press p. 269.
- Staudinger H., Hever W. (1930) Viscosity for the examination of the constitution of natural products of high molecular weight and rubber cellulose. *Dtsh. Chem. Ges.* 63: 123-125.

- Stearne J.M., Ward I.M. (1969) The tensile behavior of polyethylene terephthalate. *Journal of Materials Science* 4:1088–1096.
- Stein R.S. (1964) *En Newer methods of polymer characterization*. New York: Interscience Publishers. P. 155.
- Stein R.S., Rhodes M.B. (1960) Photographic Light Scattering by Polyethylene Films. *Journal of Applied Physics* 31(11): 1873-1884.
- Stevens y George (2005) *Ciencia* 310: 1135-8.
- Sipser M. (1997) *Introduction to the Theory of Computation*. PWS Publishing Company, 20 Park Plaza, Boston, MA.
- Sipser M. (2013) *Introduction to the Theory of Computation*. Segunda Edición. Thomson Course Technology. ISBN 0-534-95097-3.
- Sivanandam S.N., Deepa S.N. (2008) *Introduction to Genetic Algorithms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sudesh K., Abe H., Doi Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polymers. *Progress in Polymer Science* 25(10): 1503-1555.
- Tabassum M., Mathew K. (2014). A Genetic Algorithm Analysis towards Optimization Solutions. *International Journal of Digital Information and Wireless Communications* 4(1): 124-142. ISSN: 2225-658X.
- Taha H.A. (2012) *Investigación de operaciones*, Novena edición. Pearson educación, México.
- Tai H., Mather M.L., Howard D., Wang W., White L.J., Crowe J.A., Morgan S.P., Chandra A., Williams D.J., Howdle S.M., Shakesheff K.M. (2007) Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing. *European Cells And Materials* 14: 64-77.

- Tuan H.S., Hutmacher D.W. (2005) Application of micro CT and computation modeling in bone tissue engineering. *Computer-Aided Design* 37: 1151-1161.
- Taha M., Hassan M., Essa S., Tartor Y. (2013) Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectroscopy for rapid and accurate identification of Yeasts isolated from human and animals. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 1: 15-20.
- Valappil S.P., Misra S.K., Boccaccini A., Roy I. (2006) Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: an overview of animal testing and in vivo responses. *Expert Review Medical Devices* 3(6): 853-868.
- Volova T., Goncharov D., Sukovatyi A., Shabanov A., Nikolaeva E., Shishatskaya E. (2014) Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: effects on electrospinning parameters on structure and properties. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 25(4): 370-393.
- Webb D.J., Brown C.M. (2013) Epi-fluorescence Microscopy. *Methods Mol Biol.* 931: 29-59.
- Wilf H.S. (2002) *Algorithms and Complexity*. 2da edición, CRC Press.
- Yang J., Soh C.K. (1997) Structural Optimization by Genetic Algorithms with Tournament Selection. *Journal of Computing in Civil Engineering*: 195-200.
- Zeleny J. (1914) The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. *Phys. Rev.* 3: 69-91.
- Zhao W., Byrne M.H., Wang Y., Krane S.M. (2000) Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure of collagenase cleavage of collagen. *The Journal of Clinical Investigation* 106(8): 941-949.
- Zilberman M., in *Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration*, (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011).



Apéndice A. Glosario

Biocompatibilidad

La habilidad de un material de tener una respuesta apropiada en un huésped para una aplicación específica (Bauer, 2013, pag. 3). Lo que significa que el material o sus productos no causan muerte celular, inflamación crónica o afecta las funciones celulares o de los tejidos. Los implantes no deben ser solamente bioseguros y bioestables en términos de citotoxicidad y degradación, ellos tienen que cumplir los requerimientos biológicos de una biocompatibilidad estructural. En otras palabras, la forma, la estructura interna y el diseño del implante necesitan ser adaptados a las características del tejido a ser reemplazado.

Biomaterial

Una sustancia o combinación de sustancias, de origen sintético o natural, la cual puede ser usada por un periodo de tiempo, en todo o parte del sistema, y que trata, aumenta, o reemplaza un tejido, órgano o función del cuerpo (definido por la Conferencia de los Institutos Nacionales de Desarrollo de Consenso de la Salud, National Institutes of Health Consensus Development Conference).

Función objetivo

Con el fin de utilizar la optimización de éxito, tienen que determinar primero un objetivo a través de la que pueden medir el rendimiento del sistema bajo estudio. Ese objetivo podría ser el tiempo, coste, peso, energía potencial o cualquier combinación de las cantidades que puede ser expresado por una variable individual. El objetivo se basa en ciertas características del sistema, llamada variable o incógnitas. Los algoritmos de optimización provienen de diferentes áreas y se inspiran en diferentes técnicas. Pero ellos están compartiendo algunos características comunes. Ellos son iterativas, que se inician con una estimación inicial de los valores óptimos de las variables y a continuación, generar una secuencia de estimaciones mejoradas hasta que convergen a una solución. El objetivo de las optimizaciones globales para encontrar la mejor manera posible x^* elementos de un conjunto X , de acuerdo con un

conjunto de criterios de $F = \{F1, F2, \dots, fn\}$ criterios. Estas se expresan como funciones matemáticas, que se denominan funciones objetivo (Mohamed, 2013).

Heurística

Del griego antiguo *heuriskein* y del latín *heuristicus*: “para averiguar, descubrir”. La rama de la lógica que trata de la técnica de descubrimiento o invención. 1838 Sir W. Hamilton *Logic App.* (1866) II. 230. Que trata de estas condiciones del conocimiento que se encuentran en la naturaleza, no de la misma idea, pero de lo que pensamos acerca de ... que se ha llamado heurístico, en la medida que se expande las reglas de la invención y de el descubrimiento. El concepto de heurística, como se trata en la presente tesis de doctorado, se empieza a forjar en la literatura de Inteligencia Artificial (AI por sus siglas en inglés de Artificial Intelligence) cerca de 1950 y ya es bien conocida temprano en los 1960's. Newell *et al.* (Feigenbaum y Feldman 1963, p. 114; ver también Newell 1980, p. 17) dan el primer uso de heurística como un sustantivo que significa proceso heurístico. Mientras que Feigenbaum y Feldman, editores de *Computers and Thought*, la describen de la siguiente manera en 1963: Una heurística (regla heurística, método heurístico) es una regla de oro, estrategia, truco, simplificación, o cualquier otro tipo de dispositivo que limita drásticamente la búsqueda de soluciones en problemas con espacios de gran tamaño. La heurística no garantiza soluciones óptimas; de hecho, no garantiza ninguna solución en absoluto; todo lo que puede decirse de una heurística útil es que ofrece soluciones que son lo suficientemente buenas la mayoría de las veces [Feigenbaum y Feldman 1963, p.6] (Romanycia y Pelletier, 1985).

