

Universidad Nacional de Córdoba – Facultad de Ciencias Exactas Físicas y
Naturales
Ingeniería Biomédica

Proyecto Integrador

Desarrollo de un biorreactor mecánico para recelularización de matrices naturales



Alumna:
Majul, Lucía Candelaria
Matrícula:
39619891

Asesor:
Nieva, Eduardo Gabriel
Co-Asesora:
Salvatierra, Nancy Alicia



Córdoba, febrero de 2019

Agradecimientos

En estas líneas deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con soporte científico, técnico y humano han colaborado en la realización de este Proyecto Integrador.

Quiero agradecer en primer lugar a la Universidad Nacional de Córdoba por darme la oportunidad de estudiar y convertirme en una profesional; al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por abrirme las puertas y permitirme llevar a cabo todo el desarrollo de este proyecto; a la compañía 3M y a su representante Claudio Lucero por la generosidad y espíritu colaborador; a Ricardo Taborda por ponerle el corazón a este trabajo.

Muy especialmente a mis asesores, Eduardo y Nancy, por depositar su confianza en mí, por su paciencia desde mis primeros pasos en el laboratorio, por apoyarme de manera personal e institucional, y por alegrarse con cada pequeño logro alcanzado.

Destacada mención merecen las personas cuya colaboración ha sido importante en el desarrollo de este trabajo; a Nino Nobile por el soporte técnico en diseño e impresión 3D; a Mónica Sánchez e Iván Tavera Busso por su asistencia en el trabajo con fluorocromos; a Romina Gay Stabile por su colaboración en la técnica histológica de los preparados; a Carolina por su entusiasta participación en la obtención de los cortes de miocardio; y a Juan Pautasso por evacuar mis dudas desde el otro continente.

A mis profesores, que compartieron conmigo sus conocimientos para convertirme hoy en una profesional; por su tiempo, su dedicación y su pasión por la actividad docente; por contagiarme esa urgencia por entender, aprender, avanzar, descubrir y resolver problemas.

De mis compañeros, agradezco especialmente a Pablo Gattás, Antonella Sagripanti, Arturo Mollinedo, Rocío Magallanes y Yael Panero, por su colaboración activa y desinteresada; sin ellos algunas etapas de este trabajo hubieran resultado más difíciles. Así, quiero mostrar mi gratitud a todas aquellas personas que estuvieron presentes a lo largo de mi vida universitaria y que de alguna manera forman parte de la realización de esta meta que es tan importante para mí; agradezco su compañía, sus palabras motivadoras, sus conocimientos, sus consejos y las experiencias compartidas.

Finalmente, agradezco a mi familia por su cariño, comprensión y apoyo incondicional. A mis padres, Roxana y Marcelo, quienes se han esforzado para permitirme cumplir hoy un sueño más. A mis hermanos, Juan y Agustina, que comparten junto a mí cada éxito y lo celebran aun cuando no comprenden en

absoluto su significado. A mis padrinos, a mi abuela y a mis tíos, sobre todo a Daniel, quien colaboró con entusiasmo en este proyecto.

Resumen

La ingeniería de tejidos es una disciplina que tiene como objetivo principal la obtención de tejido bioartificial funcional. El logro de esta meta es posible si se utiliza un biorreactor que provea señales fisiológicamente relevantes durante el cultivo celular sobre andamios, manteniendo condiciones controladas en el medio de cultivo. En algunos tejidos, como es el caso del miocardio, un cierto nivel de control sobre el crecimiento y la diferenciación celular puede alcanzarse a través de la estimulación mecánica.

En el presente Proyecto Integrador se llevó a cabo el diseño, desarrollo e implementación de un biorreactor para estimulación mecánica uniaxial de matrices naturales recelularizadas. Utilizando la tecnología de impresión 3D y el corte laser, se obtuvo la estructura del dispositivo, sobre la cual se montaron el actuador, el control electrónico y una membrana flexible destinada a ser estirada cíclicamente por la acción de un sistema tuerca-husillo. Las membranas flexibles fueron fabricadas por el método de colada, utilizando un molde negativo de las cámaras de estiramiento comerciales. Se trabajó con matrices naturales de miocardio porcino como andamios de soporte para las células; para su obtención se llevó a cabo el proceso de descelularización por inmersión. Luego de este proceso, la matriz obtenida fue sometida a un ensayo de MTT, siguiendo los lineamientos de la norma ISO 10993-12 y 10993-5. El ensayo se realizó también para una pieza de polivinilsiloxano, material seleccionado para la fabricación de las cámaras de estiramiento.

Se verificó la eficacia del protocolo de descelularización mediante microscopía óptica usando tinción con hematoxilina-eosina. Como resultado del ensayo de citotoxicidad, se obtuvo un porcentaje de viabilidad superior al 70% en ambos materiales sometidos a prueba, indicando que los mismos no presentan potencial citotóxico. Se probó la respuesta del sistema de actuación lineal para las propiedades mecánicas de las cámaras de estiramiento; el mismo soportó la resistencia ejercida por el material en sentido opuesto, alcanzando la deformación indicada en las especificaciones técnicas. El experimento de prueba del biorreactor se realizó a lo largo de 120 h; se estimuló mecánicamente una matriz previamente recelularizada con la línea celular Vero. Al finalizar este período, se verificó la adherencia celular mediante microscopía óptica usando la tinción de hematoxilina-eosina, y microscopía de fluorescencia con diacetato de fluoresceína e yoduro de propidio que permitió diferenciar células vivas de aquellas apoptóticas.

Se logró implementar un biorreactor de bajo costo, con prestaciones acorde a las especificaciones previas y se comprobó la adherencia y penetración celular en la matriz previamente descelularizada. La marcación con fluorocromos indicó la presencia de células metabólicamente activas luego de la estimu-

lación mecánica. Estos prometedores resultados considerados en su conjunto abren a futuro nuevas líneas de trabajo.

Abstract

Tissue engineering applies the principles of engineering and life sciences toward the development of functional engineered tissue. The complexity involved in *in vivo* biological systems creates a need for bioreactors, which can closely mimic the cells microenvironment. Some cells such as cardiomyocytes are well known to have the ability to sense and respond to mechanical stimuli, and a certain level of control over cell growth and differentiation may be accomplished through stretch stimulation alone.

This project involves design, development and implementation of a stretching device that induces uniaxial mechanical strain in a recellularized native extracellular matrix. The device was obtained using the 3D printing and laser cutting technology; the actuator, the electronic control and a flexible membrane to which recellularized native extracellular matrix was anchored were then mounted onto it. Cell stretching was accomplished via nut-spindle system and flexible membranes were manufactured using negative molds to mimic the stretch chamber's morphology. Porcine heart matrices served as mechanical support for the cells; in order to obtain them, immersion decellularization process was carried out. These constructs were subsequently seeded with Vero cells for testing the stretching device on live cells populations. Previously, the obtained decellularized matrix was subjected to an MTT test, following the guidelines of ISO 10993-12 and 10993-5. The assay was also carried out for a piece of vinyl polysiloxane, which was the base polymer selected to obtain the stretch chambers.

The decellularization protocol effectiveness was verified through hematoxylin-eosin staining. The cytotoxicity assay brought out a satisfying result, showing in both cases a viability percentage above 70%. The linear actuator performance was verified using the vinyl polysiloxane chamber; it supported the resistance exerted by the material in the opposite direction and reached the deformation indicated in the specifications. The cell-stretcher test experiment involved 120 h and it included mechanical stimulation of a seeded native extracellular matrix. Then, cell adhesion was verified with hematoxylin-eosin staining, while labeling the sample with fluorescein diacetate and propidium iodide allowed the differentiation of living cells from apoptotic cells.

The development of a low-cost stretching device was successful; cell adhesion and penetration in the decellularized matrix was checked. The labeling with fluorochromes indicated the presence of metabolically active cells after mechanical stimulation. Overall, these promising results expand research to the future.

Contenido

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	5
Contenido.....	6
Índice de Figuras.....	8
Índice de Tablas.....	11
Introducción.....	12
Objetivos.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
Marco Teórico.....	14
1. Estructura del corazón.....	14
1.1. Miocardio.....	15
2. Infarto de miocardio.....	15
2.1. Cardiomioplastia celular.....	16
3. Ingeniería de Tejidos.....	17
3.1. Cultivo celular.....	18
3.2. Andamios para la Ingeniería de Tejidos.....	19
3.2.1. Biocompatibilidad- Ensayo de citotoxicidad.....	20
3.2.2. Matriz extracelular derivada de tejidos naturales.....	21
3.3. Biorreactor.....	22
3.3.1. Dispositivos para estimulación mecánica de poblaciones celulares.....	23
3.3.2. Componentes de un biorreactor mecánico.....	24
3.3.2.1. Cámaras de estiramiento.....	24
3.3.2.2. Actuador.....	25
3.3.2.3. Control electrónico.....	27
Materiales y Métodos.....	36
Especificaciones del biorreactor.....	36
Sistema de actuación.....	36
Control electrónico.....	37
Comunicación inalámbrica.....	45

Estructura del biorreactor.....	45
Membranas flexibles	48
Cultivo Celular.....	51
Obtención y descelularización de miocardio.....	55
Ensayo de citotoxicidad	56
Experimento de prueba del dispositivo	58
Marcación de células	61
Resultados	62
Impresiones 3D.....	62
Control electrónico	63
Membranas flexibles	64
Comportamiento del sistema de estiramiento	65
Descelularización de miocardio	67
Ensayo de citotoxicidad	69
Experimento de prueba.....	70
Presupuesto del proyecto	75
Conclusiones.....	77
Bibliografía y Referencias	79
Anexos	82
Anexo N° 1: dispositivos para estimulación mecánica disponibles en el mercado.....	83
Anexo N° 2: <i>firmware</i> de Arduino	87

Índice de Figuras

Figura 1: estructura del corazón.....	15
Figura 2: alteraciones cardíacas asociadas al infarto.....	16
Figura 3: tríada de la ingeniería de tejidos.	18
Figura 4: etapas para la generación de tejidos artificiales con fines terapéuticos.....	22
Figura 5: esquema de los dispositivos de estiramiento de cultivo celular 2D y 3D.....	23
Figura 6: cámara de estiramiento NST-CH-4.	24
Figura 7: cámara de estiramiento ST-CH-04.0.....	24
Figura 8: cámara de estiramiento SC4B.	25
Figura 9: disposición de bobinas en un motor PaP bipolar y unipolar.	26
Figura 10: paso y avance de un husillo de 1 entrada y 4 entradas.	27
Figura 11: Arduino Uno R3.....	28
Figura 12: <i>driver</i> A4988.....	29
Figura 13: distribución de pines sensor DHT22.....	30
Figura 14: <i>encoder</i> incremental rotatorio.....	31
Figura 15: efecto Hall.	32
Figura 16: aplicación de un sensor de Efecto Hall como final de carrera.	33
Figura 17: distribución de pines sensor Hall A3144.	33
Figura 18: módulo Bluetooth HC-05.....	34
Figura 19: disco diseñado para el <i>encoder</i> incremental.....	39
Figura 20: ilustración de la relación de estiramiento basada en el área de la cámara bajo tensión.	40
Figura 21: lógica de programación del microcontrolador.....	44
Figura 22: comunicación entre la PC y la placa Arduino con módulo Bluetooth.....	45
Figura 23: parte móvil.....	45
Figura 24: parte fija.	46
Figura 25: orificios para los sensores de temperatura y humedad y de final de carrera (Hall).	46
Figura 26: ranura en la parte móvil para alojamiento del imán.....	46
Figura 27: delimitación de la región destinada al cultivo celular.....	47
Figura 28: diseño de la tapa para resguardo de células.....	47
Figura 29: resguardo móvil del biorreactor.....	48
Figura 30: dispensador tipo HP.	50
Figura 31: silicona de adición 3M Imprint II, puntas para mezcla pequeña y grande.....	50
Figura 32: diseño de las cámaras de estiramiento.....	50
Figura 33: molde negativo de la cámara de estiramiento.....	51
Figura 34: cultivo de células Vero. Observación bajo microscopio de contraste de fases de enfoque invertido (25x).	52

Figura 35: homogeneización de las células luego de la dilución de la tripsina con medio celular.	53
Figura 36: resultado de la centrifugación de la suspensión celular.	53
Figura 37: diseño de una cámara de Neubauer.	54
Figura 38: recuento celular.....	55
Figura 39: flujo de trabajo para la descelularización por inmersión y posterior desinfección, basado en Mirsadraee <i>et al.</i> (36).....	56
Figura 40: flujo de trabajo para la preparación de extractos, basado en ISO 10993-12.	57
Figura 41: flujo de trabajo prueba de MTT, basado en ISO 10993-5.	57
Figura 42: exposición a luz UV de los componentes electrónicos del biorreactor.....	58
Figura 43: desinfección de las cámaras de estiramiento y homogeneización del monopersulfato de potasio.	58
Figura 44: posicionamiento de la matriz sobre el pocillo de la cámara de estiramiento.....	59
Figura 45: matrices secando bajo campana.....	59
Figura 46: matrices de control y estiramiento estático recelularizadas.	60
Figura 47: matriz de estiramiento cíclico recelularizada.	60
Figura 48: biorreactor posicionado dentro de la estufa de cultivo en las primeras 48 h de experimentación, sin estimulación cíclica.....	60
Figura 49: ensamblaje de las piezas impresas del biorreactor.....	62
Figura 50: montaje final del biorreactor mecánico.....	62
Figura 51: esquemático del circuito eléctrico del biorreactor.....	63
Figura 52: PCB y montaje de los componentes electrónicos del biorreactor. ..	63
Figura 53: montaje del circuito óptico del <i>encoder</i> incremental.....	64
Figura 54: fabricación de las cámaras de estiramiento.	64
Figura 55: cámaras de estiramiento de PVS.....	65
Figura 56: determinación del estiramiento efectivo del pocillo de PVS para un valor ingresado de 5,9%.....	66
Figura 57: curva de calibración del biorreactor con cámaras de estiramiento de PVS.....	67
Figura 58: parche de MEC descelularizada.	67
Figura 59: MEC descelularizada (10x). Se observan fibras extracelulares y corte transversal de los vasos sanguíneos.	68
Figura 60: MEC descelularizada (10x). Se observa un corte longitudinal de los vasos sanguíneos y la conservación de la estructura tridimensional de la matriz.	68
Figura 61: MEC descelularizada (40x). Se observan fibras extracelulares y corte longitudinal de los vasos sanguíneos.....	68
Figura 62: placa de 96 pocillos utilizada para la prueba de MTT, lista para ser leída en el lector multiplaca ELISA.....	69
Figura 63: citotoxicidad de PVS y MEC determinado mediante el ensayo de MTT (media aritmética \pm SEM).....	69

Figura 64: MEC recelularizada control (40x).	70
Figura 65: MEC recelularizada control (40x).	71
Figura 66: MEC recelularizada sometida a estiramiento estático (40x).....	71
Figura 67: MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico (40x).....	71
Figura 68: comparación entre dos matrices recelularizadas..	72
Figura 69: Micrografías de la MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico, con las correspondientes vistas ortogonales de 53,46 μm de espesor.	73
Figura 70: MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico.	74

Índice de Tablas

Tabla 1: porcentajes de estiramiento ingresados y estiramiento efectivo.	66
Tabla 2: presupuesto del proyecto.	75

Introducción

Las células vivas existen en un entorno fisiológico dinámico, y por ello están sujetas a una amplia gama de estímulos mecánicos; a partir de estos producen una respuesta bioquímica que se traduce en alteraciones en su adhesión, proliferación, locomoción, morfología, etc. El principal desafío de la ingeniería de tejidos es imitar lo que ocurre en la biología para lograr la regeneración de tejido dañado, sin embargo, ningún estímulo mecánico está presente en condiciones estándar de cultivo *in vitro*. Por ello han surgido biorreactores mecánicos que en esencia son sistemas manuales o automáticos que simulan las condiciones del entorno en el que viven las células (1).

El corazón humano es una bomba notablemente eficiente, duradera y fiable, que impulsa más de 6.000 litros diarios de sangre a través del cuerpo, y late más de 40 millones de veces por año de vida de un individuo, con lo que proporciona a los tejidos un suministro continuo de nutrientes vitales y facilita la excreción de los productos de desecho. Las enfermedades cardíacas representan la principal causa de incapacidad y muerte en las naciones industrializadas (2), pero afectan en mucha mayor medida a los países de ingresos bajos y medios: más del 80% de las defunciones por esta causa se producen en esos países. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2012 murieron 17,5 millones de personas por enfermedades cardiovasculares (3). En Argentina, estas enfermedades constituyen la principal causa de muerte; en el año 2013, sobre 326.197 muertes el 28,8% fueron enfermedades del sistema circulatorio, según datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC). El infarto agudo de miocardio (IAM) es, dentro del espectro de patologías cardiovasculares, la manifestación más agresiva de este conjunto de enfermedades, y la segunda causa de muerte como entidad individual (4).