Optimización

El arte de la selección de la mejor alternativa entre un conjunto de opciones dadas. Juega un importante papel en diseños de ingeniería, ciencias agrícolas, sistemas de fabricación, economía, ciencias físicas, patrón el reconocimiento y otros campos relacionados. El objetivo de la optimización es la búsqueda de valores para un

conjunto de parámetros que maximizar o minimizar las funciones objetivo sujeto a ciertas limitaciones (Mohamed, 2013).

Solución factible

Una selección de valores para el conjunto de parámetros que satisfacen todas las restricciones (Mohamed, 2013).

Sustrato

Material primario o subyacente en el que se aplican otros materiales (tales como tinta, revestimiento, pintura o algún tipo de tratamiento), o de los que están hechos de otros materiales. El andamio es un sustrato sobre el que pueden crecer células.

Apéndice B.
Protocolos de
cultivo de bacterias
productoras de PHB
y de células NH0st

A1. Medio y condiciones de cultivo de las bacterias usadas para producir los PHBs

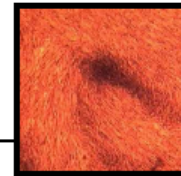
Los PHBs fueron donados por investigadores del IBT-UNAM (ver sección de agradecimientos). Las cepas de bacterias fueron cultivadas en medio de sacarosa PY con la siguiente composición (en L-1 g): sacarosa 20; extracto de levadura (Difco) 3; peptona (Difco) 5. El pH fue ajustado a 7.2 con una solución concentrada de NaOH 2 N. Los cultivos crecieron en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific Co., Modelo G 25) a 200 rpm y 29 ° C, hasta una absorbancia (Medida a 540 nm) de 0,15 (dilución 1:50). Diez mililitros de este inóculo se transfirieron a matraces de 500 ml que contiene 90 ml de medio y se cultivaron bajo las mismas condiciones durante 60 h. En estas condiciones, las células fueron creciendo bajo limitación de oxígeno. Con el fin de evaluar la influencia de la aireación condiciones, 100 y 200 ml de volumen de llenado en el movimiento de Se utilizaron matraces de 500 ml. Los cultivos se realizaron en una serie de matraces paralelos, dos de los cuales eran regularmente retirados y sometido a análisis (10 ml). Estos matraces no se colocaron de nuevo en el agitador. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados presentados son la media de experimentos independientes (Peña, 2014). La caracterización de los PHBs se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM por la tesista Maraolina Domínguez Díaz (ver sección de agradecimientos por los equipos e instalaciones utilizadas).

A2. Protocolo de cultivo celular

El cultivo celular se realizó en la Facultad de Farmacia de la UAEM (ver sección de agradecimientos). Esta parte fue realizada por la tesista Maraolina Domínguez Díaz, desde el proceso de mantenimiento de los osteoblastos normales humanos (NHOst) hasta el experimento final de comprobación de los resultados del Algoritmo Genético. A continuación se presentan los detalles de la línea celular NHOst y el protocolo de cultivo celular en extenso indicado por la empresa Lonza®.

Clonetics™ Normal Human Osteoblast Cell System

NHOst



Introduction

Clonetics™ Osteoblast Cell System contains Normal Human Osteoblasts (NHOst) and optimized medium for their growth. Each system can quickly generate NHOst cultures for experimental applications in bone research, physiology, cellular function and differentiation. Clonetics™ Osteoblast Cell System is convenient and easy to use, allowing the researcher to focus on results. Cryopreserved NHOst are shipped in second or third passage. Proliferating NHOst are shipped in third or fourth passage.

Clonetics™ Cells, Medium and Reagents are quality tested together and guaranteed to give optimum performance as a complete Cell System.

Cell System Components

- One Normal Human Osteoblast Cell Product (Cryopreserved or Proliferating)
- One Normal Human Osteoblast Cell Medium BulletKit™ - 500 ml
 Clonetics™ OGM™ BulletKit™ (CC-3207) contains one 500 ml bottle of Osteoblast Basal Medium (OBM™) and OGM™ SingleQuots™ containing the following growth supplements: FBS, 50 ml; Ascorbic Acid, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml.
- Differentiation SingleQuots™ (CC-4194)
 Hydrocortisone 21 Hemisuccinate (CC-4333), 0.5 ml (For alkaline phosphatase up-regulation and bone mineralization). β-Glycerophosphate (CC-4399), 5 ml (1.0 M solution - for bone mineralization)
- One ReagentPack™ (CC-5034) Containing:

Trypsin/EDTA	100 ml
Trypsin Neutralizing Solution	100 ml
HEPES Buffered Saline Solution	100 ml

Characterization of Cells

Routine characterization of NHOst includes immunofluorescent staining. NHOst test positive for alkaline phosphatase and bone mineralization.

Performance

Recommended Seeding Density	5,000 cells/cm ²
Typical time from subculture to confluent monolayer	5 - 9 days
Cumulative population doublings guaranteed using Clonetics™ System	10

Quality Control

All cells are performance assayed and test negative for HIV-1, mycoplasma, Hepatitis-B, Hepatitis-C, bacteria, yeast and fungi. Cell viability, morphology and proliferative capacity are measured after recovery from cryopreservation. Clonetics™ Media are optimized to grow specific types of normal human cells. Certificates of Analysis (COA) for each cell strain are shipped with each order. COA for all other products are available upon request.

Ordering Information

Cryopreserved Cells

CC-2538 NHOst ≥500,000 cells

Proliferating Cells – Flasks and Multiwell Plates

CC-2538T25 T-25 Flask

CC-2538T75 T-75 Flask

CC-2538W96 96-well Plate

Other proliferating formats are available. Contact Scientific Support or refer to the Lonza website for details.

CC-3207	OGM™ BulletKit™, OBM™ plus SingleQuotes™ of growth supplements	500 ml
CC-3208	OBM™, Osteoblast Basal Medium	500 ml
CC-4193	OGM™ SingleQuotes™, Formulates OBM™ to OGM™	
CC-4194	OGM™ Differentiation SingleQuotes™ induce osteoblast differentiation and mineralization	
CC-5034	ReagentPack™	
	Trypsin/EDTA Solution	100 ml
	Trypsin Neutralizing Solution	100 ml
	HEPES Buffered Saline Solution	100 ml

When placing an order or for technical service, please refer to the product numbers and descriptions listed above. For a complete listing of all Clonetics™ Products, refer to the Lonza website or the current Lonza catalog. To obtain a catalog, additional information or technical service you may contact Lonza by web, e-mail, telephone, fax or mail.

Product Warranty

CULTURES HAVE A FINITE LIFESPAN IN VITRO. Lonza guarantees the performance of its cells only if Clonetics™ Media and Reagents are used exclusively, and the recommend protocols are followed. The performance of cells is not guaranteed if any modifications are made to the complete Cell System. Cryopreserved NHOst are assured to be viable and functional when thawed and maintained properly.

THESE PRODUCTS ARE FOR RESEARCH USE ONLY. Not approved for human or veterinary use, for application to humans or animals, or for use in clinical or in vitro procedures.

WARNING: CLONETICS™ AND POIETICS™ PRODUCTS CONTAIN HUMAN SOURCE MATERIAL, TREAT AS POTENTIALLY INFECTIOUS. Each donor is tested and found non-reactive by an FDA approved method for the presence of HIV-1, Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus. Where donor testing is not possible, cell products are tested for the presence of viral nucleic acid from HIV, Hepatitis B Virus, and Hepatitis C Virus. Testing can not offer complete assurance that HIV-1, Hepatitis B Virus, and Hepatitis C Virus are absent. All human sourced products should be handled at the Biological Safety Level 2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH Manual, [Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories](#), 5th Edition. If you

All trademarks herein are marks of Lonza Group or its subsidiaries.

Clonetics™ normal human osteoblasts (NHOst)

Instructions for use

Safety statements

THESE PRODUCTS ARE FOR RESEARCH USE ONLY. Not approved for human or veterinary use, for application to humans or animals, or for use in clinical or *in vitro* procedures.

WARNING: CLONETICS™ AND POIETICS™ PRODUCTS CONTAIN HUMAN SOURCE MATERIAL, TREAT AS POTENTIALLY INFECTIOUS. Each donor is tested and found non-reactive by an FDA approved method for the presence of HIV-1, hepatitis B virus and hepatitis C virus. Where donor testing is not possible, cell products are tested for the presence of viral nucleic acid from HIV, hepatitis B virus, and hepatitis C virus. Testing can not offer complete assurance that HIV-1, hepatitis B virus, and hepatitis C virus are absent. All human sourced products should be handled at the biological safety level 2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH manual, [Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories](#), 5th edition. If you require further information, please contact your site safety officer or scientific support.

Unpacking and storage instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. For cryopreserved cells – remove cryovials from the dry ice packaging and **immediately** place into liquid nitrogen storage. Alternatively, thaw and use the cells immediately. If no dry ice remains, please contact customer service.
3. For proliferating cells – swab down the flask of proliferating cells with 70% ethanol or isopropanol, then place the flask in 37°C, 5% CO₂, humidified incubator and allow to equilibrate for 3 to 4 hours. After cells have equilibrated, remove shipping medium from the flask and replace with fresh medium.
4. BulletKit™ instructions: Upon arrival, store basal medium at 4-8°C and SingleQuots™ at -20°C in a freezer that is not self-defrosting. If thawed upon arrival, growth factors can be stored at 4°C and added to basal medium within 72 hours of receipt. After SingleQuots™ are added to basal medium, use within 1 month. Do not re-freeze.
5. ReagentPack™ subculture reagents are sterile-filtered and then stored at -20°C until shipment. Subculture reagents may thaw during transport. They may be refrozen once. If you plan to use within 3 days, store at 4°C. Trypsin/EDTA

solution has a limited shelf life or activation at 4°C. If, upon arrival, trypsin/EDTA is thawed, immediately aliquot and refreeze at -20°C. We recommend that the HEPES-BSS and the trypsin neutralizing solution be stored at 4°C for no more than 1 month.

NOTE: To keep trypsin/EDTA fresh and active after thawing, you may aliquot it into sterile centrifuge tubes and re-freeze at -20°C.

Using media or reagents other than what's recommended will void the cell warranty. Please contact scientific support if you need help selecting media and/or reagents.

Preparation of media

For a BulletKit™, perform the following steps:

1. Decontaminate the external surfaces of all supplement vials and the medium bottle with ethanol or isopropanol.
2. Aseptically open each supplement vial and add the entire amount to the basal medium with a pipette.
3. Rinse each cryovial with the medium. It may not be possible to recover the entire volume listed for each cryovial. Small losses, even up to 10%, should not affect the cell growth characteristics of the supplemented medium.
4. Transfer the label provided with each kit to the basal medium bottle being supplemented. Use it to record the date and amount of each supplement added. We recommend that you place the completed label over the basal medium label (avoid covering the basal medium lot # and expiration date) to avoid confusion or possible double supplementation.
5. Record the new expiration date on the label based on the shelf life.

Note: If there is concern that sterility was compromised during the supplementation process, the entire newly prepared growth medium may be refiltered with a 0.2 µm filter to assure sterility. Routine refiltration is not recommended.

Thawing of cells / initiation of culture process

1. The recommended seeding density for NHOst is 5,000 cells/cm².
2. To set up cultures calculate the number of vessels needed based on the recommended seeding density and the surface area of the vessels being used. Do not seed cells into a well plate directly out of cryopreservation. Add the appropriate amount of medium to the vessels (1 ml/5 cm²) and allow the vessels to equilibrate in a 37°C, 5% CO₂, humidified incubator for at least 30 minutes.
3. Wipe cryovial with ethanol or isopropanol before opening. In a sterile field, briefly twist the cap a quarter turn to relieve pressure, then retighten. Quickly thaw the cryovial in a 37°C water bath being careful not to submerge the entire vial. Watch your cryovial closely; when the last sliver of ice melts remove it. Do not submerge it completely. Thawing the cells for longer than 2 minutes results in less than optimal results.
4. Resuspend the cells in the cryovial and using a micropipette, dispense cells into the culture vessels set up earlier. Gently rock the culture vessel to evenly distribute the cells and return to the incubator.
5. Centrifugation should not be performed to remove cells from cryoprotectant cocktail. This action is more damaging than the effects of DMSO residue in the culture.

Subculturing

The following instructions are for a 25 cm² flask. Adjust all volumes accordingly for other size flasks.

Note: Lonza warrants its Clonetics™ cells only if Lonza subculturing reagents are used. The recommended subculturing reagents for these cells are trypsin/EDTA (CC-5012), trypsin neutralizing solution (CC-5002), and HEPES buffered saline solution (CC-5022). These reagents can be purchased individually or together as part of the ReagentPack™ subculture reagents (CC-5034).

Preparation for subculturing the first flask:

1. Subculture the cells when they are 80% confluent and contain many mitotic figures throughout the flask.
2. For each 25 cm² of cells to be subcultured:
 - a. Thaw 2 ml of trypsin/EDTA and allow to come to room temperature.
 - b. Allow 7-10 ml of HEPES buffered saline solution (HEPES-BSS) to come to room temperature.
 - c. Allow 4 ml of trypsin neutralizing solution (TNS) to come to room temperature.

- d. Remove growth medium from 4°C storage and allow to start warming to room temperature.

3. Prepare new culture vessels.
4. Subculture 1 flask at a time. All flasks following the first flask will be subcultured following an optimization of this protocol based on calculated cell count, cell viability, and seeding density.