La ingeniería de tejidos pretende brindar soluciones viables para restablecer la función miocárdica después de un infarto. Al combinar la experiencia de múltiples campos como ingeniería, biología, medicina, bioquímica y farmacología, los ingenieros de tejidos intentan crear reemplazos adecuados de tejidos capaces de restaurar la función y mejorar la calidad de vida (5). Debido a la complejidad estructural y funcional del corazón, la ingeniería tisular cardíaca actualmente centra la mirada en la obtención de parches de tejido cardíaco, para lograr en un futuro la creación del órgano completo. Estos parches obtenidos a través de la combinación de células adecuadas con andamios tridimensionales deben ser aptos para la implantación, tener la capacidad de integrarse con el resto del órgano receptor y responder sincrónicamente con el mismo, promoviendo además la angiogénesis para asegurar la supervivencia celular a largo plazo. Un parche que cumpla con estas condiciones prevendrá las dilataciones y el adelgazamiento de la pared ventricular en la zona del infarto, mejorará las propiedades mecánicas y reducirá la apoptosis de cardiomiocitos veci-

nos. El logro de estas metas es posible si se utiliza un biorreactor que provea señales fisiológicamente relevantes durante el cultivo celular, manteniendo condiciones controladas en el medio de cultivo, como pH, temperatura, contenido de oxígeno y moléculas reguladoras. Como resultado se logra una mejora en la funcionalidad y distribución de las células, por consiguiente aumenta la eficacia del tratamiento respecto de la cardiomioplastia (6).

Los biorreactores mecánicos apuntan a la creación de tejido cardíaco bioartificial funcional. Un cierto nivel de control sobre el crecimiento y la diferenciación celular y sobre la integridad del tejido puede alcanzarse a través de la estimulación mecánica. Parámetros del estiramiento como el modo (uniaxial, biaxial), la magnitud, la velocidad, la frecuencia, la forma de onda (sinusoidal, rampa, estática), y la inserción de períodos de reposo, inducen efectos reguladores a nivel celular significativos (7). En el presente Proyecto Integrador (PI) se plantea el diseño, desarrollo e implementación de un biorreactor para estimulación mecánica uniaxial de matrices porcinas recelularizadas, evaluando posteriormente el resultado global obtenido a través de un experimento final de prueba.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar un biorreactor a escala de laboratorio para cultivo celular 3D, que simule las condiciones físicas, químicas y fisiológicas tisulares para el correcto mantenimiento celular.

Objetivos Específicos

- Poner a punto la técnica de cultivo celular tanto bi como tri-dimensional en cultivo celular primario y líneas celulares.
- Diseñar e implementar un biorreactor con estimulación mecánica controlada por un software personalizado.
- Caracterizar el biorreactor física, biológica y mecánicamente.

Marco Teórico

1. Estructura del corazón

El corazón es la bomba muscular que proporciona la energía necesaria para impulsar la sangre que circula por los vasos sanguíneos de todo el organismo. Histológicamente, está constituido por endocardio, miocardio y pericardio. A nivel macroscópico, se divide en cuatro cámaras; las dos cámaras superiores se llaman aurículas o atrios y las dos cámaras inferiores se llaman ventrículos. Una pared muscular denominada tabique separa las aurículas y los ventrículos entre sí.

La aurícula derecha recibe sangre proveniente de la vena cava superior, la vena cava inferior y el seno coronario, y se conecta con el ventrículo derecho a través de la válvula tricúspide. El ventrículo derecho forma la mayor parte de la cara anterior del corazón, e internamente contiene una serie de relieves formados por haces de fibras musculares cardíacas llamados trabéculas carnosas. La válvula tricúspide se conecta a estructuras denominadas cuerdas tendinosas, las cuales a su vez se conectan con los músculos papilares. La sangre pasa desde el ventrículo derecho al tronco pulmonar por medio de la válvula pulmonar; su destino final son los pulmones, donde la sangre será oxigenada para luego dirigirse a la aurícula izquierda por medio de las venas pulmonares.

La aurícula izquierda forma la mayor parte de la base del corazón; la sangre que recibe alcanza luego el ventrículo izquierdo por medio de la válvula mitral o bicúspide. El ventrículo izquierdo forma el vértice o ápex del corazón, y al igual que el ventrículo derecho, contiene trabéculas carnosas y cuerdas tendinosas que conectan la válvula mitral a los músculos papilares. Cuando la sangre emerge del ventrículo izquierdo, pasa por la válvula aórtica hacia la aorta ascendente. Hacia esta arteria se eyecta la sangre para la circulación sistémica, es decir para todo el organismo, incluyendo las arterias coronarias que irrigan al corazón.

La pared muscular del ventrículo izquierdo es considerablemente más gruesa que la del derecho debido a que debe realizar un trabajo más intenso: bombear sangre a sectores más distantes como la cabeza y los miembros inferiores (8).

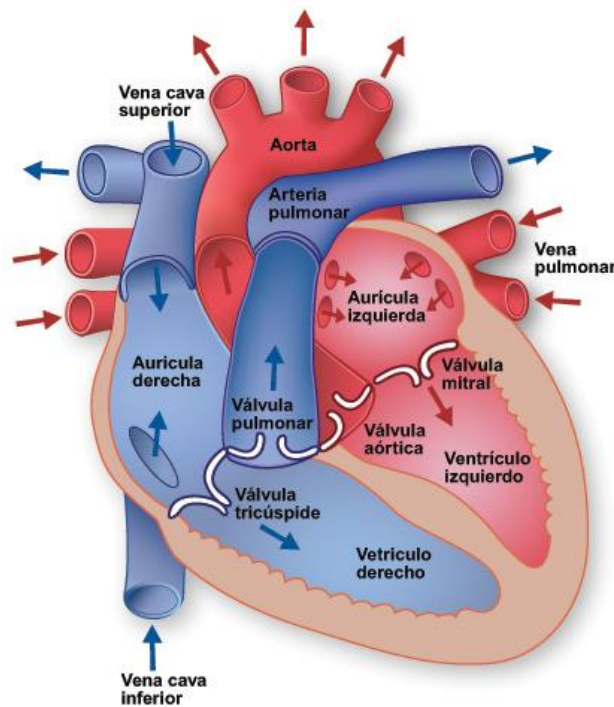


Figura 1: estructura del corazón¹.

1.1. Miocardio²

El músculo cardíaco, o miocardio, se compone sobretodo de una colección de células musculares especializadas llamadas miocitos cardíacos. Gran parte de ellas están dispuestas con una orientación circunferencial y espiral alrededor del ventrículo izquierdo. Contienen más mitocondrias entre las miofibrillas que las células musculares esqueléticas (aproximadamente el 23% del volumen celular, contra el 2%), lo que refleja la dependencia casi completa del músculo cardíaco respecto del metabolismo aerobio. El músculo ventricular se contrae durante la sístole y se relaja durante la diástole.

Los miocitos sólo comprenden el 25% del número total de células del corazón. Sin embargo, puesto que son mucho mayores que las células intermedias, representan más del 90% del volumen del miocardio. Las restantes son células endoteliales, sobre todo relacionadas con la rica red capilar miocárdica, y fibroblastos. Las células inflamatorias resultan raras y el colágeno es escaso en el miocardio normal.

2. Infarto de miocardio

El infarto agudo de miocardio se produce cuando se interrumpe el aporte sanguíneo del corazón, provocando una situación irreversible de isquemia, pérdida de células musculares cardíacas y formación de una cicatriz no con-

¹ Imagen obtenida de *Texas Heart Institute*, www.texasheart.org. Última visita: 12/12/2018.

² Robbins S, Cotran R. *Patología Estructural y Funcional*. Elsevier. 2005. Páginas 562-563.

tráctil. Es generalmente admitido que los cardiomiocitos pueden reproducirse solamente durante el desarrollo embrionario y fetal; el tejido cardíaco adulto tiene limitada capacidad de regeneración, lo que limita su habilidad para repararse a sí mismo luego de una lesión (5,9,10).

La sobrecarga de trabajo generada como consecuencia del infarto, la modificación de la geometría ventricular y la distensión de la cicatriz fibrosa producen la dilatación progresiva que evoluciona hacia la insuficiencia cardíaca congestiva (Figura 2). Los pacientes con disfunción cardíaca progresiva muestran un alto riesgo de muerte súbita y, a pesar de los grandes avances de las últimas décadas, únicamente el trasplante cardíaco consigue restablecer completamente la función cardíaca, pero su uso está limitado por el escaso número de donantes, las complicaciones que pueden derivarse del procedimiento y el costo de la inmunosupresión (5,9,10).

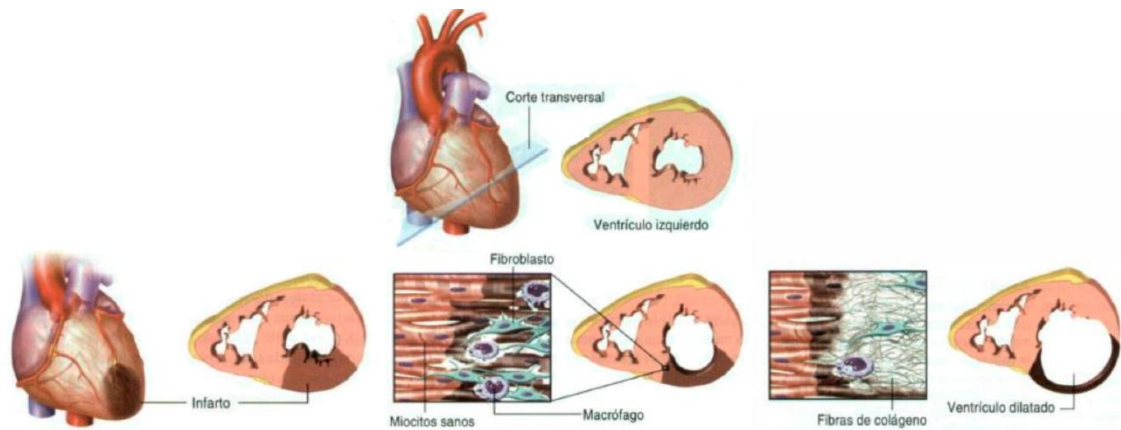


Figura 2: alteraciones cardíacas asociadas al infarto³.

2.1. Cardiomioplastia celular

La terapia celular cardíaca o cardiomioplastia celular es una técnica basada en la administración de células *in vivo*, que pretende restaurar el miocardio dañado mediante la implantación aislada de células madre cardiomiogénicas y/o angiogénicas sobre el ventrículo disfuncional. Los objetivos de esta terapia son principalmente dos: en primer lugar, se trata de suplir una parte de las células cardíacas que perdieron su capacidad de trabajo útil, y en segundo lugar se pretende utilizar esas células trasplantadas para inducir el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. La posibilidad de obtener células del propio paciente y expandirlos en cultivo evita los problemas de rechazo inmunitario (9,10).

Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos han demostrado que este procedimiento es seguro, aunque muestra un beneficio modesto en cuanto al incremento de la fracción de eyección (9,10). Se ha observado una escasa

³ Imagen obtenida de Beltrán Vargas NE, González de la Rosa CH. Técnicas de Cultivos Celulares e Ingeniería de Tejidos.

supervivencia de las células implantadas; el 95% de las células mueren, ya sea en el torrente sanguíneo, por hipoxia o porque no se integran al tejido nativo (11).

La zona de infarto se caracteriza por la acumulación de fibroblastos y la deposición excesiva de proteínas de la matriz extracelular que resultan en un aumento de la rigidez ventricular. La elasticidad de este tejido fibroso es de 35 a 70 kPa, varias veces más rígida que la del corazón adulto sano (~ 10 kPa) (12). Esto dificulta el proceso de diferenciación de las células madre implantadas, por lo tanto en el caso de que se alcance la supervivencia de un suficiente número de células, a mediano plazo se obtiene un tejido que carece de propiedades electromecánicas, lo que lo vuelve disfuncional (9,10).

3. Ingeniería de Tejidos

Las enfermedades, lesiones y traumas pueden provocar daños y degeneración de tejidos en el cuerpo humano, y se requieren tratamientos para facilitar su reparación, sustitución o regeneración. Los injertos y trasplantes constituyen posibles terapias, aunque presentan serias limitaciones debido a la escasa disponibilidad de órganos y tejidos, a los riesgos vinculados a la inmunodepresión requerida para llevar a cabo la implantación, a las probabilidades de rechazo por parte del paciente, y la introducción de una infección del donante en el receptor. Alternativamente, el campo de la ingeniería de tejidos se centra en regenerar el tejido dañado en lugar de reemplazarlo, desarrollando sustitutos biológicos que restauran, mantienen y mejoran la función del mismo (13).

El término ingeniería de tejidos o ingeniería tisular fue oficialmente acuñado en un taller de la *National Science Foundation* (NSF) en 1988, donde lo definieron como *“la aplicación de principios y métodos de ingeniería y las ciencias biológicas para la comprensión de las relaciones estructura/función en tejidos normales y patológicos, y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función del tejido”*. Actualmente, la ingeniería de tejidos puede definirse como *“la regeneración y la remodelación de tejidos in vivo con el propósito de reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función de un órgano, y el crecimiento in vitro de sustitutos de tejido funcionales para su implantación in vivo en reemplazo de tejidos dañados”* (14).

El campo de la ingeniería de tejidos se basa en el uso de andamios tridimensionales que proporcionan el sustrato adecuado para la regeneración de tejidos y órganos. Estos andamios son sembrados con células y ocasionalmente con factores de crecimiento, y pueden estar sometidos a estímulos biofísicos en un biorreactor. La combinación de células, andamios y factores bioquímicos (señales extracelulares y factores de crecimiento) se suele denominar tríada de la ingeniería de tejidos (13).

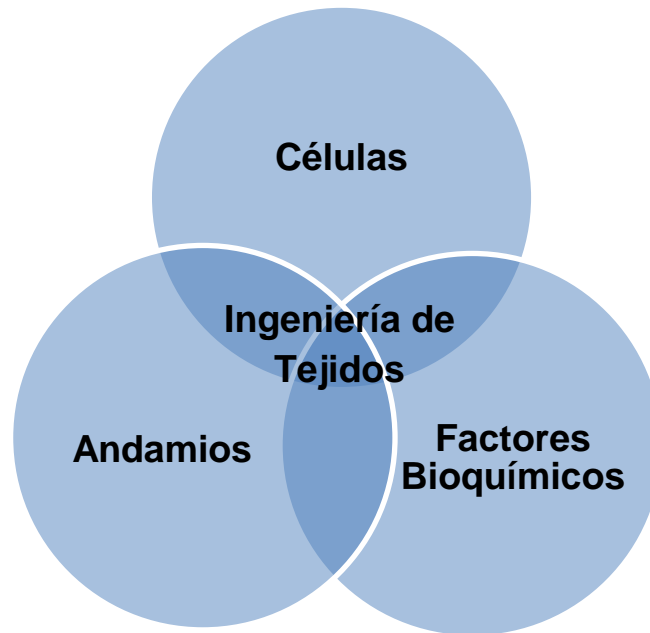


Figura 3: tríada de la ingeniería de tejidos.

3.1. Cultivo celular

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Si el cultivo es iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo se denomina cultivo primario. Si el tipo celular se divide en cultivo, entonces a partir del primer subcultivo o pasaje se denomina línea celular finita que, en general, puede sufrir unas 30-50 divisiones celulares o generaciones. Si la línea celular sufre una transformación en cultivo (espontánea o inducida) o si se trata de células derivadas de tumores que ya son inmortales, la línea celular puede crecer indefinidamente y se denomina línea celular continua.

El cultivo celular supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos; la suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente (también denominada cultivo 2D), en suspensión en el medio de cultivo, o como cultivo 3D. El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma iniciarán la proliferación. Numerosas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras. El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, y es propio de algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores (15).

Los cultivos 2D permiten establecer rápidamente los efectos biológicos de diversas sustancias sobre las células, pero entre sus desventajas se encuentran que no hay gran compatibilidad con los resultados obtenidos en estudios directamente sobre animales, ya que no pueden reproducir lo que sucede en los cultivos 3D y, aún más importante, en los tejidos, y que tienen menor poder productivo que los cultivos 3D (11).

En el momento en el que se alcanza la confluencia en el cultivo, muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando el parecido morfológico y fisiológico es máximo respecto al modelo celular de origen, y es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, repicar o propagar las células (15).

El cultivo celular se realiza en medios de cultivo artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas. La mayoría de las líneas celulares crecen bien a pH de 7,4, pero el pH óptimo para una determinada línea celular puede variar, por ejemplo, las líneas de fibroblastos normales crecen mejor a intervalos de 7,4 a 7,7, mientras que las células transformadas crecen mejor en intervalos de 7,0 a 7,4. El rojo fenol es un indicador de pH que se utiliza ampliamente en los medios de cultivo comerciales: es rosa a pH 7,6, rojo a pH 7,4, naranja a pH 7 y amarillo a pH 6,5.

La temperatura óptima para el cultivo celular depende principalmente de la temperatura corporal del organismo del que se obtuvieron las células. Así, la temperatura recomendada para líneas celulares aviares es de 38,5 °C y para células humanas es de 37 °C. Es importante controlar que la temperatura no sea mayor a la recomendada, porque las células de mamífero no toleran estar 2 °C por encima de lo normal más que unas pocas horas. En cambio, pueden sobrevivir varios días a 4 °C e inclusive, pueden congelarse a -196 °C bajo condiciones especiales para evitar la formación de cristales, adicionando dime-tilsulfóxido (DMSO) como crioprotector (11).

3.2. Andamios para la Ingeniería de Tejidos

El andamio es la principal estructura que proporciona soporte a todo tejido bioartificial. Una vez sembrado con células, se cultiva *in vitro* para luego implantarse en un sitio lesionado. También puede implantarse directamente en el sitio lesionado, utilizando los propios sistemas del cuerpo, donde la regeneración de tejidos u órganos es inducida *in vivo*.

Independientemente del tipo de tejido que vaya a albergar, una serie de consideraciones son importantes al momento de determinar la conveniencia de un andamio para su uso en ingeniería de tejidos. Por un lado, es óptimo que el andamio se reabsorba al cabo de un tiempo, de manera de permitirle a las células fabricar su propia matriz extracelular (MEC). Además, sus propiedades mecánicas deben ser similares a las del tejido que pretende restaurar, colabo-

rando de esta manera al cumplimiento de la función del tejido; desde una perspectiva más práctica, el andamio debe ser lo suficientemente resistente para permitir la manipulación quirúrgica durante la implantación. En lo que respecta a estructura, el andamio debe tener la porosidad suficiente para permitir la penetración de células y una adecuada difusión de nutrientes hacia ellas. Otra consideración a tener en cuenta es la tecnología de manufactura, ya que el desarrollo de procesos de fabricación escalables y estandarizados es de importancia crítica a fin de asegurar una transferencia exitosa de las estrategias de ingeniería de tejidos hacia la clínica.

Las células se deben adherir, funcionar normalmente y migrar a lo largo de toda la estructura del andamio. Luego de la implantación, el andamio debe inducir una reacción inmunitaria despreciable para prevenir una reacción inflamatoria severa que reduzca la curación o cause rechazo por parte del organismo huésped. Por lo tanto, es crucial que el andamio seleccionado sea biocompatible (13).

3.2.1. Biocompatibilidad- Ensayo de citotoxicidad

En la primera conferencia de la *European Society for Biomaterials* (ESB) en 1976, un biomaterial fue definido como un *“material no biológico utilizado en dispositivos médicos, destinado a interactuar con los sistemas biológicos”*. La actual definición de biomaterial de la ESB es *“material previsto para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo”* (13).

La prueba de citotoxicidad *in vitro* constituye una alternativa muy útil para la evaluación de la respuesta biológica que desencadenan los biomateriales implantables. Permite estudiar el efecto que tiene un compuesto sobre la proliferación celular así como los efectos citotóxicos directos que eventualmente conducen a una muerte celular. Sus principales ventajas residen en la rapidez con que se realizan los estudios y la relación costo/efectividad de los mismos, además de que no requiere animales de experimentación para ser llevado a cabo.

El ensayo de reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) es una de las pruebas de citotoxicidad sugeridas por la Norma ISO 10993-5; constituye un método simple y se utiliza para determinar la viabilidad celular. Esto puede cuantificarse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble, el formazán. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este producto de la reacción queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce

como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la supervivencia celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (16).

3.2.2. Matriz extracelular derivada de tejidos naturales

La MEC está compuesta por proteínas funcionales y estructurales como colágeno, elastina, laminina, fibronectina, proteoglicanos y otras glucoproteínas, combinadas y organizadas espacialmente entre sí según cada tipo de tejido. La MEC participa en múltiples procesos y respuestas celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación y migración. Estas propiedades le otorgan atractivo potencial como estructura de soporte en técnicas de ingeniería tisular cardíaca para implantar células regenerativas que sustituyan al miocardio dañado (9).

La MEC cardíaca es una red compleja que rodea y sostiene al tejido conjuntivo. Contiene aproximadamente 75-90% de colágeno (60-85% Tipo I y 15-40% Tipo III) y 25% de elastina. Cumple con diversas funciones, como son: soporte mecánico y estructural, fuerza tensora, fijación de tejidos mediante moléculas de adhesión, provisión de vías para migración, fijación y retención de factores de crecimiento que modulan la proliferación celular (11).

Las matrices descelularizadas provienen de tejidos biológicos en los cuales las células han sido eliminadas, y se preservan la estructura, la forma y los componentes de la MEC de la cual se obtienen, sin la presencia de antígenos que podrían inducir una reacción inmune. Para su correcta aplicación, las láminas de MEC deben ser convenientemente separadas del tejido nativo, descelularizadas, desinfectadas y esterilizadas. Los procesos de descelularización por inmersión directa han demostrado ser suficientes para generar matrices de soporte a partir de distintos tejidos cardiovasculares, incluyendo la pared vascular, el pericardio y las válvulas vasculares.

Existe clara evidencia de los buenos resultados que se consiguen al utilizar matrices naturales como andamios para la regeneración tisular. Wang *et al.* (17) demostraron que un parche cardíaco proveniente de miocardio porcino descelularizado, sembrado con células madre mesenquimales de médula ósea porcina, puede soportar diferenciación cardiomiogénica y angiogénesis *in vitro*. El uso de tejido animal como fuente de obtención, particularmente de tejido porcino, podría resolver la escasez crítica de tejido humano para aplicaciones quirúrgicas (5,9).

Corazones descelularizados y resembrados con células miocárdicas han demostrado función *in vitro*. Estas células muestran latir mejor en un en-

torno mecánicamente activo, que imite la elasticidad del corazón. Aquellos sustratos más firmes, que imitan mecánicamente a una cicatriz producto de un infarto, inducen un exceso de fatiga en las células y las mismas dejan de latir (1,13).

3.3. Biorreactor

Un biorreactor es cualquier dispositivo o sistema de ingeniería que soporta un medio biológicamente activo. Es un recipiente donde se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de tales organismos.

Los biorreactores cuyo objetivo es el crecimiento de células o tejidos, ya sea con propósitos experimentales o de tratamiento, tienen especificaciones de diseño que difieren en gran medida de los biorreactores industriales. Al permitir cambios reproducibles y controlados de factores ambientales específicos, estos sistemas proporcionan tanto los medios tecnológicos para estudiar mecanismos fundamentales de la función celular en un medio ambiente tridimensional, como el potencial para mejorar la calidad de los tejidos bioartificiales. Además, automatizando y estandarizando la fabricación de tejidos en sistemas cerrados controlados, los biorreactores podrían reducir costos de producción, facilitando así un uso más amplio de estos tejidos (1).

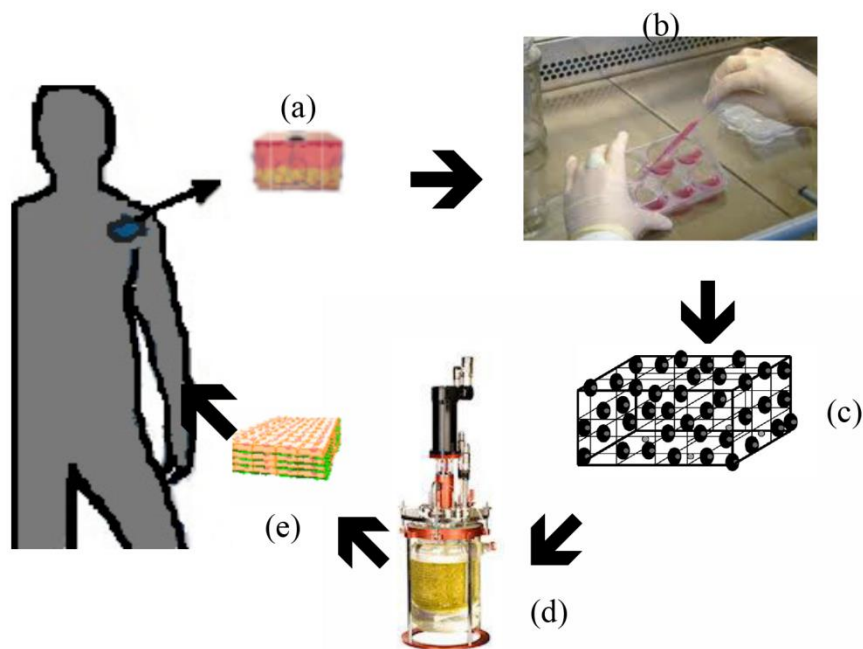


Figura 4: etapas para la generación de tejidos artificiales con fines terapéuticos. (a) Se obtiene la biopsia del tejido de interés. (b) Se aíslan y cultivan las células de interés. (c) Se forma la unión entre las células y el andamio de soporte (constructo). (d) Se introduce el constructo en un biorreactor que simule las condiciones fisiológicas del tejido en particular. (e) Se obtiene el tejido generado artificialmente, el cual será implantado en la zona de lesión⁴.

⁴ Imagen obtenida de Beltrán Vargas NE, González de la Rosa CH. Técnicas de Cultivos Celulares e Ingeniería de Tejidos.

3.3.1. Dispositivos para estimulación mecánica de poblaciones celulares

Las células y los tejidos vivos están sometidos a diversas formas de estimulación mecánica mientras desempeñan su función. Particularmente, las células del sistema cardiovascular están constantemente sujetas a esfuerzos de corte, de tracción y compresión. La estimulación mecánica afecta el destino celular, la morfología, la orientación y diferenciación.

Para estudiar este fenómeno en un ambiente controlado, se han desarrollado diversos tipos de dispositivos para estimulación mecánica de células *in vitro*, tanto uniaxiales como biaxiales. Los biorreactores mecánicos biaxiales permiten que las células se estiren a lo largo de dos ejes perpendiculares entre sí sin esfuerzo cortante, mientras que los biorreactores mecánicos uniaxiales traccionan las células en una dirección mientras éstas experimentan compresión en la dirección perpendicular. El esfuerzo cortante en estos sistemas se puede minimizar mediante un diseño cuidadoso del sistema y la geometría del sustrato (18). Algunos dispositivos para estimulación mecánica destinados a la investigación que se ofrecen en el mercado internacional se muestran en el Anexo 1.

Todos estos dispositivos están constituidos principalmente por una o más membranas flexibles que son deformadas por acción de un actuador (19). Las células se siembran sobre estas membranas como cultivo 2D o sobre andamios de cultivo que luego se anclan a las membranas, lo que constituye un cultivo 3D (Figura 5) (7).

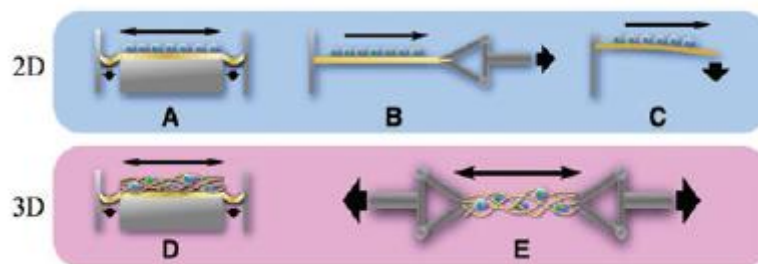


Figura 5: esquema de los dispositivos de estiramiento de cultivo celular 2D y 3D. El estiramiento de las células o del conjunto andamio/células puede alcanzarse por la deformación neumática de la membrana (A, D), traccionándola con un mecanismo de sujeción (B, E), o curvándola (C)⁵.

⁵ Imagen obtenida de Riehl BD, Park J-H, Kwon IK, Lim JY. Mechanical Stretching for Tissue Engineering: Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs.

3.3.2. Componentes de un biorreactor mecánico

3.3.2.1. Cámaras de estiramiento

Las cámaras de estiramiento son placas de cultivo flexibles desarrolladas para inducir la estimulación mecánica en células cultivadas. Se fabrican con polidimetilsiloxano (PDMS), un polímero biocompatible con buenas propiedades mecánicas y ópticas (20). Este material es capaz de recuperarse del estiramiento y la compresión, conservando sus propiedades originales intactas, lo que permite una buena reproducibilidad en aplicaciones que requieren un estiramiento mecánico continuo durante períodos de tiempo prolongados (21).

Las cámaras de estiramiento comerciales están diseñadas para la aplicación de estiramiento uniaxial o biaxial. Para el caso de estiramiento uniaxial, el área útil de cultivo puede ser de 4 cm² o 10 cm²; a continuación se listan las alternativas disponibles en el mercado para el área menor.

- NST-CH-4 *Nepagene* (Japón)

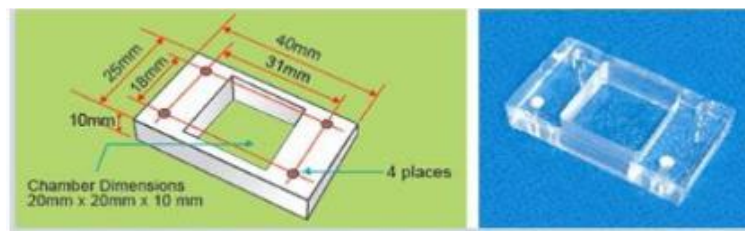


Figura 6: cámara de estiramiento NST-CH-4⁶.

- ST-CH-04.0 *Strex* (Japón)

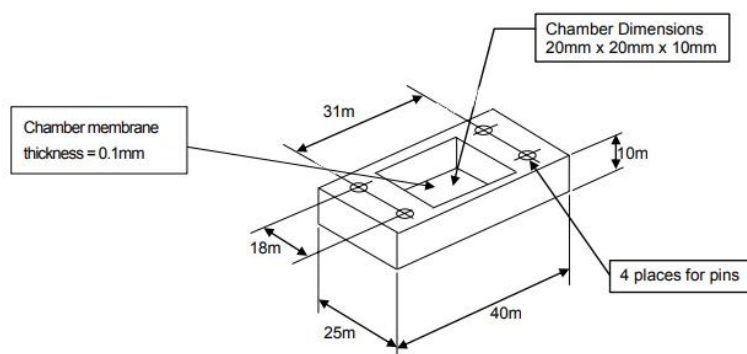


Figura 7: cámara de estiramiento ST-CH-04.0⁷.

⁶ Imagen obtenida de www.nepagene.jp. Última visita: 12/12/2018.

⁷ Imagen obtenida de *Strex Cell Strain Instrument Catalog # ST-140-04 Serial # 20A-00013 User Manual*.

- SC4B *Menicon Life Science* (Japón)

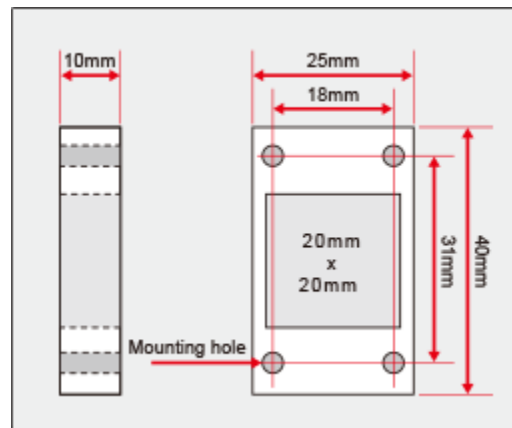


Figura 8: cámara de estiramiento SC4B⁸.

3.3.2.2. Actuador

Un actuador es un dispositivo inherentemente mecánico cuya función es proporcionar fuerza para mover otro dispositivo mecánico. Existen distintos tipos de actuadores que han sido utilizados para el estiramiento celular, entre los cuales se destacan los sistemas neumáticos y los sistemas eléctricos, constituidos por un motor paso a paso o de corriente continua. Los actuadores neumáticos utilizan el aire comprimido como fuente de energía y son muy indicados en el control de movimientos rápidos, pero de precisión limitada. Los actuadores eléctricos son más utilizados; constituyen una alternativa sofisticada para inducir estiramiento en las células por su sencillo y preciso control, con una configuración relativamente simple tanto para la aplicación de un esfuerzo estático como para estiramientos cíclicos.

Motor Paso a Paso

El motor paso a paso (PaP) es un tipo de motor eléctrico que excita sus bobinados con un cierto desfase mediante señales cuadradas. La característica principal de estos motores es que pueden moverse un paso a la vez por cada pulso que se le aplique. Este paso puede variar desde 90° hasta pequeños movimientos de tan solo 1,8°; para este último caso se necesitarán 200 pasos para completar un giro completo de 360°.

Básicamente, estos motores están constituidos por un rotor sobre el que van aplicados distintos imanes permanentes, y por un cierto número de bobinas excitadoras bobinadas en su estator. Toda la conmutación (o excitación de las bobinas) deber ser externamente manejada por un controlador.

Existen dos tipos de motores PaP de imán permanente: unipolares y bipolares (Figura 9). Los motores bipolares tienen generalmente cuatro cables de

⁸ Imagen obtenida de www.menicon-lifescience.com. Última visita: 12/12/2018.

salida, y requieren del cambio de dirección del flujo de corriente a través de las bobinas en la secuencia apropiada para realizar un movimiento.

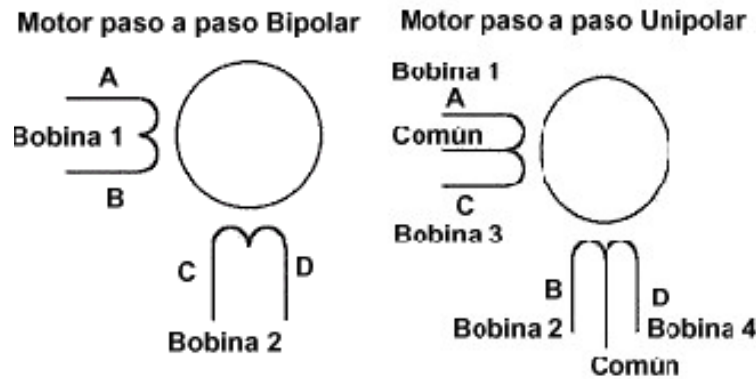


Figura 9: disposición de bobinas en un motor PaP bipolar y unipolar⁹.

Es importante destacar que los motores PaP son dispositivos mecánicos, y como tales deben vencer ciertas inercias. Por lo tanto, el tiempo de duración y la frecuencia de los pulsos aplicados es un punto muy importante a tener en cuenta. En tal sentido, el motor debe alcanzar el paso antes que la próxima secuencia de pulsos comience. Si la frecuencia de pulsos es muy elevada, el motor puede reaccionar en alguna de las siguientes formas:

- Puede que no realice ningún movimiento en absoluto.
- Puede comenzar a vibrar pero sin llegar a girar.
- Puede girar erráticamente.
- Puede llegar a girar en sentido opuesto.

Para estos motores, la máxima frecuencia admisible suele estar alrededor de los 625 Hz (22).