In a sterile field:

1. Aspirate the medium from 1 culture vessel.
2. Rinse the cells with 5 ml of room temperature HEPES-BSS. DO NOT forget this step. The medium contains complex proteins and calcium that neutralize the trypsin.
3. Aspirate the HEPES-BSS from the flask.
4. Cover the cells with 2 ml of trypsin/EDTA solution.
5. Examine the cell layer microscopically.
6. Allow the trypsinization to continue until approximately 90% of the cells are rounded up. This entire process takes about 2-6 minutes, depending on cell type.
7. At this point, rap the flask against the palm of your hand to release the majority of cells from the culture surface. If only a few cells detach, you may not have let them trypsinize long enough. Wait 30 seconds and rap again. If cells still do not detach, wait and rap every 30 seconds thereafter.
8. After cells are released, neutralize the trypsin in the flask with 4 ml of room temperature TNS. If the majority of cells do not detach within seven minutes, the trypsin is either not warm enough or not active enough to release the cells. Harvest the culture vessel as described above, and either re-trypsinize with fresh, warm trypsin/EDTA solution or rinse with TNS and then add fresh, warm medium to the culture vessel and return to an incubator until fresh trypsinization reagents are available.
9. Quickly transfer the detached cells to a sterile 15 ml centrifuge tube.
10. Rinse the flask with a final 2 ml of HEPES-BSS to collect residual cells, and add this rinse to the centrifuge tube.
11. Examine the harvested flask under the microscope to make sure the harvest was successful by looking at the number of cells left behind. This should be less than 5%.
12. Centrifuge the harvested cells at 220 x g for 5 minutes to pellet the cells.
 - a. Aspirate most of the supernatant, except for 100-200 µl.

- b. Flick the cryovial with your finger to loosen the pellet.
13. Dilute the cells in 2-3 ml of growth medium and note the total volume of the diluted cell suspension.
14. Determine cell count and viability using a hemacytometer and trypan blue. Make a note of your cell yield for later use.
15. If necessary, dilute the suspension with the HEPES-BSS to achieve the desired "cells/ml" and re-count the cells.
16. Use the following equation to determine the total number of viable cells.

$$\text{Total \# of Viable Cells} = \frac{\text{Total cell count} \times \text{percent viability}}{100}$$

17. Determine the total number of flasks to inoculate by using the following equation. The number of flasks needed depends upon cell yield and seeding density. If seeding into well plates at this time, the recommended density is 10,000 cells/cm².

$$\text{Total \# of Flasks to inoculate} = \frac{\text{Total \# of viable cells}}{\text{Growth area} \times \text{Rec. Seeding Density}}$$

18. Use the following equation to calculate the volume of cell suspension to seed into your flasks.

$$\text{Seeding Volume} = \frac{\text{Total volume of diluted cell suspension}}{\text{\# of flasks as determined in step 18}}$$

19. Prepare flasks by labeling each flask with the passage number, strain number, cell type and date.
20. Carefully transfer growth medium to new culture vessels by adding 1 ml growth medium for every 5 cm² surface area of the flask (1 ml/5 cm²).
21. After mixing the diluted cells with a 5 ml pipet to ensure a uniform suspension, dispense the calculated volume into the prepared subculture flasks.
22. If not using vented caps, loosen caps of flasks. Place the new culture vessels into a 37°C humidified incubator with 5% CO₂.

Maintenance

1. Change the growth medium the day after seeding and every other day thereafter. As the cells become more confluent, increase the volume of medium as follows: under 25% confluence then feed cells 1 ml per 5 cm², 25-45% confluence then feed cells 1.5 ml per 5 cm², over 45% confluence then feed cells 2 ml per 5 cm².

2. Warm an appropriate amount of medium to 37°C in a sterile container. Remove the medium and replace it with the warmed, fresh medium and return the flask to the incubator.
3. Avoid repeated warming and cooling of the medium. If the entire contents are not needed for a single procedure, transfer and warm only the required volume to a sterile secondary container.

Bone mineralization using differentiation SingleQuots™

Differentiation SingleQuots™ (CC-4194)

- Hydrocortisone-21-hemisuccinate, 200 µM (CC-4333) 0.5 ml
- β-Glycerophosphate, 1.0 M (CC-4399) 5.0 ml

Differentiation SingleQuots™ are made available for bone mineralization experiments. The volumes supplied are enough to supplement at least 500 ml of osteoblast growth medium (OGM™). It is likely that a smaller volume of medium may be required for the completion of an experiment, in which case, the supplements can be added to a smaller volume of OGM™ as in the example below. It is recommended that the hydrocortisone and β-glycerophosphate be titrated or used at two different volumes for initial experiments as cell strains differ in tolerance to this supplement.

Example: Using completely supplemented OGM™

1. Transfer 100 ml of OGM™ to a separate container.
2. Add the following volumes of differentiation SingleQuots™:
 - a. Hydrocortisone-21-hemisuccinate 0.1 ml (200 nM final concentration)
 - or
 - b. Hydrocortisone-21-hemisuccinate 0.2 ml (400 nM final concentration)
 - c. β-Glycerophosphate 1.0 ml (10 mM final concentration)
 - or
 - d. β-Glycerophosphate 0.75 ml (7.5 mM final concentration)

Once thawed, unused portions of supplements may be re-frozen only once and then stored at -20°C for up to 1 year.

General procedure for bone mineralization

1. Thaw the frozen amp of NHOst and grow up the cells to about 90% confluence.

2. Prepare differentiation medium using two levels of β -Glycerophosphate, and transfer 2 ml each into a well of a 6-well culture plate or other appropriate culture vessel. Transfer 2 ml of OGM™ into a third well/vessel to serve as a negative control. Equilibrate plate/vessel for a least 30 minutes in a humidified 37°C CO₂ incubator.
3. Harvest cells and seed wells/vessels with 10,000 cells per cm², and return plate to the incubator. **Note:** to minimize peeling during differentiation, coat wells with collagen before seeding the cells.
4. Change medium every 3 to 4 days or twice weekly with the appropriate medium. Examine culture at each media change to be sure that the monolayer is intact.
5. Stain culture after 3 to 4 weeks incubation for bone mineralization using von Kossa stain or appropriate method. Some lots may peel before this time and should be assayed at that time.
6. NHOst generally produce more mineralization with increasing passages.

		medium (no growth factors) (500 ml)
CC-4193	OGM™ SingleQuots™	Supplements and growth factors (FBS, ascorbic acid and gentamicin/ amphotericin-B)
CC-4194	OGM™ differentiation SingleQuots™	Hydrocortisone-21-hemisuccinate and beta-glycerophosphate

Product warranty

CULTURES HAVE A FINITE LIFESPAN *IN VITRO*. Lonza warrants its cells in the following manner only if Clonetics™ media and reagents are used.

1. Clonetics™ NHOst cryopreserved cultures are assured for experimental use for 10 population doublings.
2. Clonetics™ NHOst proliferating cultures are assured for experimental use for 5 population doublings.
3. Additional population doublings and subcultures are possible, but growth rate, biological responsiveness and function deteriorate with subsequent passage.
4. NHOst can become irreversibly contact-inhibited if allowed to reach confluence. To avoid the loss of your cells and forfeiture of your warranty, subculture cells before they reach 80% confluence.

Quality control

HIV-1, hepatitis B and hepatitis C are not detected for all donors and/or cell lots. Routine characterization of NHOst includes positive immunofluorescent staining for alkaline phosphatase and bone mineralization (von Kossa stain). For detailed information concerning QC testing, please refer to the certificate of analysis.