Sistema Tuerca-Husillo

El mecanismo husillo-tuerca está constituido por un tornillo (husillo) y una tuerca. Su funcionamiento es tal que si se mantiene fija la tuerca, el movimiento giratorio del tornillo produce un desplazamiento longitudinal.

El husillo, al igual que cualquier otro tornillo, se caracteriza por el número de entradas (e) y por el paso de la rosca (P). El avance del tornillo (A) por vuelta puede calcularse entonces a través de la siguiente fórmula:

$$A = P \times e$$

Fórmula 1: avance del tornillo.

⁹Imagen obtenida de www.hispavila.com. Última visita: 12/12/2018.

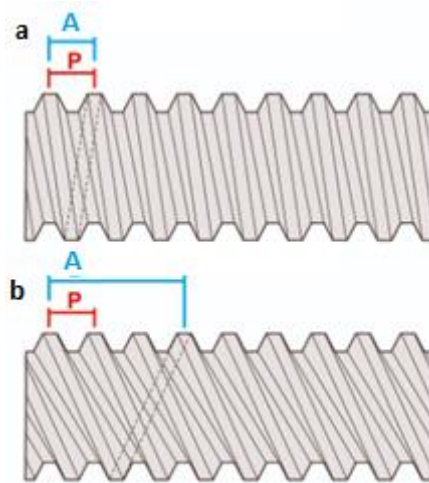


Figura 10: paso (P) y avance (A) de un husillo de 1 entrada (a) y 4 entradas (b)¹⁰.

Existen diferentes tipos de rosca en función de la forma del perfil del filete, del número de filetes que tenga, del paso de la propia rosca, y del sentido de giro de avance del tornillo. Las roscas de perfil trapezoidal se conocen como roscas trapezoidales, y se emplean principalmente para la transmisión y transformación de movimientos. Dentro de esta clasificación, las más utilizadas son las roscas tipo ACME (23).

3.3.2.3. Control electrónico

Microcontrolador

Un microcontrolador es un circuito integrado programable, capaz de ejecutar las órdenes grabadas en su memoria. Está compuesto de varios bloques, pero sus tres unidades funcionales principales son: la unidad central de procesamiento, la memoria y los periféricos de entrada/salida. En su memoria sólo reside un programa que controla el funcionamiento de una tarea determinada, y sus líneas de entrada/salida se conectan a los sensores y actuadores del dispositivo a controlar. Debido a su pequeño tamaño, suele ir integrado en el propio dispositivo al que gobierna.

Los microcontroladores permiten gobernar uno o más procesos; una de sus aplicaciones reside en la activación/desactivación de un actuador eléctrico a partir de las señales entregadas al *driver* del mismo (24).

Arduino

Arduino es una plataforma de *hardware* libre basada en una placa con un microcontrolador y un entorno de desarrollo, diseñada para facilitar el uso de la electrónica en proyectos multidisciplinarios. Dentro de las ventajas que ofrece se destacan: la asequibilidad, un entorno de programación simple y directo, *software* de código abierto (publicado bajo licencia libre) y *hardware* extensible.

¹⁰ Imagen obtenida de www.thomsonlinear.com. Última visita: 12/12/2018.

Arduino dispone de una amplia variedad de placas para usar dependiendo de las necesidades del usuario; una de ellas es la placa Arduino Uno R3 (Figura 11). Sus principales características son:

- Microcontrolador: ATmega328.
- Voltaje de funcionamiento: 5 V.
- Voltaje de entrada recomendado: 7-12 V.
- Voltaje de entrada límite: 6-12 V.
- Pines Entrada/Salida (I/O) digitales: 14, de los cuales 6 proporcionan una salida PWM (del inglés *Pulse Width Modulation*).
- Pines de entrada analógica: 6.
- Intensidad máxima por pin 40 mA.
- Intensidad en pin 3,3 V 50 mA.
- Memoria Flash: 32 KB, de los cuales 0,5 KB son utilizadas por el gestor de arranque.
- SRAM: 2 KB.
- EEPROM: 1 KB.
- Frecuencia de reloj: 16 MHz.



Figura 11: Arduino Uno R3¹¹.

Arduino Uno puede ser alimentado por la conexión USB o con una fuente de alimentación externa. La alimentación externa (no USB) puede provenir desde un adaptador AC-a-DC (*wall-wart*) o desde una batería. El adaptador puede ser conectado mediante un enchufe centro-positivo en el conector *jack* de alimentación de la placa.

Con respecto a los pines I/O digitales, algunos tienen funciones especiales:

¹¹ Imagen obtenida de www.aprendiendoarduino.wordpress.com. Última visita: 12/12/2018.

- Serial: 0 (Rx) y 1 (Tx). Usados para recibir (Rx) y transmitir (Tx) datos TTL en serie.
- Interruptores externos: los pines 2 y 3 pueden ser configurados para disparar una interrupción en un valor bajo, un flanco de subida o de bajada, o un cambio de valor.

Arduino UNO puede ser programado con el *software* Arduino. El ATmega328 contiene un cargador de arranque pregrabado que permite subirle nuevo código sin usar un programador *hardware* externo (25).

Driver

El *driver* es un elemento que se conecta entre un microcontrolador y un motor, y actúa como una válvula que controla la corriente entregada al motor. Cuando el microcontrolador envía la señal, el *driver* habilita el paso de corriente desde la fuente de alimentación a la bobina del motor.

El A4988 es un *driver* basado en el chip A4988 de *Allegro*, que permite manipular altos voltajes e intensidades requeridas por los motores PaP, además de limitar la corriente que circula por ellos. Puede proporcionar hasta 2 A por bobinado y opera desde 8 V a 35 V. Tiene salidas auto reguladas de 5 V y 3,3 V para alimentar la lógica externa sin necesidad de un regulador adicional. Para su control únicamente requieren dos salidas digitales, una para indicar el sentido de giro y otra para indicarle al motor que avance un paso (26).

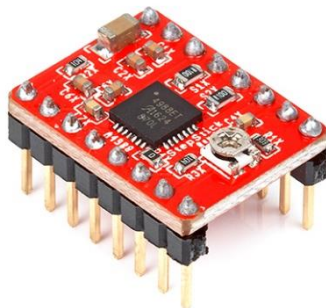


Figura 12: *driver* A4988¹².

Sensor de Temperatura y Humedad

La temperatura y la humedad del ambiente donde se cultivan células son variables que deben monitorearse debido a su importancia para alcanzar la supervivencia y el adecuado crecimiento de las células. Los sensores de humedad miden la humedad relativa (HR), y a menudo están disponibles en versiones que también miden la temperatura. Este es el caso del sensor DHT22, un sensor digital que utiliza un sensor capacitivo de humedad y un termistor para medir la temperatura del aire circundante, con solo un pin para la lectura de los datos. Su rango de medición de temperatura es de -40 °C a 80 °C con

¹² Imagen obtenida de www.rhydolabz.com. Última visita: 12/12/2018.

precisión de $\pm 0,5$ °C y resolución de $0,1$ °C; su rango de humedad es de 0 a 100% de HR con precisión de $\pm 2\%$ HR y resolución de $0,1\%$ HR. Su distribución de pines se muestra en la Figura 13.

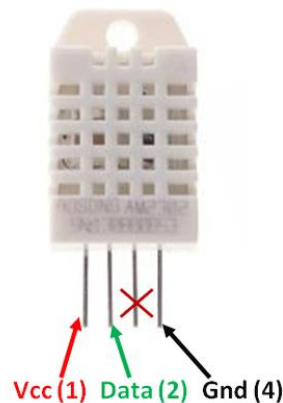


Figura 13: distribución de pines sensor DHT22¹³.

Su principal desventaja es la velocidad de las lecturas y el tiempo que debe transcurrir para tomar una nueva lectura, que es de aproximadamente 2 segundos; sin embargo, esto no resulta relevante puesto que la temperatura y la humedad no son variables que experimenten cambios rápidos en el tiempo (27).

Sensores de posición

Los sensores de posición miden la ubicación de un objeto respecto a un punto de referencia. Para el caso del biorreactor mecánico, lo que interesa determinar es la posición de la pieza móvil respecto del punto fijo de sujeción de la cámara de estiramiento, para conocer el grado de estiramiento de los pocillos sobre los cuales se montan las matrices con células.

La información sobre la posición de la pieza móvil durante el estiramiento puede obtenerse midiendo el ángulo que avanza el rotor del motor que luego se traduce en un desplazamiento lineal, utilizando un *encoder*. La posición correspondiente al punto de reposo de los pocillos, a partir de la cual se inicia un nuevo ciclo de estiramiento, puede determinarse colocando un imán permanente en la posición de detección deseada, adicionando en la parte fija un sensor de efecto Hall que responda al campo magnético del imán.

¹³ Imagen obtenida de la hoja de datos *Digital output relative humidity & temperature sensor/module DHT22*, Sparkfun.

Encoder

Un *encoder* es un dispositivo óptico digital que convierte el movimiento en una secuencia de pulsos digitales. Mediante el conteo de un solo *bit* o la decodificación de un conjunto de *bits*, los pulsos pueden convertirse en medidas relativas o absolutas. Los *encoder* pueden clasificarse según el tipo de información sobre la posición que generan; así puede hablarse de *encoder* incremental y *encoder* absoluto.

En un *encoder* incremental, la señal de salida consiste en un pulso por cada ángulo girado. El inconveniente es que no se dispone de una referencia absoluta de la posición en la que se encuentra el eje. En un *encoder* absoluto, la posición se da en valor absoluto mediante un *bus* paralelo. Es decir, para un *encoder* de 256 posiciones, se tendrá un *bus* de 8 líneas que indican en binario cuál es su posición. Normalmente estos transductores codifican la posición en código Gray para evitar errores. El inconveniente de estos *encoder* es la cantidad de líneas que se necesitan leer y conectar; debido a la complejidad del disco óptico que codifica las posiciones la resolución no suele ser muy elevada.

Ambos tipos de *encoder* pueden a su vez ser lineales y rotatorios. Los *encoder* incrementales rotatorios (Figura 14) suelen ser los más utilizados. Consisten en un disco con poca inercia que se desplaza solidario a la pieza cuya posición se desea determinar. Dicho disco posee dos tipos de zonas o sectores, con una propiedad que las diferencia, dispuestas de forma alternativa y equidistante. De este modo, un incremento de posición produce un cambio definido en la salida si se detecta dicha propiedad cambiante con la posición mediante un dispositivo o cabezal de lectura fijo.

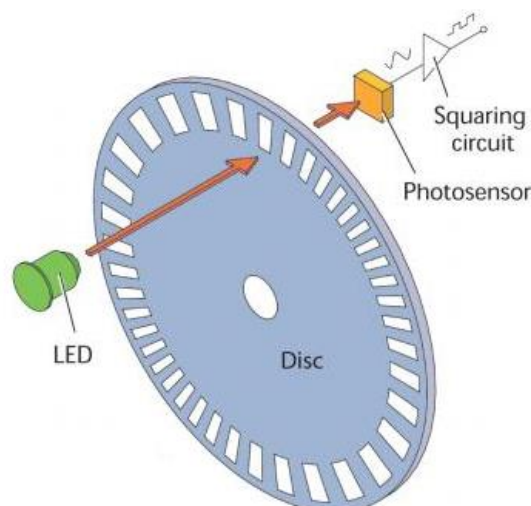


Figura 14: *encoder* incremental rotatorio¹⁴.

¹⁴ Imagen obtenida de www.machinedesign.com. Última visita: 12/12/2018.

La resolución de un sensor angular, dada como número de impulsos de salida es:

$$N = \frac{\pi \times D}{2 \times X}$$

Fórmula 2: resolución del *encoder* (N). D es el diámetro del disco y X es la anchura de la ranura codificada.

Las propiedades empleadas para la diferenciación de los sectores pueden ser magnéticas, eléctricas u ópticas. La salida básica suele ser en forma de tren de pulsos con un ciclo de trabajo del 50%. Los *encoder* ópticos pueden estar basados en sectores opacos y transparentes, en sectores reflectores y no reflectores, o en franjas de interferencia. En cualquier caso, en el cabezal de lectura fijo siempre hay una fuente de luz, normalmente un led infrarrojo, y un fotodetector (28).

Sensores magnéticos

Todos los sensores magnéticos utilizan un principio de medición similar: cuando un imán se desplaza en relación con un detector magnético, el campo magnético cambia en proporción a su desplazamiento relativo. Un tipo común de sensores magnéticos es el dispositivo de efecto Hall.

El sensor de efecto Hall consta de una placa semiconductor a través de la cual circula una corriente y, al aplicar un campo magnético B de forma perpendicular al flujo de corriente I , se genera un voltaje en los extremos del semiconductor (Figura 15). La dirección de la corriente depende del polo magnético con el cual se interactúa. El voltaje generado depende de la corriente que esté circulando y la intensidad del campo magnético que interactúa con el sensor (29).

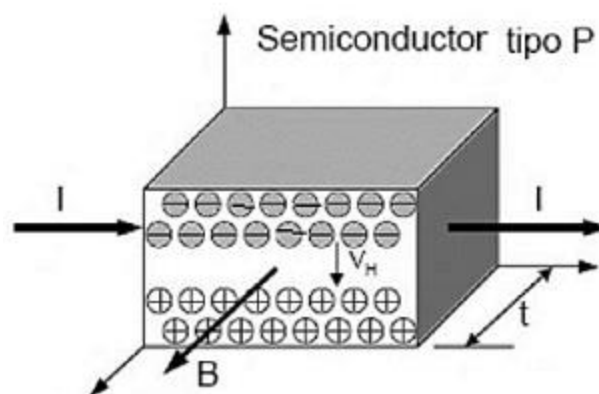


Figura 15: efecto Hall¹⁵.

¹⁵Imagen obtenida de A. Ruiz, F. García, J. Noguera, "Guía Práctica de Sensores", España, 2010.

Este tipo de sensores son de mucha utilidad, debido a que por su principio de funcionamiento son inmunes a algunos factores ambientales tales como la humedad, el humo, etc. Una de sus aplicaciones es como sensor de final de carrera; para ello se coloca un imán permanente en la posición de detección deseada, como puede observarse en la Figura 16 (30).

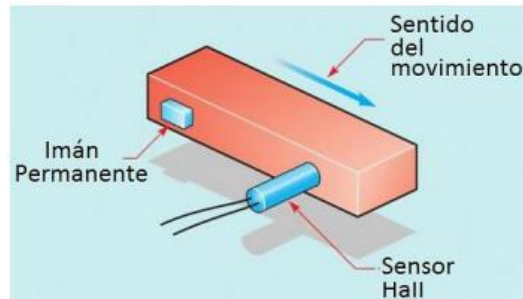


Figura 16: aplicación de un sensor de Efecto Hall como final de carrera¹⁶.

Existen dos tipos de sensores de efecto Hall: analógicos y digitales. Cuando se trata de un sensor digital solo pueden existir dos estados: ON y OFF, debido a que en su estructura interna ya tiene integrado un amplificador operacional, el cual determina un nivel de tensión necesario para establecer un estado lógico, y para su correcta salida ese estado pasa por un Schmitt *trigger*. El sensor A3144 es un sensor de este tipo, con una capacitancia de entrada de 20 pF y tres pines. No necesita de circuito antirrebotes, y su distribución de pines puede observarse en la Figura 17.

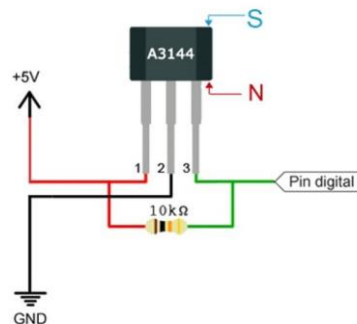


Figura 17: distribución de pines sensor Hall A3144¹⁷.

- Pin1: alimentación, que debe estar entre 4,5 y 24 V para garantizar su correcto funcionamiento.
- Pin2: tierra.

¹⁶ Imagen obtenida de S. Herman, "Industrial Motor Control", EE.UU., 2014.

¹⁷ Imagen obtenida de la hoja de datos A3141, A3142, A3143, and A3144: *Sensitive Hall Effect Switches for High-Temperature Operation*, Allegro.

- Pin3: salida, la cual se caracteriza por ser de colector abierto, es decir, necesita una resistencia de *pull-up* para regular la corriente de salida.

Su funcionamiento es sencillo: si se realiza la conexión correcta tal como lo indica la Figura 17 se tendrá en la salida un nivel lógico alto, y al acercar el polo norte de un imán permanente por la parte frontal del sensor se obtendrá en la salida un nivel lógico bajo o cero. Lo mismo sucede si se le acerca el polo sur del imán por la parte posterior del sensor; a partir de esto, se puede proceder al procesamiento de las señales obtenidas (30).

Comunicación inalámbrica-Bluetooth

Bluetooth es una especificación industrial para Redes Inalámbricas de Área Personal (WPAN, del inglés *Wireless Personal Area Network*), que posibilita la transmisión de voz y datos entre diferentes dispositivos mediante un enlace por radiofrecuencia en la banda ISM (del inglés *Industrial, Scientific and Medical*) de los 2,4 GHz. Existen tres clases de *Bluetooth*: clase 1 (con un alcance aproximado de 100 m), clase 2 (alcance de 10 m) y clase 3 (alcance de 1 m) (31).

El módulo *Bluetooth* HC-05 (Figura 18) es uno de los dispositivos más populares utilizados para añadirle la funcionalidad de la comunicación *Bluetooth* a proyectos con Arduino o microcontroladores. Se trata de un módulo de clase 2, maestro-esclavo, es decir que además de recibir conexiones desde una computadora personal o teléfono celular (modo esclavo), también es capaz de generar conexiones hacia otros dispositivos *Bluetooth* (modo maestro).