Ordering information

Cryopreserved cells (single donor)		
CC-2538	NHOst	≥500,000 cells
Proliferating cells		
CC-2538T25	NHOst	T-25 flask
CC-2538T75	NHOst	T-75 flask
CC2538T150	NHOst	T-150 flask
CC2538T225	NHOst	T-225 flask
Proliferating cells in plates		
CC-2538W6	NHOst	6-well plate
CC-2538W12	NHOst	12-well plate
CC-2538W24	NHOst	24-well plate
CC-2538W48	NHOst	48-well plate
CC-2538W96	NHOst	96-well plate

Related products

Osteoblast growth media (must be purchased separately):

CC-3207	OGM™ BulletKit™	Kit which contains a 500 ml bottle of OBM™, (CC-3208) and OGM™ SingleQuots™ (CC-4193).
CC-3208	OBM™	Osteoblast basal

All trademarks herein are marks of Lonza Group or its subsidiaries.



Apéndice C. Código Fuente del GA


```

#include <stdlib.h>

#include <math.h>

#include <conio.h>

#include <string.h>

#include <dos.h>

#include <alloc.h>

char nombre[10]="Z",direc[50];

char lectura[10]="z";

FILE *datos,*datosH,*datosM,*datosL;

float aleatorio(float AA, float BB, float factor);

float densidad(float C);

float viscosidad(float C);

float solucionmadre(float Q);

float diametrohilo(float z);

float factorial(int x);

float regresion1(float x, float li,float ls);

float regresion2(float x, float li, float ls);

float ap1(float dp, float P, float Y, float ang);

void ordenar(int j);

void propiedadesCov();

void propiedadesFin();

float testCov(float Vt,float Ct,float Zt,float Qt);

```

```

float cteQ=2.77778E-10; //constante para convertir mL/h a m3/s

//float densidad=1300; //kg/m3

float Ic=70E-9;      //Amperes

float *V,*C,*Z,*Q,*h,*dp,*por,*Y,*ang, *aptitud,*Vnew, *Cnew, *Qnew,*Znew;

float E,K,s,w,hr,n,fm,md,l,Af,vol,masa,dl,As,t,B,cov,afr, cov2d, nc;

float VT, IT, tT, nf;

float **Andamio,auxD; //Andamio[100][10]

float Padre[2][4],auxP1,auxCov1,auxCov2;

float LinfV,LsupV,LinfC,LsupC,LinfZ,LsupZ,LinfQ,LsupQ;

int seleccion1,seleccion2;

int i,col,individuos=1000,icol,numGen,Generaciones=200,pp=2,auxP12,auxS,contLine;

int ipc,pcCruzamiento=10,individuosCruzamiento; //porcentaje de cruzamiento

int pcCruza=10,individuosCruza; //porcentaje de cruzamiento aleatorio

int pcMutacion=10,individuosMutacion; //porcentaje de mutacion

int individuosCopia,auxCov11,auxCov22;

float difV, difC, difZ, difQ;

float medioV, medioC, medioZ, medioQ, valorCov=30.0,densi;

void main()

{

clrscr();

```

```

V=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
C=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
Z=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
Q=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
h=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
dp=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
por=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
Y=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
ang=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
aptitud=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));

Andamio=(float**)malloc(individuos*sizeof(float*)); //filas=individuos
for(icol=0;icol<individuos;icol++)
    {
        Andamio[icol]=(float*)malloc(10*sizeof(float)); //9 columnas antes 10
    }

Vnew=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
Cnew=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
Qnew=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));
Znew=(float*)malloc(individuos*sizeof(float));

srand(time(NULL));

```

```

strcpy(direc,""); //se resetea la variable direc

strcat(direc,nombre);

strcat(direc,"0.txt");

datos=fopen(direc,"w+");

for(i=0;i<individuos;i++)

{
do

    {
        LinfV=10.0; LsupV=30.0;
        V[i]=aleatorio(LinfV,LsupV,0.1);    // kV
        //V[i]=15;
        LinfC=1.0; LsupC=5.0;
        C[i]=aleatorio(LinfC,LsupC,0.1);    // g/mL*100%
        //C[i]=3;
        LinfZ=5.0; LsupZ=20.0;
        Z[i]=aleatorio(LinfZ,LsupZ,0.1);    // cm
        //Z[i]=8;
        LinfQ=0.1; LsupQ=3.0;    //10 con la sin limites
        Q[i]=aleatorio(LinfQ,LsupQ,0.01); // mL/h
        //Q[i]=1;

        auxCov1=testCov(15,3,8,1);

```

```

    propiedadesCov();
}
while (cov>valorCov);          // se cambio de cov>20 a 100
propiedadesFin();

printf("%6.5f %6.5f %6.5f %6.5f\n",V[i]/1E3,C[i],Z[i]*1E2,Q[i]/cteQ);
printf("%6.5f %6.5f %6.5f %6.5f\n",dp[i]/1E-6,por[i],Y[i],ang[i]);
printf("%6.5f %6.5f %g %6.15f\n",B,h[i]/1E-6,dl,cov);

fprintf(datos,"%5.8f %5.8f %5.8f %5.8f ",V[i]/1E3,C[i],Z[i]*1E2,Q[i]/cteQ);
fprintf(datos,"%5.8f %5.8f %5.8f %5.8f ",h[i]/1E-6,dp[i]/1E-6,por[i],Y[i]);
fprintf(datos,"%5.8f %5.8f\n",ang[i],aptitud[i]);
printf("\n");

Andamio[i][0]=V[i]/1E3;      //kV
Andamio[i][1]=C[i];      //g/ml*100%
Andamio[i][2]=Z[i]*1E2;      //cm
Andamio[i][3]=Q[i]/cteQ;      //mL/hr
Andamio[i][4]=h[i]/1E-6;      //um
Andamio[i][5]=dp[i]/1E-6;      //um
Andamio[i][6]=por[i];
Andamio[i][7]=Y[i];
Andamio[i][8]=ang[i];
Andamio[i][9]=aptitud[i];

```

```

}

fclose(datos);

ordenar(9); //Se ordena la matriz andamio en base a la aptitud col=9

//Rutina para visualizar la matriz Andamio

strcpy(direc,""); //se resetea la variable direc

strcat(direc,nombre);

strcat(direc,"0o.txt");

datos=fopen(direc,"w");

for (i=0;i<=(individuos-1);i++)

for (col=0;col<=9;col++)

{

auxD=Andamio[i][col];

if (col==9) fprintf(datos," %5.8f\n",auxD);

else fprintf(datos," %5.8f",auxD);

}

fclose(datos);

//+++++Generaciones+++++

//+++++

```

```
strcpy(direc,""); //se resetea la variable direc  
strcat(direc,lectura);  
strcat(direc,"geH");  
strcat(direc,".txt");  
datosH=fopen(direc,"w");
```

```
strcpy(direc,""); //se resetea la variable direc  
strcat(direc,lectura);  
strcat(direc,"geM");  
strcat(direc,".txt");  
datosM=fopen(direc,"w");
```

```
strcpy(direc,""); //se resetea la variable direc  
strcat(direc,lectura);  
strcat(direc,"geL");  
strcat(direc,".txt");  
datosL=fopen(direc,"w");
```

```
for (numGen=1;numGen<=Generaciones;numGen++)  
{  
contLine=0;  
  
//*****Seleccion*****
```

```

individuosCruzamiento=(pcCruzamiento*individuos)/(2*100);
for (ipc = 0; ipc < individuosCruzamiento; ipc++)
{
do
{
for(i=0;i<pp;i++)
{
do
{
seleccion1=aleatorio(0,(individuos-1),1);
seleccion2=aleatorio(0,(individuos-1),1);
}
while (seleccion1==seleccion2);
//printf("%f %f \n",Andamio[seleccion1][9],Andamio[seleccion2][9]);
if (Andamio[seleccion1][9]>Andamio[seleccion2][9])
{
Padre[i][0]=Andamio[seleccion1][0]; //V,kV
Padre[i][1]=Andamio[seleccion1][1]; //C, g/mL
Padre[i][2]=Andamio[seleccion1][2]; //cm
Padre[i][3]=Andamio[seleccion1][3]; //mL/h
//printf("%f %f %f %f \n
",Padre[i][0],Padre[i][1],Padre[i][2],Padre[i][3]);
}
else
{

```



```

        Padre[i][0]=Andamio[seleccion2][0]; //V,kV
        Padre[i][1]=Andamio[seleccion2][1]; //C, g/mL
        Padre[i][2]=Andamio[seleccion2][2]; //Q,mL/h
        Padre[i][3]=Andamio[seleccion2][3]; //Z,cm

        //printf("%f %f %f %f \n
",Padre[i][0],Padre[i][1],Padre[i][2],Padre[i][3]);

    }

} //for(i=0;i<p;i++)

////////////////////////////////////
////////////////////////////////////Comparacion padre 1 y padre 2////////////////////////////////////
auxP12=0;

for(i=0;i<4;i++)
    {
        if (Padre[0][i]==Padre[1][i]) auxP12=auxP12+1;
    }

////////////////////////////////////Cruzamiento////////////////////////////////////

auxS=aleatorio(0,3,1);

auxP1=Padre[0][auxS];

Padre[0][auxS]=Padre[1][auxS];

Padre[1][auxS]=auxP1;

auxCov1=testCov(Padre[0][0],Padre[0][1],Padre[0][2],Padre[0][3]);

```

```

auxCov2=testCov(Padre[1][0],Padre[1][1],Padre[1][2],Padre[1][3]);
if (auxCov1>valorCov) auxCov11=0; //antes cov>20
else auxCov11=1;
if (auxCov2>valorCov) auxCov22=0; //antes cov>20
else auxCov22=1;
}
while((auxCov11*auxCov22)<1);

for(i=0;i<pp;i++)
{
Vnew[contLine]=Padre[i][0];
Cnew[contLine]=Padre[i][1];
Znew[contLine]=Padre[i][2];
Qnew[contLine]=Padre[i][3];
contLine++;
}
} //end for for (ipc) /// seleccion y cruzamiento

```

```

//*****Cruza*****

```

```

individuosCruza=(pcCruza*individuos)/(2*100);

```

```

for (ipc = 0; ipc < individuosCruza; ipc++)

```

```

{
do
{

```

```

for(i=0;i<pp;i++)
{
//do

//{
seleccion1=aleatorio(0,(individuos-1),1);
//seleccion2=aleatorio(0,(individuos-1),1);
//}

//while (seleccion1==seleccion2);
//printf("%f %f \n",Andamio[seleccion1][9],Andamio[seleccion2][9]);

Padre[i][0]=Andamio[seleccion1][0]; //V,kV
Padre[i][1]=Andamio[seleccion1][1]; //C, g/mL
Padre[i][2]=Andamio[seleccion1][2]; //cm
Padre[i][3]=Andamio[seleccion1][3]; //mL/h
//printf("%f %f %f %f \n
",Padre[i][0],Padre[i][1],Padre[i][2],Padre[i][3]);
} //for(i=0;i<p;i++)

////////////////////////////////////
////////////////////////////////////Comparacion padre 1 y padre 2////////////////////////////////////
auxP12=0;
for(i=0;i<4;i++)
{
if (Padre[0][i]==Padre[1][i]) auxP12=auxP12+1;
}

```

```

//////////Cruzamiento//////////
auxS=aleatorio(0,3,1);
auxP1=Padre[0][auxS];
Padre[0][auxS]=Padre[1][auxS];
Padre[1][auxS]=auxP1;

auxCov1=testCov(Padre[0][0],Padre[0][1],Padre[0][2],Padre[0][3]);
auxCov2=testCov(Padre[1][0],Padre[1][1],Padre[1][2],Padre[1][3]);
if (auxCov1>valorCov) auxCov11=0; //antes cov>20
else auxCov11=1;
if (auxCov2>valorCov) auxCov22=0; //antes cov>20
else auxCov22=1;
}
while((auxCov11*auxCov22)<1);

for(i=0;i<pp;i++)
{
Vnew[contLine]=Padre[i][0];
Cnew[contLine]=Padre[i][1];
Znew[contLine]=Padre[i][2];
Qnew[contLine]=Padre[i][3];
contLine++;
}

```

```

    }
} //end for for (ipc) /// seleccion y cruzamiento

//*****mutacion*****

individuosMutacion=individuos*pcMutacion/100;

i=0;

do

{

    seleccion1=aleatorio(0,(individuos-1),1); //seleccion aleatoria de vector del
Andamio

    seleccion2=aleatorio(0,3,1); //seleccion aleatoria de un parametro del vector del
Antamio

    if (seleccion2==0) //V, kV

        {

            //Linf=10; Lsup=30;

            medioV=(LsupV + LinfV)/2;

            if (medioV>Andamio[seleccion1][seleccion2])

                {

                    difV=LsupV - Andamio[seleccion1][seleccion2];

                    Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] + aleatorio(1,difV,0.1);

                    Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][1]; //C

                    Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][2]; //Z

                    Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][3]; //Q

                }

        }

    auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);

```

```

        if (auxCov1>valorCov) //antes cov>20
        { contLine=contLine-1; i=i-1;}

    }
else
    {
        difV=Andamio[seleccion1][seleccion2] - LinfV;
        Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] - aleatorio(1,difV,0.1);
        Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][1]; //C
        Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][2]; //Z
        Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][3]; //Q

auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);

        if (auxCov1>valorCov) //antes cov>20
        { contLine=contLine-1; i=i-1;}

    }
} //if 0

if (seleccion2==1) //C, g/mL
    {
        //Linf=1; Lsup=3;
        medioC=(LsupC + LinfC)/2;
        if (medioC>Andamio[seleccion1][seleccion2])
            {
                Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][0]; //V