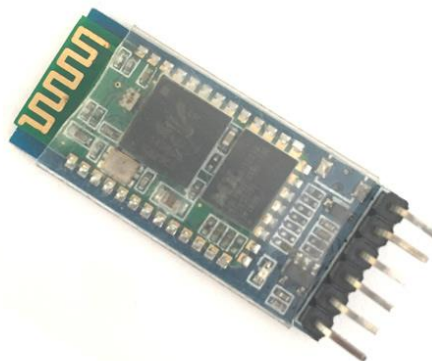


Figura 18: módulo Bluetooth HC-05¹⁸.

En lo que respecta a características del *hardware*, se destaca lo siguiente:

- Es compatible con Arduino.

¹⁸ Imagen obtenida de www.electronicaestudio.com. Última visita: 12/12/2018.

- Sensibilidad Típica: -80dBm.
- Hasta +4 dBm de potencia de transmisión RF.
- Voltaje de alimentación: 5 V.
- Interfaz UART con velocidad de modulación en baudios programable.
- Antena PCB Integrada.

Las características de *software* por su parte son:

- Velocidad en baudios (modo comandos AT): 38400, bits de datos: 8, bit de parada: 1, paridad: sin paridad.
- Tasa de velocidad de modulación en baudios soportadas: 9600, 19200, 38400, 57600, 115200, 230400, 460800.
- Auto-conexión del dispositivo con la última configuración por defecto y reconexión automática en treinta minutos cuando se desconecta como consecuencia de pérdida de conexión por salirse del rango de alcance (32).

Materiales y Métodos

Especificaciones del biorreactor

Previo al inicio del proceso de diseño y desarrollo del biorreactor, fue necesario acordar las características y funcionalidad esperada para el dispositivo, las cuales se listan a continuación:

- Modo de estiramiento: uniaxial.
- Capacidad: 3 cámaras de estiramiento de 4 cm² de área de cultivo (pocillo).
- Magnitud del estiramiento: 1-12% (0,2-2,4 mm), con paso de 0,5% (0,1 mm).
- Velocidad de estiramiento: constante, la máxima posible hasta alcanzar la magnitud de estiramiento configurada.
- Frecuencia: 0,1-2 Hz.
- Forma de onda: cuadrada, con período de reposo de igual duración que el período de retención del estiramiento.
- Modo de funcionamiento: automático.
- Apto para ser utilizado dentro de la estufa de cultivo.
- Posibilidad de detener el estiramiento durante un protocolo prolongado, de manera de poder acceder a los pocillos para la realización de tareas rutinarias.

Sistema de actuación

La deformación de los pocillos se logró con un actuador eléctrico, utilizando un motor PaP unido a un sistema tuerca-husillo, encargado de desplazar una pieza móvil ligada a un extremo de las cámaras de estiramiento, produciendo así su deformación. El extremo opuesto de las cámaras de estiramiento se atornilló en una pieza fija, donde además se empotraron sensores de posición, y de temperatura y humedad.

Se eligió trabajar con el motor PaP JK42HS34-0404 para inducir movimiento giratorio en un husillo trapezoidal ACME de 8 mm de diámetro; se optó por un husillo de estas características por el buen balance entre avance rápido, precisión y torque que ofrece. Una tuerca trapezoidal con paso de 2 mm y 4 entradas se fijó en la pieza móvil para transformar el movimiento giratorio en un desplazamiento longitudinal, provocando así el estiramiento de los pocillos. Teniendo en cuenta que el motor PaP hace 200 pasos/vuelta (1,8°/paso) y que una vuelta completa produce un desplazamiento longitudinal de 8 mm, se necesitarían 2,5 pasos para lograr un desplazamiento de 0,1 mm, correspondiente al mínimo desplazamiento del dispositivo según las especificaciones. Este valor es truncado en el programa de Arduino, por lo que el motor girará 2 pasos, correspondientes a una deformación de 0,08 mm (0,4%). En conclusión, la

fracción de vuelta del husillo mínima será de 1/100. La junta entre el motor paso a paso y el husillo se realizó con un acoplamiento flexible de 8×5 mm.

Control electrónico

Ajuste de la corriente de salida del Driver

El control de la corriente entregada al motor PaP se realizó con el *driver* A4988 de *Stepsticks*. Previamente a la conexión del motor, se ajustó la corriente de salida del *driver*, para evitar que el motor pierda pasos o se quemara por exceso de corriente. Para ello, se midió la diferencia de potencial entre el potenciómetro de ajuste y el pin GND del chip, obteniendo así el valor del potencial de referencia (V_{ref}). La corriente por fase del motor se calculó a partir de V_{ref} y la resistencia de sensibilidad (R_s), como se indica en la Fórmula 3.

$$corriente\ por\ fase = \frac{V_{ref}}{8 \times R_s}$$

Fórmula 3: corriente por fase de salida del driver a4988.

El *driver* A4988 de *Stepsticks* tiene un R_s de 0,2 Ω , y la corriente máxima por fase del motor PaP seleccionado es 0,4 A. Se decidió trabajar con pasos completos, con el propósito de que el motor genere el máximo par de trabajo durante los ciclos de estiramiento, y para disminuir la pendiente del estiramiento hasta alcanzar el valor final de retención. Por ello, se limitó la tensión al 70%, que es lo máximo que entrega el driver en modo *Full Step* (pasos completos).

$$V_{ref} = \frac{0,4\ A}{8 \times 0,2\ \Omega} \times 0,7 = 0,175\ V$$

Fórmula 4: cálculo del voltaje de referencia para la limitación de corriente del driver en modo *Full Step*.

Sensor de final de carrera

Luego de que el usuario configure el porcentaje de estiramiento del pocillo y la frecuencia, debe determinarse de la posición absoluta del pocillo, y ésta debe corresponderse con el estado de reposo de la membrana (sin estiramiento). Para ello, es necesario llevar la parte móvil del biorreactor a una posición conocida donde se encuentra el sensor de final de carrera, ubicado sobre la pieza fija. Cuando la parte móvil alcanza ese punto, se detiene el movimiento. A partir de ese momento el sistema tiene conocimiento de la posición del pocillo, y comienza la tracción del mismo, alejando la pieza móvil del extremo fijo, para luego retornar al estado anterior de reposo. Durante el estiramiento del pocillo, se utiliza la técnica del posicionamiento relativo que se explica en la sección siguiente.

Se seleccionó un sensor de efecto Hall posicionado sobre la estructura fija del biorreactor para cumplir la función de sensor de final de carrera. El mismo actúa en conjunto con un imán de neodimio que se encuentra adherido en la ranura de parte móvil diseñada para tal fin.

Encoder

Con los motores PaP, contar los pasos del motor es relativamente sencillo, porque el microprocesador que genera los impulsos para mover el motor puede al mismo tiempo contarlos. Eso eliminaría la necesidad de instalar sensores de posición; sin embargo se decidió diseñar un *encoder* incremental, para aquellas circunstancias en las que el motor pierde pasos, es decir, que por diversos motivos, generalmente mecánicos, no logra girar mientras que el sistema de control considera que el movimiento está ocurriendo. Esto produciría un estiramiento del pocillo erróneo, alterando las condiciones del protocolo definido para el experimento. Al trabajar con un elastómero cuya resistencia a la tracción es superior a la del PDMS, se introdujo una variable extra, ya que el motor PaP debió soportar una mayor tensión ejercida por el pocillo en sentido contrario.

Se diseñó un disco con zonas opacas y huecas alternadas y equidistantes, de diámetro interno igual al de la varilla roscada, es decir 8 mm (Figura 19). El mismo fue impreso en 3D con filamento de ácido poliláctico (PLA, del inglés *Polylactic Acid*) y acoplado a un circuito óptico de lectura fijo, constituido por un emisor infrarrojo y un fototransistor. El disco detecta 40 posiciones en una vuelta de 360 grados de la varilla roscada, como puede observarse en la Fórmula 5, lo que equivale a 200 pasos dados por el motor PaP. Es decir que por cada 5 pasos dados por el motor, el conteo del *encoder* se incrementa en una unidad. El error en la posición detectado por el *encoder* es por lo tanto ± 5 pasos, lo que equivale a $\pm 0,2$ mm de desplazamiento longitudinal. Si bien el mínimo desplazamiento longitudinal esperado se fijó en 0,1 mm, una resolución del *encoder* mayor excedía la capacidad del microcontrolador de captar los pulsos. Por lo tanto, desplazamientos menores a 0,2 mm son controlados exclusivamente por los pulsos que la placa Arduino envía al *driver*, sin recibir información del *encoder*.

$$N = \frac{\pi \times 23 \text{ mm}}{2 \times 0,9 \text{ mm}} = 40,14 \sim 40$$

Fórmula 5: resolución del *encoder* incremental diseñado.

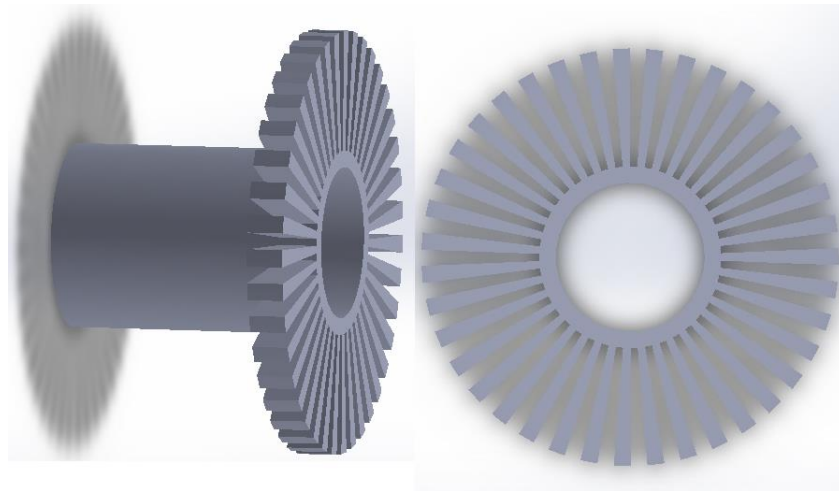


Figura 19: disco diseñado para el *encoder* incremental.

Programación Arduino

El control del *driver* y del funcionamiento general del biorreactor se realizó a través de la plataforma de *hardware* Arduino Uno R3. La programación de este último se llevó a cabo en el IDE de Arduino, un entorno de programación empaquetado como un programa de aplicación que incorpora las herramientas para cargar el programa ya compilado en la memoria flash del *hardware*.

Se utilizaron las dos interrupciones por *hardware* que admite la placa Arduino Uno, una para el *encoder* incremental (pin digital 2) y otra para el sensor de efecto Hall de final de carrera (pin digital 3). Para ambas se definió la condición de disparo y la función que se ejecuta cada vez que se dispara la interrupción (*call back function*). Esta última debe ser lo más acotada posible para garantizar que no se pierda información de las demás interrupciones mientras el microcontrolador ejecuta las instrucciones contenidas dentro de la misma.

- *Encoder* incremental: la interrupción se dispara por flanco de subida y la función que se ejecuta luego consiste en el incremento de una variable que es proporcional a la cantidad de pasos dados por el motor.
- Sensor de efecto Hall: la interrupción se dispara por flanco de bajada y la función que se ejecuta levanta una bandera indicando la ocurrencia del evento que luego se interpreta en el programa principal.

Dentro de las especificaciones del biorreactor se encuentra la posibilidad de detener el estiramiento de manera de poder acceder a los pocillos para la realización de tareas rutinarias, como el cambio de medio de cultivo. Al no contar con más pines para interrupción externa, se optó por hacer *polling* al pulsador que se presiona para detener el estiramiento. Lo más óptimo es consultar el

estado del pin al finalizar un ciclo de estiramiento, para que los pocillos se encuentren ya en estado de reposo.

Otra clase de interrupciones utilizada fue la de *timer 1*, el cual se dispara cada 4,194 segundos. La función que se ejecuta a continuación consiste en el incremento de una variable que se interpreta luego en el programa principal. Cuando la variable es igual a 855, el tiempo transcurrido es 3590,064 segundos (aproximadamente una hora). En ese momento se realiza la lectura de temperatura y humedad en el recinto donde se encuentran las células con el sensor DHT22 y se envían los valores leídos por el puerto serie, para llevar a cabo un seguimiento de las condiciones físicas en las que se cultivan las células.

La lógica del programa simplificada se muestra en la Figura 21. El usuario del biorreactor debe ingresar el porcentaje de estiramiento deseado (basado en el área de la cámara que se encontrará bajo tensión, ver Figura 20 y Fórmula 6) y la frecuencia, es decir, el número de ciclos de estiramiento y relajación por unidad de tiempo. Con estos valores se calcula la deformación del pocillo (Fórmula 7), la cantidad de pasos que debe dar el motor para alcanzar tal valor (Fórmula 8) y el tiempo de retención del estiramiento, que coincide con el de reposo (Fórmula 9). Así, por ejemplo, un estiramiento del 1% corresponde a una deformación de 0,2 mm y para ello el motor debe girar 5 pasos; un estiramiento del 12% corresponde a una deformación de 2,4 mm, que se logran con el giro de 60 pasos. Si para ambos casos se configura una frecuencia de 1 Hz, un estiramiento del 1% tendrá un tiempo de retención de 480 ms, mientras que, para un estiramiento del 12%, el tiempo de retención será de 260 ms.

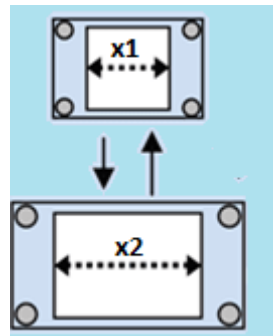


Figura 20: ilustración de la relación de estiramiento basada en el área de la cámara bajo tensión.

$$\% \text{ estiramiento} = \frac{x_2 - x_1}{x_1} \times 100$$

Fórmula 6: estiramiento del pocillo.

$$\text{deformación [mm]} = \frac{\% \text{ estiramiento}}{100} \times 20 \text{ mm}$$

Fórmula 7: cálculo de la deformación del pocillo.

$$\text{cantidad de pasos} = \text{deformación}[\text{mm}] \times \frac{200 \text{ pasos}}{8 \text{ mm}}$$

Fórmula 8: cálculo de la cantidad de pasos que debe dar el motor.

$$\text{tiempo de retención} [\text{ms}] = \frac{\frac{1 \text{ ms}}{\text{frecuencia}[\text{Hz}] \times 0.001 \text{ s}} - 4 \times 2 \text{ ms} \times \text{cantidad de pasos}}{2}$$

Fórmula 9: cálculo del tiempo de retención del estiramiento.

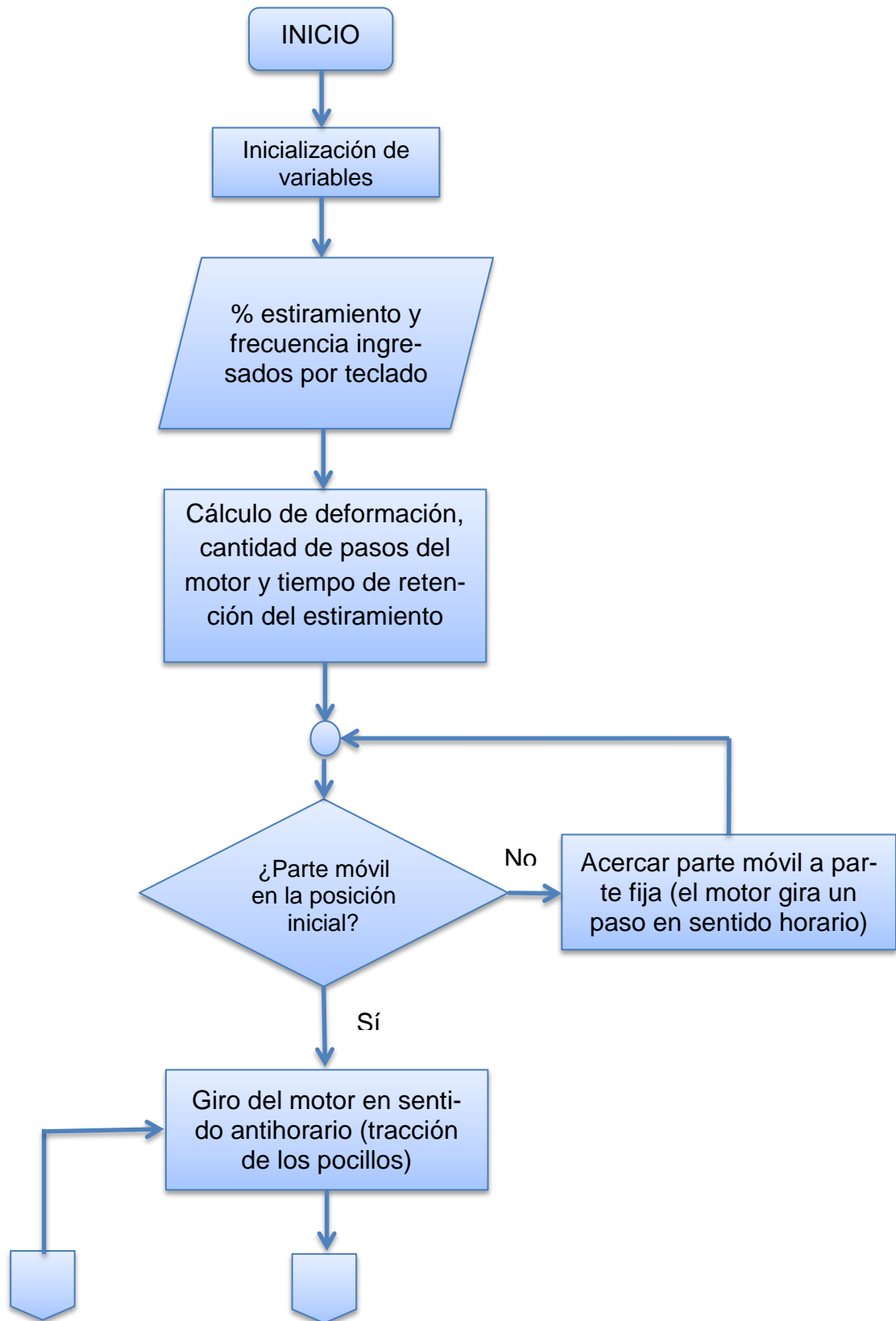
El microcontrolador verifica que la parte móvil del biorreactor se encuentre en la posición inicial, correspondiente al estado de reposo del pocillo, a través de la lectura del pin que recibe la señal proveniente del sensor de efecto Hall. En caso de no ser así, el microcontrolador envía las señales correspondientes a los pines *step* y *dir* del driver para que el motor gire en sentido horario hasta que se produzca el flanco de bajada en el pin digital 3 que desencadene la interrupción de final de carrera.

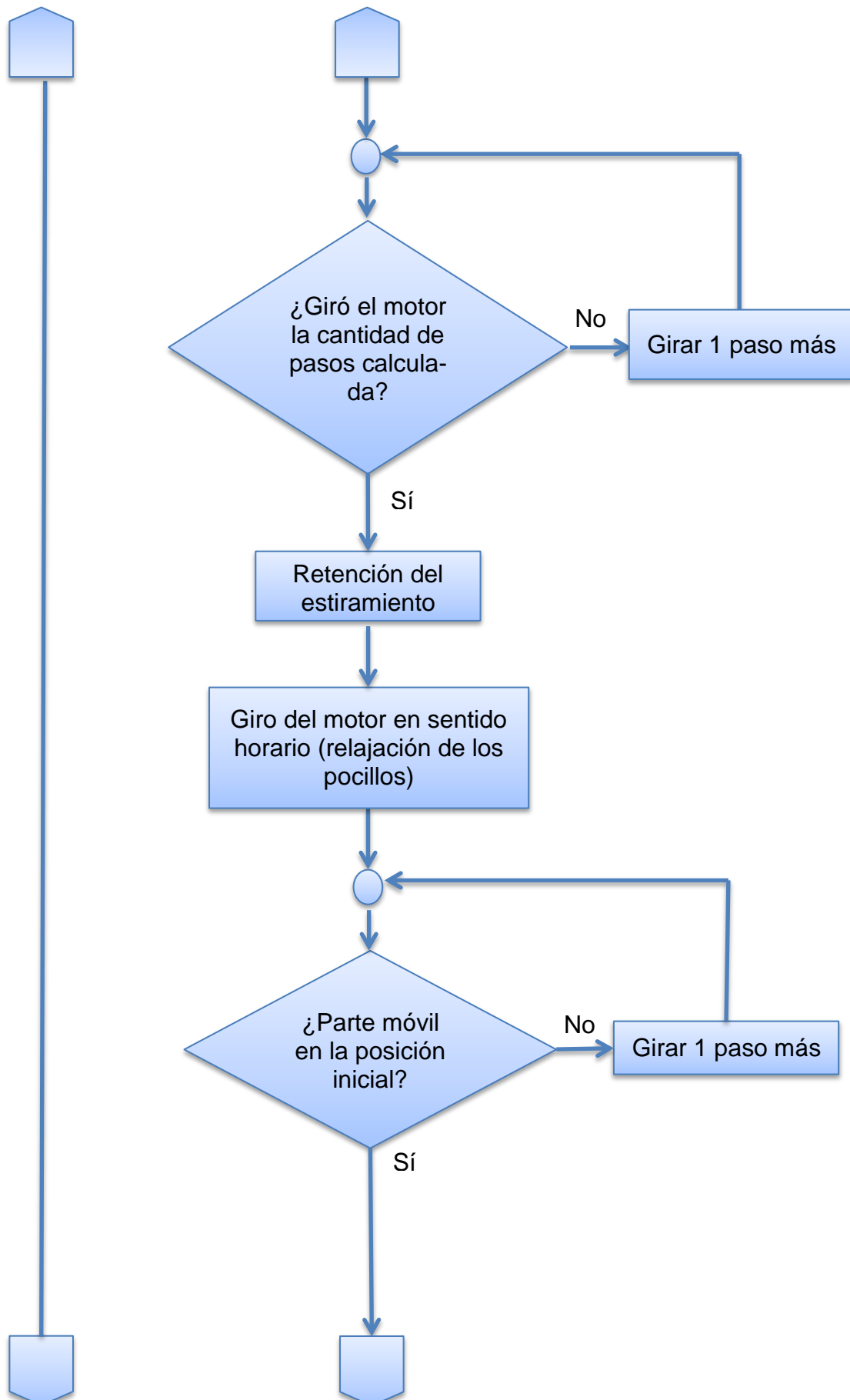
A continuación se produce el estiramiento de los pocillos, para lo cual el motor gira la cantidad de pasos calculada para detenerse una vez alcanzado el estiramiento adecuado. Para verificar que esos pasos fueron efectivamente dados por el motor, el sistema cuenta con un *encoder* incremental que gira solidariamente con la varilla roscada; si el motor ha perdido pasos por algún motivo, continúa girando en el mismo sentido hasta que se alcanza el estiramiento esperado. Posteriormente, el motor se detiene durante el tiempo de retención calculado; luego el *driver* le ordena un cambio en el sentido de giro, iniciando el acercamiento de la parte móvil a la parte fija del biorreactor hasta que se alcance la posición inicial. En ese instante se verifica que el sensor de efecto Hall haya desencadenado la interrupción indicando el estado de reposo; en caso contrario el motor continúa girando en el mismo sentido hasta que ese evento se produzca.

El programa continúa con la consulta (*polling*) del estado del pulsador para detener el estiramiento; en caso de que el mismo haya sido presionado durante el ciclo de estiramiento-relajación (se trata de un pulsador con retención), la estimulación mecánica se detiene. Una vez liberado el pulsador, se evalúa el valor de la variable que se incrementa con las interrupciones por *timer 1*, y se lee la temperatura y humedad del recinto donde se encuentran las células en caso de haber transcurrido una hora desde la medición anterior. El motor se detiene por el tiempo de retención calculado, completando así el ciclo de estimulación-relajación. Una vez transcurrido ese tiempo, se inicia un nuevo ciclo, como puede apreciarse en la Figura 21.

Si se desean modificar los parámetros de estiramiento, el sistema debe resetearse presionando un botón que conecta el pin de *Reset* de Arduino con el

pin GND. En el Anexo N° 2 puede encontrarse el *firmware* desarrollado en el entorno Arduino IDE.





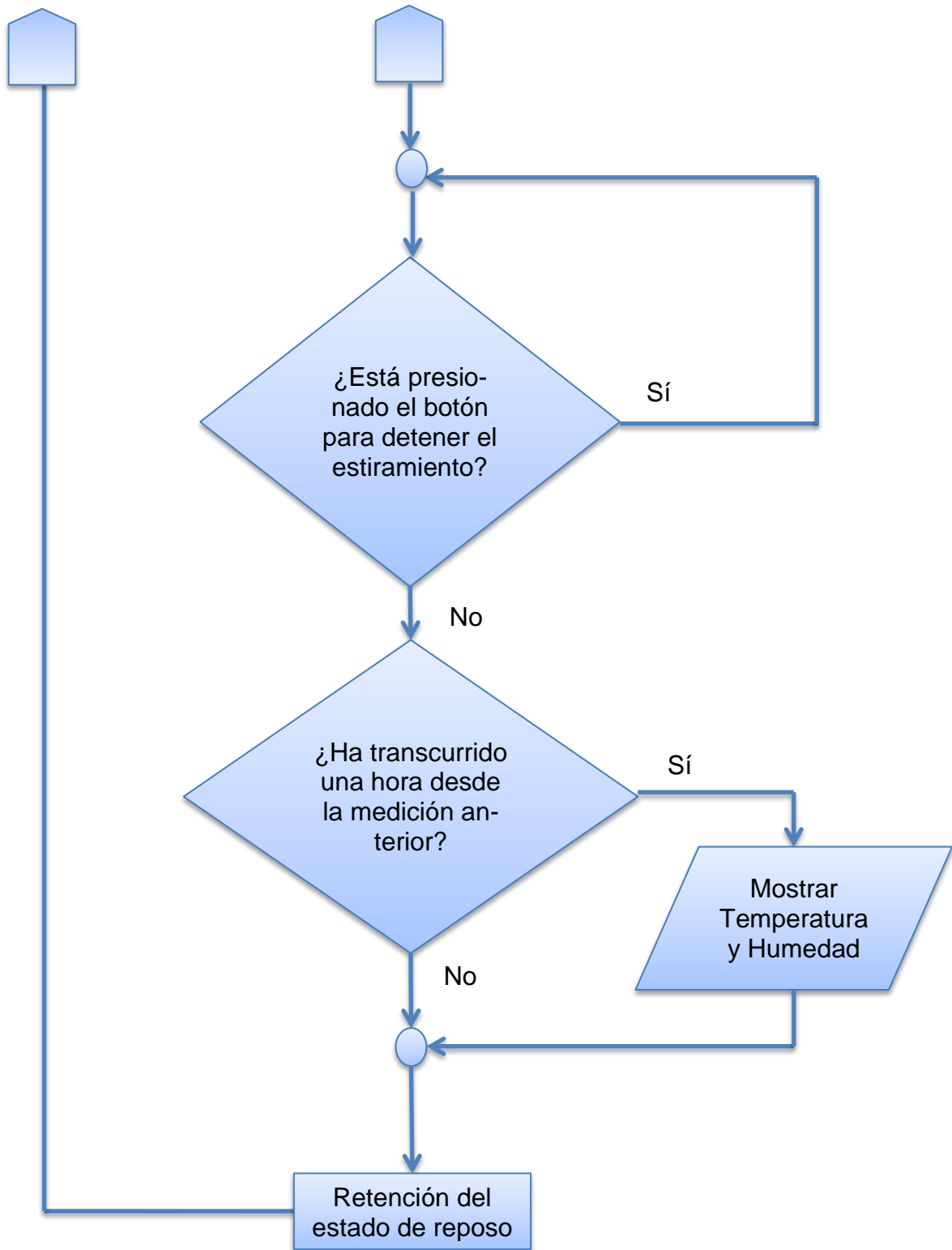


Figura 21: lógica de programación del microcontrolador.

Comunicación inalámbrica

Para facilitar la configuración de los parámetros del biorreactor y hacer un seguimiento del comportamiento del mismo desde el exterior de la sala de cultivo, se utilizó el módulo Bluetooth HC-05, configurado como esclavo. En la Figura 22 puede apreciarse la cómo se lleva a cabo la comunicación entre el monitor serial (PC) y la placa Arduino.



Figura 22: comunicación entre la PC y la placa Arduino con módulo Bluetooth.

Estructura del biorreactor

Una vez definido el sistema de actuación y de control del movimiento, se procedió al diseño de la estructura del biorreactor utilizando un *software* CAD. Se obtuvieron dos piezas, una de ellas fija y la otra móvil, y se imprimieron 3D utilizando PLA.

Sobre la pieza móvil se atornilla el extremo móvil la cámara de estiramiento, mientras que sobre la pieza fija se atornilla el extremo opuesto de la cámara. Para hacer posible la fijación de los tornillos, se realizaron seis orificios en cada una de las piezas, donde posteriormente se introdujeron las tuercas, como puede observarse en las Figuras 23 y 24.

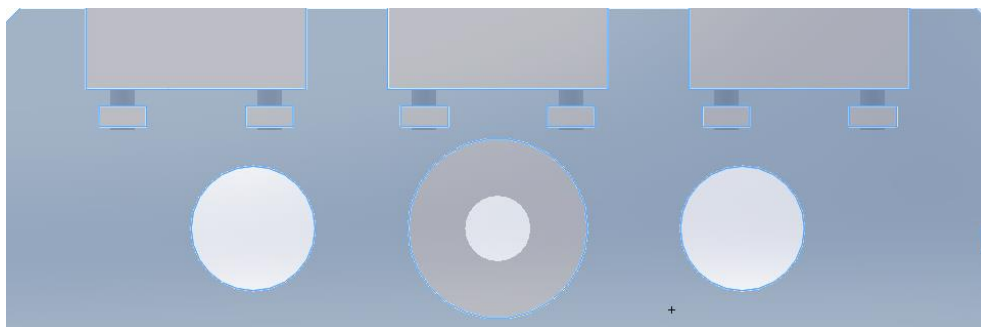


Figura 23: parte móvil.

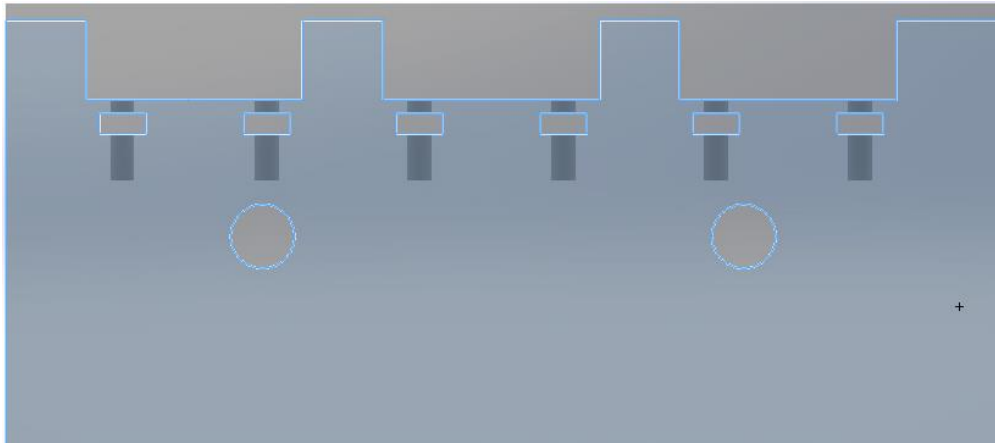


Figura 24: parte fija.

La pieza fija se diseñó además con orificios en las paredes laterales para la introducción del sensor de final de carrera y el de temperatura y humedad (Figura 25). Al trabajar con un sensor de efecto Hall, fue necesario realizar una ranura en la parte móvil del mismo lado y a la misma altura del extremo superior del orificio de la parte fija, para posteriormente colocar el imán en el punto adecuado (Figura 26).



Figura 25: orificios para los sensores de temperatura y humedad y de final de carrera (Hall).

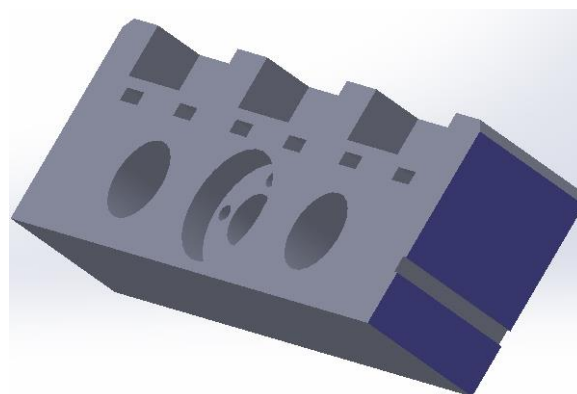


Figura 26: ranura en la parte móvil para alojamiento del imán.

La región destinada al cultivo celular fue delimitada como se observa en la Figura 27, con el propósito de disminuir el riesgo de contaminación del culti-

vo celular. En la pieza fija se incluyó un soporte para el motor PaP, y una base para el posicionamiento de la placa Arduino (Figura 27). Entre el soporte del motor y el límite del área de cultivo se previó colocar el *encoder*, y por ello se delimitó una zona para el montaje de la electrónica correspondiente al circuito óptico (Figura 27).

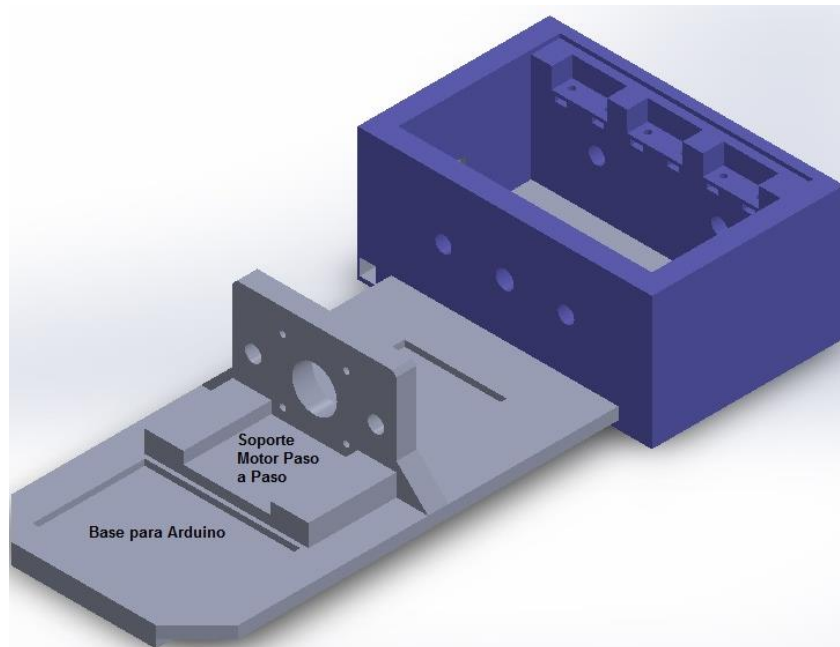


Figura 27: delimitación de la región destinada al cultivo celular.