```

```

        difC=LsupC - Andamio[seleccion1][seleccion2];
        Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] + aleatorio(1,difC,0.1);
//C

        Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][2]; //Z
        Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][3]; //Q

auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);
        if (auxCov1>valorCov) //antes cov>20
        { contLine=contLine-1; i=i-1;}
        }
else
        {
        Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][0]; //V
        difC=Andamio[seleccion1][seleccion2] - LinfC;
        Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] -
aleatorio(1,difC,0.1);//C

        Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][2]; //Z
        Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][3]; //Q

auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);
        if (auxCov1>valorCov) //antes cov>20
        { contLine=contLine-1; i=i-1;}
        }
} //if 1

if (seleccion2==2) //Z, cm

```

```

{
//Linf=5; Lsup=20;
medioZ=(LsupZ + LinfZ)/2;
if (medioZ>Andamio[seleccion1][seleccion2])
{
Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][0]; //V
Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][1]; //C
difZ=LsupZ - Andamio[seleccion1][seleccion2];
Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] + aleatorio(1,difZ,0.1);
//Z

Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][3]; //Q

auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);

if (auxCov1>valorCov) //antes cov>20
{ contLine=contLine-1; i=i-1;}
}
else
{
Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][0]; //V
Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][1]; //C
difZ=Andamio[seleccion1][seleccion2] - LinfZ;
Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] - aleatorio(1,difZ,0.1);
//Z

Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][3]; //Q

auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);

```



```

        if (auxCov1>valorCov)      //antes cov>20
        { contLine=contLine-1; i=i-1;}
        }
    } //if 2

if (seleccion2==3) //Q, mL/h
{
    //Linf=0.1; Lsup=2;
    medioQ=(LsupQ + LinfQ)/2;
    if (medioQ>Andamio[seleccion1][seleccion2])
    {
        Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][0]; //V
        Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][1]; //C
        Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][2]; //Z
        difQ=LsupQ - Andamio[seleccion1][seleccion2];
        Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] +
aleatorio(0.1,difQ,0.01); //Q

auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);

        if (auxCov1>valorCov) //cov>20
        { contLine=contLine-1; i=i-1;}
        }
    else
    {
        Vnew[contLine]=Andamio[seleccion1][0]; //V

```

```

        Cnew[contLine]=Andamio[seleccion1][1]; //C
        Znew[contLine]=Andamio[seleccion1][2]; //Z
        difQ=Andamio[seleccion1][seleccion2] - LinfQ;
        Qnew[contLine]=Andamio[seleccion1][seleccion2] -
aleatorio(0.1,difQ,0.01); //Q

auxCov1=testCov(Vnew[contLine],Cnew[contLine],Znew[contLine],Qnew[contLine]);

        if (auxCov1>valorCov) //cov>20
        { contLine=contLine-1; i=i-1;}
        }
} //if 3

contLine++;

i++;
}

while (i<individuosMutacion); //for 1 to individuosMutacion

//*****Copia *****
individuosCopia=individuos*(100-pcCruzamiento-pcCruza-pcMutacion)/100;
for (i=0;i<individuosCopia;i++)
{
        Vnew[contLine]=Andamio[i][0]; //V
        Cnew[contLine]=Andamio[i][1]; //C
        Znew[contLine]=Andamio[i][2]; //Z
        Qnew[contLine]=Andamio[i][3]; //Q

```

```

contLine++;
}

////////////////////////////////////
////////////////////////////////////  Calculo de nuevas propiedades  //////////////////////////////////////
for(i=0;i<individuos;i++)
{
V[i]=Vnew[i]; //potencial electrico en kV
C[i]=Cnew[i]; //concentracion polimero/solvente en g/mL
Z[i]=Znew[i]; //distancia en cm
Q[i]=Qnew[i]; //caudal en mL/h

propiedadesCov();
propiedadesFin();

//printf("%6.5f %6.5f %6.5f %6.5f\n",V[i]/1E3,C[i],Z[i]*1E2,Q[i]/cteQ);
//printf("%6.5f %6.5f %6.5f %6.5f\n",dp[i]/1E-6,por[i],Y[i],ang[i]);
//printf("%6.5f %6.5f %g %6.15f\n",B,h[i]/1E-6,dl,cov);
//printf("\n");

Andamio[i][0]=V[i]/1E3; //kV
Andamio[i][1]=C[i]; //g/ml*100%
Andamio[i][2]=Z[i]*1E2; //cm
Andamio[i][3]=Q[i]/cteQ; //mL/hr

```

```

Andamio[i][4]=h[i]/1E-6;    //um
Andamio[i][5]=dp[i]/1E-6;    //um
Andamio[i][6]=por[i];
Andamio[i][7]=Y[i];
Andamio[i][8]=ang[i];
Andamio[i][9]=aptitud[i];
}

```

ordenar(9); //Se ordena la matriz andamio en base a la aptitud col=9

```

fprintf(datosH," %d",numGen);
fprintf(datosM," %d",numGen);
fprintf(datosL," %d",numGen);

```

//Rutina para visualizar la matriz Andamio

```

for (i=0;i<=(individuos-1);i++)
    for (col=0;col<=9;col++)
        {
            auxD=Andamio[i][col];
            if (i==0)
                {
                    if (col==9) fprintf(datosH," %5.15f\n",auxD);
                    else fprintf(datosH," %5.8f",auxD);
                }
        }

```

```
    if (i==(individuos/2-1))
        {
            if (col==9) fprintf(datosM," %5.15f\n",auxD);
            else fprintf(datosM," %5.8f",auxD);
        }
    if (i==(individuos-1))
        {
            if (col==9) fprintf(datosL," %5.15f\n",auxD);
            else fprintf(datosL," %5.8f",auxD);
        }
    }
```

```
printf("Generacion: %d\n",numGen);
```

```
} //final del ciclo for de generaciones
```

```
fclose(datosH);
```

```
fclose(datosM);
```

```
fclose(datosL);
```

```
free(V); free(C); free(Q); free(Z); free(h); free(dp); free(por);
```

```
free(Y); free(ang); free(aptitud);
```

```
for(icol=0;icol<individuos;icol++)
    {
        free(Andamio[icol]);
    }
free(Andamio);

}
```

```
float aleatorio(float AA, float BB, float factor)
{
    int A,B; float aux;
    A=AA/factor;
    B=BB/factor;
    aux=A + rand()%((B-A)+1);
    aux=aux*factor;
    return aux;
}
```

```
float densidad(float C)
{
    float densiN;
    densiN=1467.6893 + 99.99965*C;
    //densiN=1300;
```

```
return densiN;  
}
```

```
float viscosidad(float C)
```

```
{  
    float k;  
    //k=1.72636E-5 -2.65327E-5*C +1.29419E-5*C*C;  
    //k=1.7041E-5 - 2.6344E-5*C +1.29038E-5*C*C;  
    k=0.03275 - 0.05115*C +0.02405*C*C;    //nueva dinamica  
    return k;  
}
```

```
float solucionmadre(float Q)
```

```
{ float s;  
    if (Q<=4.2) s=10;  
    if ((Q>4.2) & (Q<=4.5)) s=11;  
    if ((Q>4.5) & (Q<=5.0)) s=12;  
    if ((Q>5.0) & (Q<=5.5)) s=13;  
    if ((Q>5.5) & (Q<=6.0)) s=14;  
    if ((Q>6.0) & (Q<=6.5)) s=15;  
    if ((Q>6.5) & (Q<=7.0)) s=16;  
    if ((Q>7.0) & (Q<=7.5)) s=17;  
    if ((Q>7.5) & (Q<=8.0)) s=18;  
    if ((Q>8.0) & (Q<=8.5)) s=19;
```

```

if ((Q>8.5) & (Q<=9.0)) s=20;
if ((Q>9.0) & (Q<=9.5)) s=21;
if ((Q>9.5) & (Q<=10.0)) s=22;
if ((Q>10.0) & (Q<=10.5)) s=23;
if ((Q>10.5) & (Q<=11.0)) s=24;
if ((Q>11.0) & (Q<=11.5)) s=25;
if (Q>11.5) s=26;

return s;

}