Para resguardar las células de la contaminación y a la vez permitir la ventilación y la difusión de CO_2 hacia el medio celular, se diseñó una tapa utilizando un *software* CAD, como se puede observar en la Figura 28, y luego se obtuvo por corte laser de una plancha de acrílico.

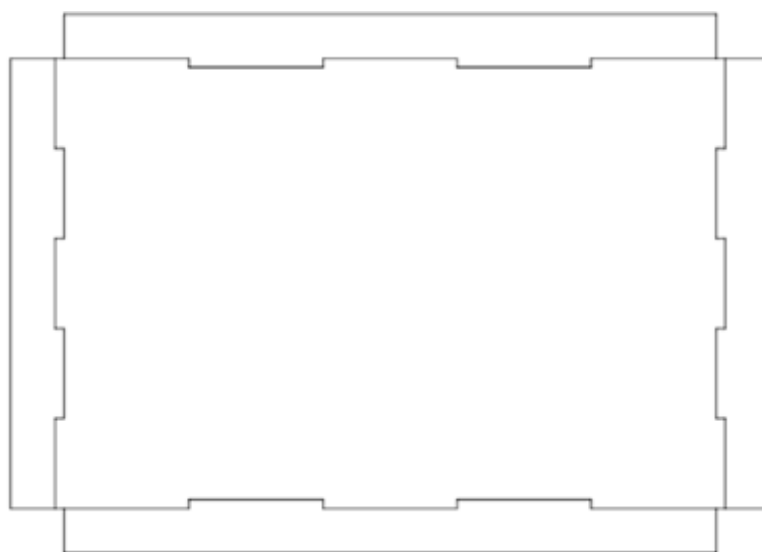


Figura 28: diseño de la tapa para resguardo de células.

Se diseñó un resguardo móvil deslizante para proteger todo el control electrónico del biorreactor e impedir el acceso al mismo, tanto a su usuario como al resto del personal de laboratorio. Esta pieza fue dividida en dos partes para mayor facilidad del montaje final del dispositivo y del acceso a los componentes para su reparación y reemplazo ocasional en el futuro. Se incluyeron dos orificios para la colocación de botones con tuercas, con los que interactúa el usuario durante la operación normal del biorreactor, y un orificio rectangular que es atravesado por los cables de alimentación de 5 V y 12 V (Figura 29).

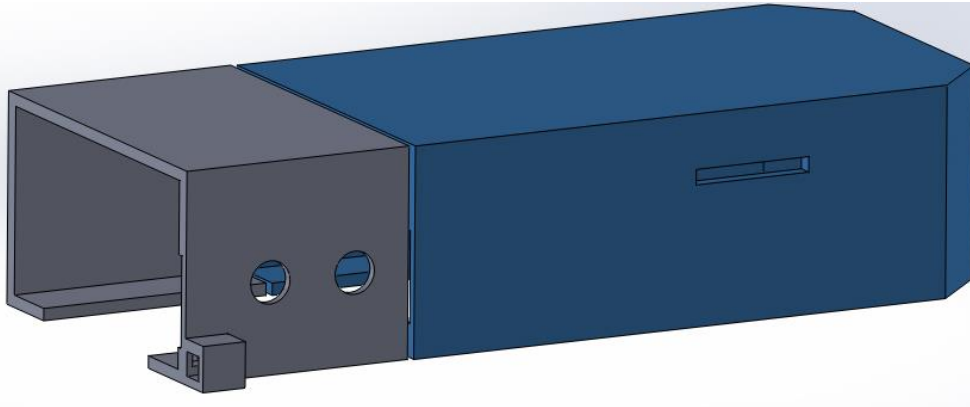


Figura 29: resguardo móvil del biorreactor.

Por último, se ideó una base para dar soporte a todo el biorreactor y facilitar su traslado desde la estufa de cultivo a la campana de flujo laminar, donde se realizan los cambios de medio de cultivo y demás tareas de rutina; y viceversa. Se optó por una estructura rectangular de vidrio de 4 mm de espesor por su fácil limpieza y su bajo costo. Entre el vidrio y el dispositivo se dispuso una capa de espuma de polietileno expandido de 10 mm de espesor como aislante vibratorio, para prevenir que pequeñas vibraciones provenientes de la estimulación mecánica provoquen un crecimiento celular desigual sobre la superficie de los demás recipientes de cultivo presentes en la estufa de cultivo (11).

Membranas flexibles

El PDMS es el material estándar utilizado para cultivar células sometidas a un esfuerzo mecánico. Sus propiedades mecánicas, ópticas y su biocompatibilidad lo convierten en la mejor alternativa disponible. Se comercializan cámaras de estiramiento con un área de cultivo de 4cm^2 ; sin embargo, en Argentina este producto no se encuentra disponible, y los costos de importarlo exceden el alcance de este PI. Por lo tanto, se fabricaron las cámaras de estiramiento de 4cm^2 , utilizando un material con propiedades semejantes a las del PDMS, principalmente su capacidad de deformarse elásticamente, y su biocompatibilidad. El material seleccionado fue la silicona de adición.

La silicona de adición es un elastómero muy utilizado como material de impresión en odontología, para coronas y puentes fijos, en impresiones de pró-

tesis totales o parciales y para registro de mordida, razón por la cual suele recibir los nombres de materiales de impresión de polivinilsiloxano (PVS) o vinil polisiloxano (VPS). Sus principales componentes son el polímero, que termina en grupos vinilo, y el oligómero de silano que ofrece los grupos necesarios para el entrecruzamiento del polímero, además de catalizadores y partículas de relleno. Sus componentes se presentan en dos pastas que al mezclarse producen el entrecruzamiento de las cadenas del polímero con grupos silanos polimerizando mediante una reacción de adición que no desprende productos colaterales, lo que ocasiona menores cambios dimensionales.

Este material se presenta en consistencia tipo fluida y masilla (*putty*). La silicona fluida se encuentra disponible en cartuchos separados, de automezcla con la ayuda de un dispositivo tipo pistola permitiendo una correcta proporción de mezclado de ambas pastas al dosificarlas en igual cantidad sin la presencia de burbujas.

La silicona de adición es un material hidrofóbico, lo cual resulta importante para la retención del medio de cultivo dentro del pocillo donde se cultivan las células. Sin embargo, las pastas comerciales actuales poseen como aditivo un surfactante no aniónico que disminuye la tensión superficial y, en consecuencia, mejora la mojabilidad del fluido, volviéndolo más hidrofílico. Por otro lado, la silicona de adición presenta una excelente fluidez y mayor elasticidad que la silicona de condensación, pero su módulo de elasticidad ronda alrededor de 6,89 MPa (33), mientras que las cámaras de estiramiento de PDMS tienen un módulo de elasticidad de 1 MPa (12). En cuanto a sus propiedades biológicas, cabe destacar que se encuentran entre los materiales causantes del menor número de reacciones tóxicas o irritativas de los tejidos, considerándose de una muy buena biocompatibilidad (33,34).

Se trabajó con la silicona de adición de consistencia liviana 3M Imprint II de baja viscosidad. La mezcla de los componentes del cartucho se realizó utilizando el dispensador tipo HP (Figura 30) y las puntas para mezcla grandes y pequeñas (Figura 31) (35). Las cámaras de estiramiento se obtuvieron por el método de colada, con un molde negativo diseñado en un *software* CAD, con las medidas de las cámaras de 4 cm² comerciales. El molde fue luego impreso en 3D utilizando el filamento *Polysmooth* PVB 3D, y posteriormente se eliminaron las capas de impresión utilizando una unidad de limpieza (*Polysher*, *Poly-maker*, China). El resultado obtenido puede observarse en la Figura 33.



Figura 30: dispensador tipo HP.



Figura 31: silicona de adición 3M Imprint II, puntas para mezcla pequeña y grande.

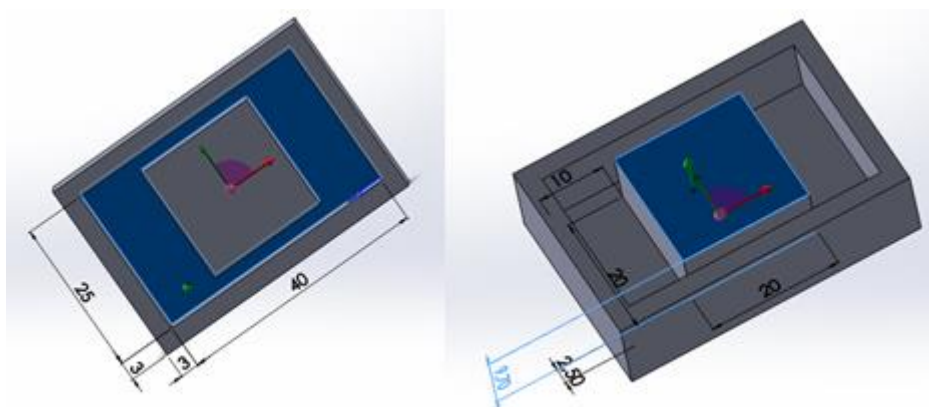


Figura 32: diseño de las cámaras de estiramiento.



Figura 33: molde negativo de la cámara de estiramiento.

Cultivo Celular

La línea celular Vero, la cual proviene del epitelio renal de mono verde africano, fue cultivada *in vitro* como monocapa adherente en placas tipo Petri de 60 mm de diámetro (Figura 34). Las células fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ y mantenidas con medio de cultivo celular completo, con la siguiente formulación: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) alto en glucosa (*Sigma*), 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (*Internegocios S.A*), 10.000 UI/ml de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomina (antibióticos). Cada vez que se alcanzó la confluencia del cultivo, se efectuó el pasaje o repique. Para ello, se llevó a cabo el procedimiento de tripsinización, para el cual se utilizó tripsina 0,25% en Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic Acid*) (*Gibco*), una enzima que digiere aquellas proteínas celulares implicadas en la adhesión celular al soporte. El EDTA, por su parte, es un agente quelante que se combina con los iones de Ca²⁺, dando lugar a la formación de complejos denominados quelatos. De esta manera, secuestra los cationes presentes en el medio de cultivo celular que median la interacción célula-sustrato.

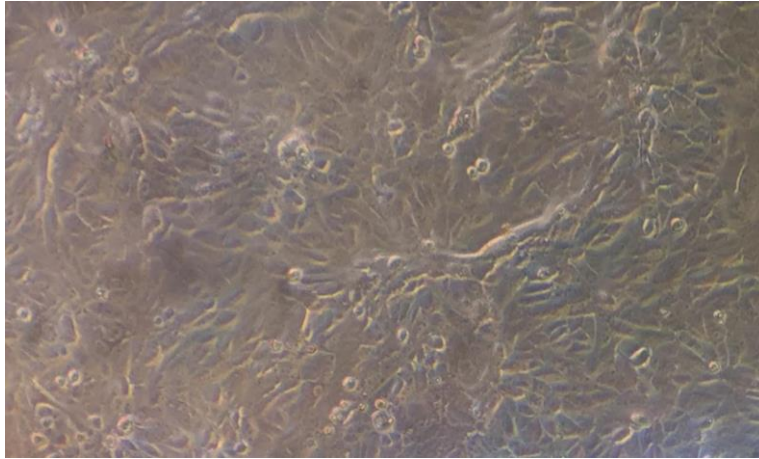


Figura 34: cultivo de células Vero. Observación bajo microscopio de contraste de fases de enfoque invertido (25x).

El procedimiento de tripsinización se llevó a cabo de la siguiente manera: en primer lugar, se removió el medio de cultivo de la placa y se realizó un lavado con 2 ml de buffer fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*); esto permite que la tripsinización sea efectiva y contribuye a debilitar la adherencia de las células al soporte, ya que el suero del medio de cultivo contiene inhibidor de tripsina. En segundo lugar, se incubaron las células con 1,5 ml de solución de tripsina 0,25% en EDTA, por 3 min a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se verificó que la adherencia celular al sustrato estuviera disminuida a través de la observación bajo el microscopio de contraste de fases de enfoque invertido. En tercer lugar, se diluyó la tripsina/EDTA en la placa con 2 ml de medio celular completo; esto detiene la tripsinización por el aporte de proteínas del suero, el inhibidor de tripsina presente en el suero y la suplementación de calcio y magnesio con el medio y el suero. A continuación, se homogeneizaron las células, y la suspensión celular se transfirió a un tubo estéril para luego centrifugar a 115 g durante 5 min (Figura 36). Por último, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de medio de cultivo y una vez efectuado el recuento celular se sembró una densidad de 12.000 células/cm² sobre la placa de Petri de 60 mm de diámetro.

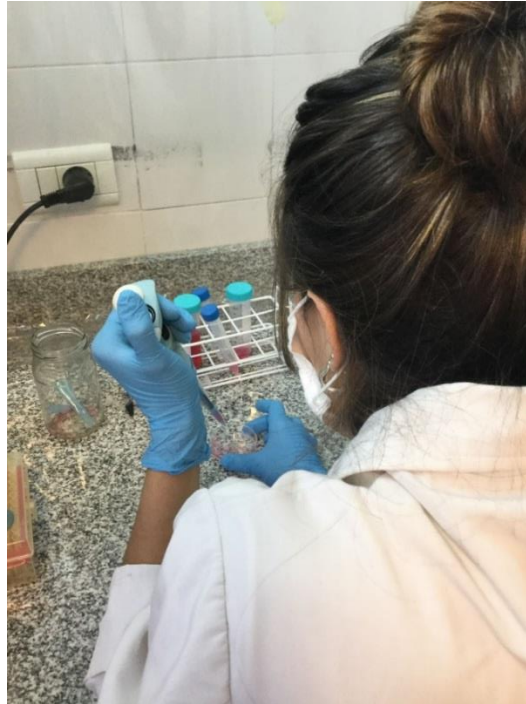


Figura 35: homogeneización de las células luego de la dilución de la tripsina con medio celular.

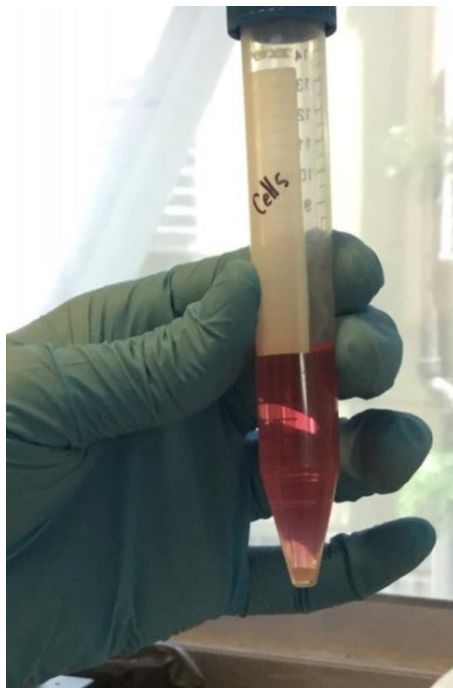


Figura 36: resultado de la centrifugación de la suspensión celular.

Recuento celular

El número de células en suspensión luego del proceso de tripsinización se determinó utilizando un hematocitómetro o cámara de Neubauer. Como la tripsinización y el pipeteo de las células siempre conlleva algo de muerte celular, es conveniente teñir las células de forma que se puedan contar células vi-

vas y muertas; para ello se utilizó azul de tripano (0,4% en agua desionizada). Para sembrar las células, sólo se tuvo en cuenta el número de células vivas.

El recuento se realizó mezclando 30 µl de suspensión celular con 30 µl azul de tripano en un tubo *ependorf*, es decir utilizando un factor de dilución (fd) 1:1. Se pipetearon 20 µl de esa nueva suspensión a un lado de la cámara de Neubauer y se procedió al recuento de células de los cuatro cuadros grandes de la cámara (Figura 37), observando bajo el microscopio de contraste de fases de enfoque invertido.

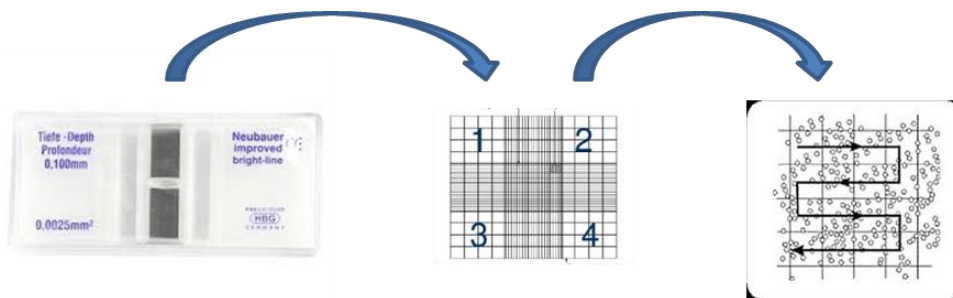


Figura 37: diseño de una cámara de Neubauer¹⁹.

Como la superficie de un cuadro grande es 0,01 cm² y su profundidad es 0,01 cm, el volumen de suspensión en cada uno de ellos es 0,0001 ml. La concentración celular se obtiene a partir de ese volumen calculado, y tomando un promedio de la cantidad células en cada cuadro grande, como lo indica la Fórmula 10.

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células}}{0.0001 \text{ ml}} = \frac{n^{\circ} \text{ de células en los cuadros grandes}}{4} \times fd$$

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células}}{\text{ml}} = \frac{n^{\circ} \text{ de células en los cuadros grandes}}{4} \times fd \times 10000$$

Fórmula 10: recuento celular en cámara de Neubauer.