```

```

float diametrohilo(float z)

{

float h,auxh1,auxh2;

if (z<=0.10)

{

//auxh1=6*K*densidad*Q[i]*Q[i]/(M_PI*Ic*E);

auxh1=6*K*densi*Q[i]*Q[i]/(M_PI*Ic*E);

h=pow(auxh1,0.5)/z;

}

if (z>0.10)

{

//auxh2=densidad*Q[i]*Q[i]*Q[i]/(2*pow(M_PI,2)*Ic*E);

auxh2=densi*Q[i]*Q[i]*Q[i]/(2*pow(M_PI,2)*Ic*E);

h=pow(auxh2,0.25)/pow(z,0.25);

}

}

```



```
return h;  
}
```

```
float factorial(int x)
```

```
{  
    int c, fact=1;  
    for (c=1;c<=x;c++)  
        fact=fact*c;  
    return fact;  
}
```

```
float regresion1(float x, float li, float ls)
```

```
//regresion con peso x hacia ls (ls=1)
```

```
{  
    float auxy1;  
    if (x<li || x>ls)  
        auxy1=0;  
    else  
        auxy1=(x-li)/(ls-li);  
    return auxy1;  
}
```

```
float regresion2(float x, float li, float ls)
```

```
//regresion con peso de x hacia li (li=1)
```

```

{
float auxy2;
if (x<li || x>ls)
auxy2=0;
else
auxy2=-(x-ls)/(ls-li);
return auxy2;
}

```

```
float ap1(float dp, float P, float Y, float ang)
```

```

{
float auxap;

```

```
auxap=(regresion2(dp,70,530)+regresion1(P,0.35,0.99)+regresion1(Y,70,530)+regresion2(ang,0,138))/4; //cambie Y a regresion 1
```

```
//auxap=(regresion1(dp,0,10)+regresion1(P,0,0.9)+regresion1(Y,0,10)+regresion2(ang,50,106))/4; //cambie Y a regresion 1
```

```

return auxap;
}

```

```
void ordenar(int j)
```

```

{
int i,ii,jj;
float auxorden;

```

```
for (i=0; i<(individuos-1); i++)
```

```

for (ii=i+1; ii<individuos; ii++)
if (Andamio[i][j]<Andamio[ii][j])
{
for (jj=0; jj<(j+1); jj++)
{
auxorden=Andamio[i][jj];
Andamio[i][jj]=Andamio[ii][jj];
Andamio[ii][jj]=auxorden;
}
}
}

```

```

void propiedadesCov()

```

```

{
V[i]=V[i]*1E3;           // V
Z[i]=Z[i]*1E-2;         // m
E=V[i]/Z[i];            // V/m
densi=densidad(C[i]); //en kg/m3
K=viscosidad(C[i]);     // m2/s
s=solucionmadre(Q[i]);  // mL
w=(C[i]*s)/100;        // g
hr=2;                   // horas
n=Q[i]*hr;              // mL
fm=s/n;                 //

```

```

md=w/fm;                // g
Q[i]=cteQ*Q[i];
h[i]=diametrohilo(Z[i]);    // m
//VT=md/densidad;
VT=md/densi;            //VT es el volumen total de md
IT=VT/(M_PI*(h[i]/2)*(h[i]/2));
Af=M_PI*pow(h[i]/2,2);    //m2
tT=IT/Af;                //t para toda la red
nf=tT/IT;                //numero de fibras en la red
l=IT/nf;                 //lomgitud de una fibra
vol=M_PI*pow((h[i]/2),2)*l;
//masa=densidad*vol;
masa=densi*vol;
dl=masa/l;
t=l/Af;                  //kg/m2
B=t*dl;
cov=B*h[i]/dl;
}

void propiedadesFin()
{
afr=exp(-cov);          //
cov2d=log10(1/afr);     //
dp[i]=(2*h[i])/cov2d;    // m
por[i]=((cov-1)*h[i])/(((cov-1)*h[i])+(cov*0.000035));

```

```

    Y[i]=(2*(400)*por[i]*(7-5*0.3))/(por[i]*(15*pow(0.3,2) + 2*0.3 - 13) - 15*0.3*0.3 -
12*0.3 + 27);

    ang[i]=((acos(-1+(1-afrcos((85.87/180)*(M_PI))+1)))*180)/(M_PI);

    aptitud[i]=ap1(dp[i],por[i],Y[i],ang[i]);

}

```

```

float testCov(float Vt,float Ct,float Zt,float Qt)

```

```

{
    float ht,covt,auxh1,auxh2;

    Vt=Vt*1E3;           // V
    Zt=Zt*1E-2;         // m
    E=Vt/Zt;            // V/m

    densi=densidad(Ct);

    K=viscosidad(Ct);   // m2/s
    s=solucionmadre(Qt); // mL
    w=(Ct*s)/100;       // g
    hr=2;               // horas

    n=Qt*hr;           // mL

    fm=s/n;            //
    md=w/fm;           // g

    Qt=cteQ*Qt;

    if (Zt<=0.10)

```

```

    {
//    auxh1=6*K*densidad*Qt*Qt/(M_PI*Ic*E);
        auxh1=6*K*densi*Qt*Qt/(M_PI*Ic*E);
ht=pow(auxh1,0.5)/Zt;
    }

    if (Zt>0.10)
    {
//auxh2=densidad*Qt*Qt*Qt/(2*pow(M_PI,2)*Ic*E);
        auxh2=densi*Qt*Qt*Qt/(2*pow(M_PI,2)*Ic*E);
ht=pow(auxh2,0.25)/pow(Zt,0.25);
    }

//VT=md/densidad;
VT=md/densi;
IT=VT/(M_PI*(ht/2)*(ht/2));
Af=M_PI*pow(ht/2,2);    //m2
tT=IT/Af;            //t para toda la red
nf=tT/IT;            //numero de fibras en la red
l=IT/nf;            //lomgitud de una fibra
vol=M_PI*pow((ht/2),2)*l;
//masa=densidad*vol;
masa=densi*vol;    dl=masa/l;
t=l/Af;            //kg/m2
B=t*dl;
covt=B*ht/dl;

```

```
return covt;
```

```
}
```