Para facilitar la tarea de recuento, se utilizó la aplicación *Hemocytometer Sidekick*, optimizado para la operación sin ojos, ya que cuenta con botones de gran tamaño y sonidos (Figura 38).

¹⁹ Imagen obtenida de Cultivo de células bi y tridimensionales, aplicaciones. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad de Río Cuarto. 2015.

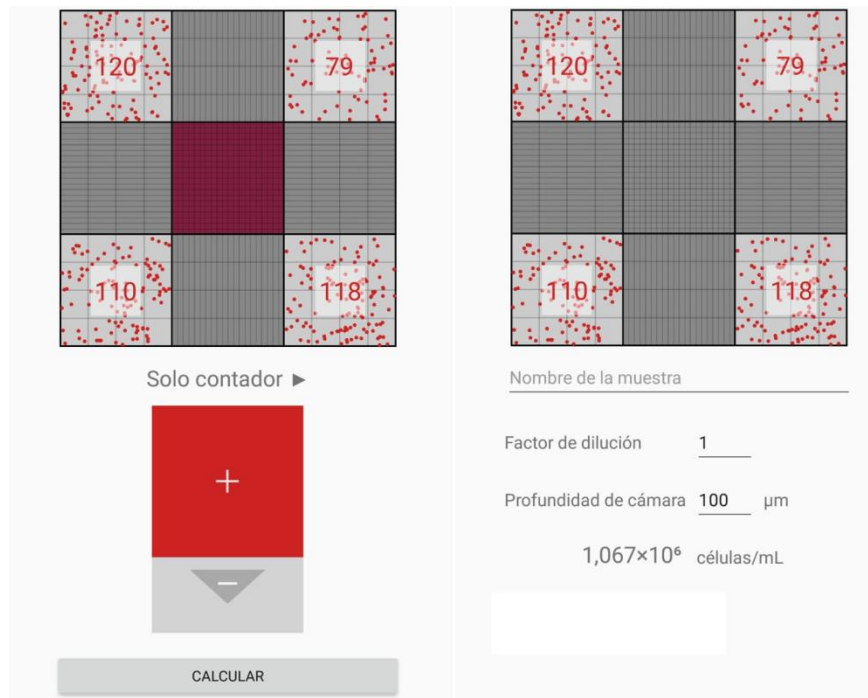


Figura 38: recuento celular²⁰.

Obtención y descelerización de miocardio

La MEC se obtuvo a través de la descelerización del miocardio correspondiente a la pared del ventrículo izquierdo de dos corazones de cerdo adultos (entre 90 y 150 kg).

Los corazones fueron congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h. Posteriormente, se descongelaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se obtuvieron cortes de las paredes ventriculares de $900\text{ }\mu\text{m}$ de espesor. Estas piezas fueron luego sometidas a un proceso de descelerización por inmersión, siguiendo un protocolo basado en lo propuesto por Mirsadraee *et al.* (36). Para ello, en primer lugar, se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h. Luego se descongelaron a temperatura ambiente para ayudar a la lisis celular, y se procedió a su lavado con agua desionizada con agitación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. En segundo lugar, se utilizó el detergente iónico dodecil sulfato sódico (SDS, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) (1% en agua desionizada), con agitación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Por último, se realizó un lavado con agua desionizada para eliminar los restos celulares y el detergente, con agitación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finalmente, se desinfectó la MEC resultante utilizando ácido peracético (0,2% en agua desionizada), y luego se mantuvo en PBS y antibióticos (ATB), con la misma formulación utilizada para el medio de cultivo celular completo.

²⁰ Imagen obtenida de la aplicación *Hemocytometer Sidekick* versión 1.5.3.

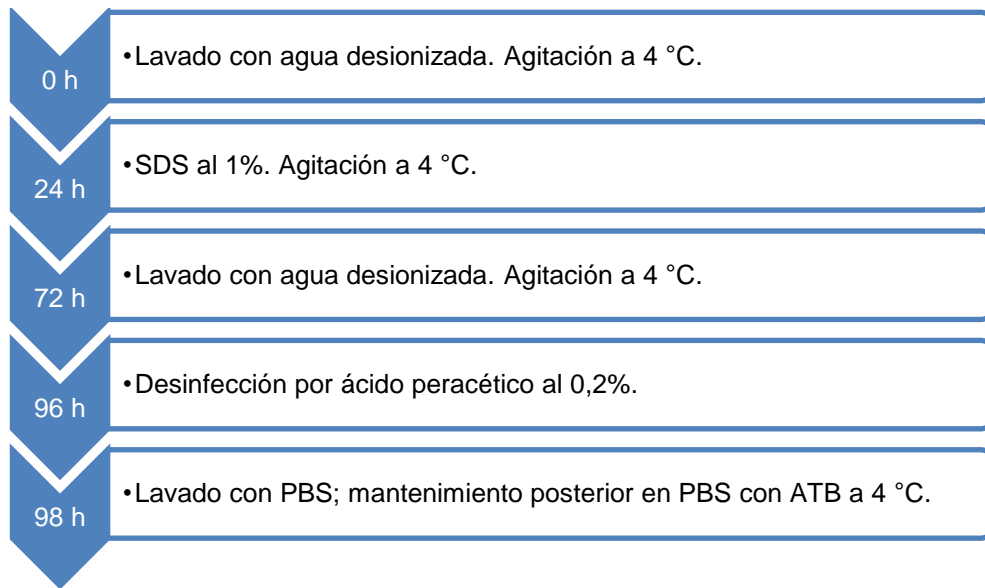


Figura 39: flujo de trabajo para la descelularización por inmersión y posterior desinfección, basado en Mirsadraee *et al.* (36)

Las MEC descelularizadas fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), para verificar la ausencia de núcleos, la conservación del árbol vascular y la estructura tridimensional del tejido.

Ensayo de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad del PVS 3M Imprint II de baja viscosidad y de la MEC descelularizada se realizó el ensayo de MTT, de acuerdo con la Norma ISO 10993-5.

Los materiales a ensayar se cortaron en pequeñas piezas (5×25 mm de PVS y 3 cm² de MEC, según lo indicado en la Norma ISO 10993-12 por el espesor y la naturaleza del material) (37) y se desinfectaron por inmersión en ácido peracético al 0,2%. La extracción se realizó en medio de cultivo celular completo por 24 h a 37 °C, en una atmósfera controlada de 5% de CO₂ (Figura 40). La línea celular Vero fue sembrada por sextuplicado en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10⁴ células/100 µl por pocillo y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ por 24 h. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se agregaron los extractos, el control positivo (DMSO) y el control negativo (100 µl en todos los casos), incubándose después por un período de 24 h. Al cabo de ese tiempo, se removieron los extractos y los controles, y se agregó una solución de 1 mg/ml de MTT en medio de cultivo celular completo, como se describió en 3.2.1. Se dejó actuar el MTT por 3 h y luego se removió el medio de cultivo. Los cristales de formazán se disolvieron con 100 µl de isopropanol/pocillo y se leyó la densidad óptica (DO) de cada pocillo a una longitud de onda de 595 nm utilizando un lector multiplaca ELISA (*Multiskan Spectrum; Thermo Scientific; Suecia*). Un resumen de la prueba se muestra en la Figura 41.

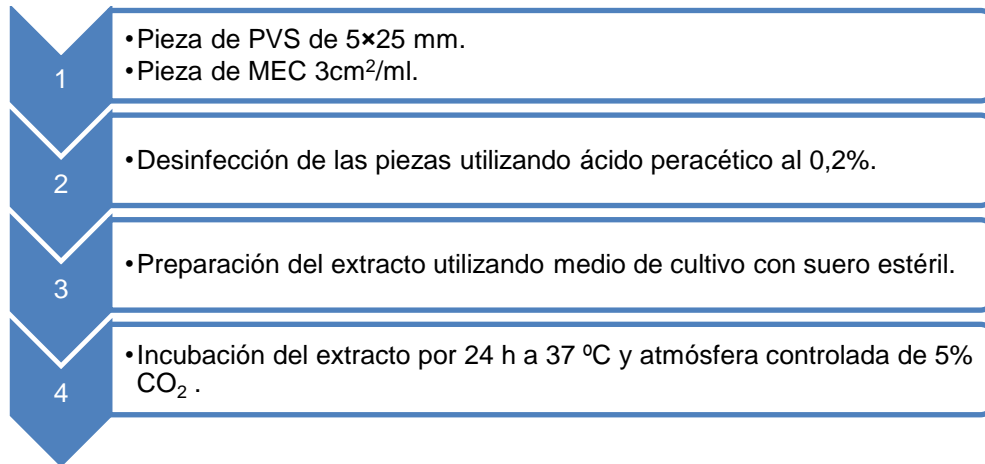


Figura 40: flujo de trabajo para la preparación de extractos, basado en ISO 10993-12.

Para calcular la reducción de la viabilidad de la muestra en comparación con el blanco (células incubadas en condiciones de cultivo óptimas, con medio celular completo) se utilizó la Fórmula 11. Un porcentaje de viabilidad mayor o igual a 70% indica que el material ensayado no tiene potencial citotóxico.

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{100 \times DO_{595e}}{DO_{595b}}$$

Fórmula 11: cálculo de la reducción de viabilidad de una muestra. DO_{595e} es la DO media de los pocillos con el extracto de material bajo ensayo y DO_{595b} es la DO media de los pocillos blanco.

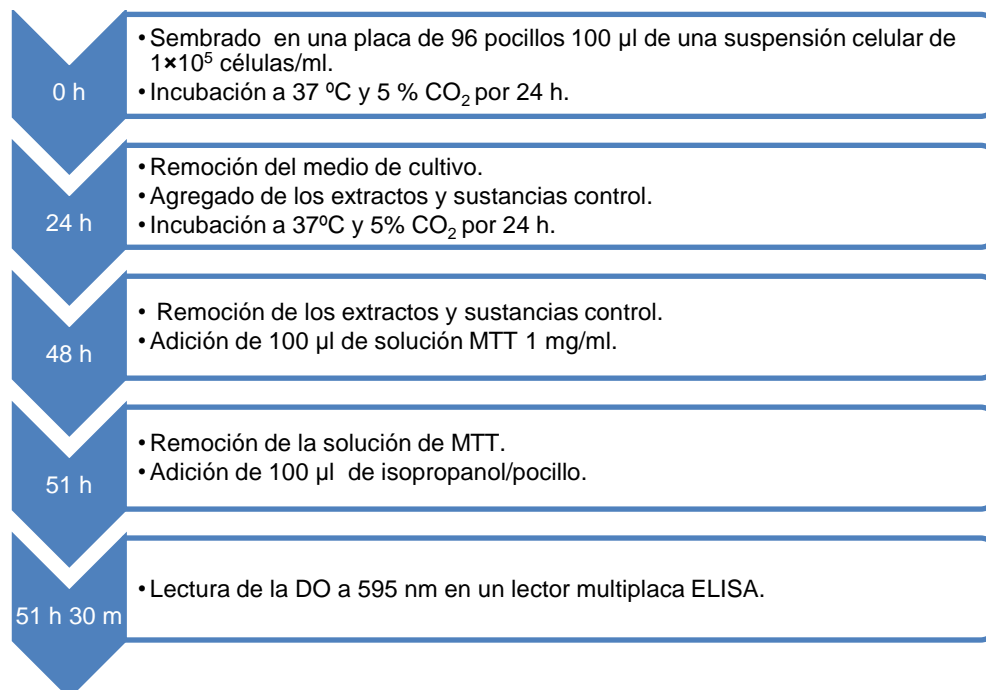


Figura 41: flujo de trabajo prueba de MTT, basado en ISO 10993-5.

Experimento de prueba del dispositivo

Previo a su introducción en la sala de cultivo, la estructura del biorreactor y su soporte se desinfectaron con monopersulfato de potasio 20%. Los componentes electrónicos fueron irradiados con luz UV (38) durante 15 min (Figura 42) utilizando una lámpara *Philips* Germicida G15T8, y los tornillos de sujeción de la cámara de estiramiento se desinfectaron utilizando etanol al 70% con agitación durante 15 min.

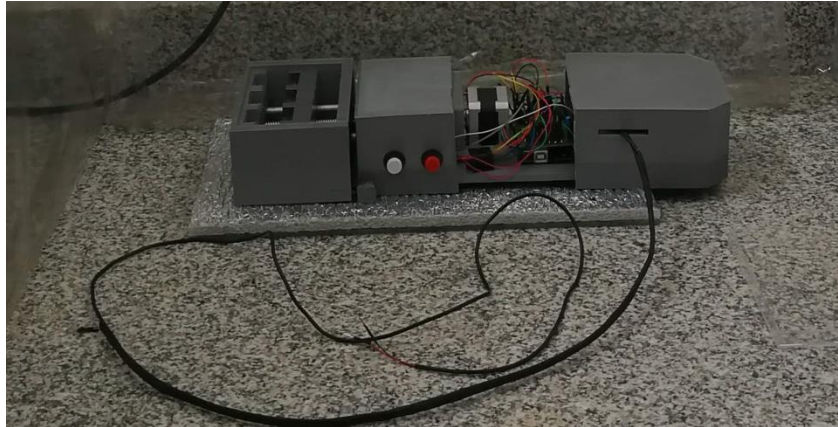


Figura 42: exposición a luz UV de los componentes electrónicos del biorreactor.

Las cámaras de estiramiento se desinfectaron con ácido peracético al 0,2% con agitación durante 1 h (Figura 43).



Figura 43: desinfección de las cámaras de estiramiento y homogeneización del monopersulfato de potasio.

Las matrices conservadas a 4 °C se sumergieron en ácido peracético al 0,2% y posteriormente se lavaron con PBS estéril. A continuación, dos de ellas (elegidas aleatoriamente para ser sometidas a estiramiento estático y estira-

miento cíclico) fueron posicionadas sobre el pocillo de la cámara de estiramiento, utilizando agujas 30 G (Figura 44); otra matriz (control) se posicionó sobre una placa tipo Petri de 60 mm de diámetro y se dejó secar bajo campana junto a las dos anteriores durante 1 h (Figura 45).



Figura 44: posicionamiento de la matriz sobre el pocillo de la cámara de estiramiento.

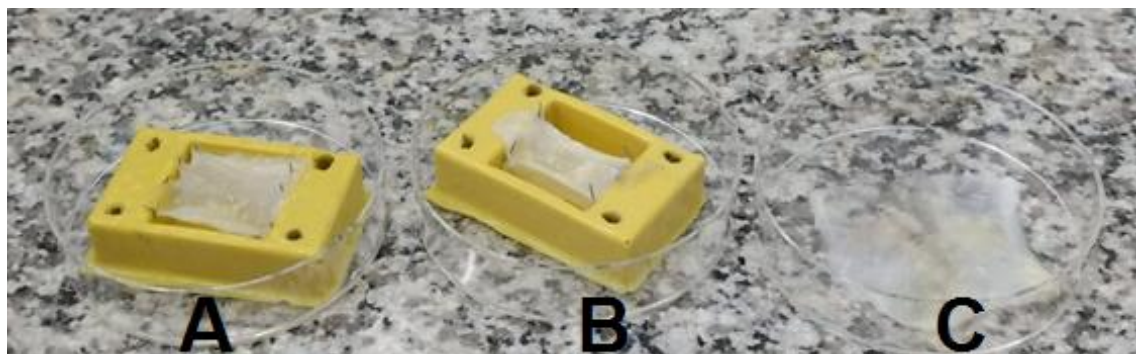


Figura 45: matrices secando bajo campana. (A) Estiramiento cíclico. (B) Estiramiento estático. (C) Control.

Aplicando técnicas de cultivo tridimensional, se sembraron 100 μ l de una suspensión de 1×10^6 células Vero/ml en cada una de las matrices y se incubaron a 37 °C con 5% CO₂. Al cabo de 30 min se agregó medio de cultivo completo y se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ por 48 h, para permitir la adherencia celular a la matriz (Figuras 46 y 47).

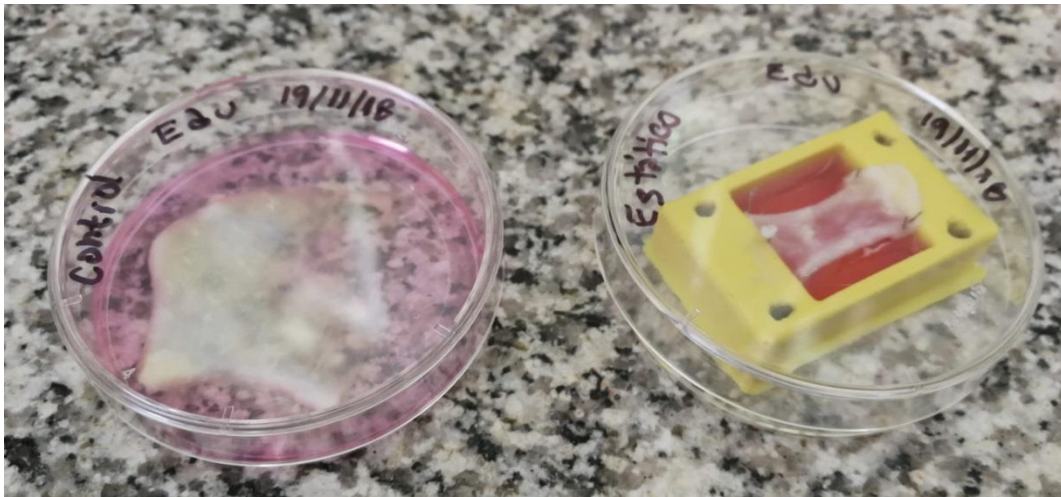


Figura 46: matrices de control y estiramiento estático recelularizadas.

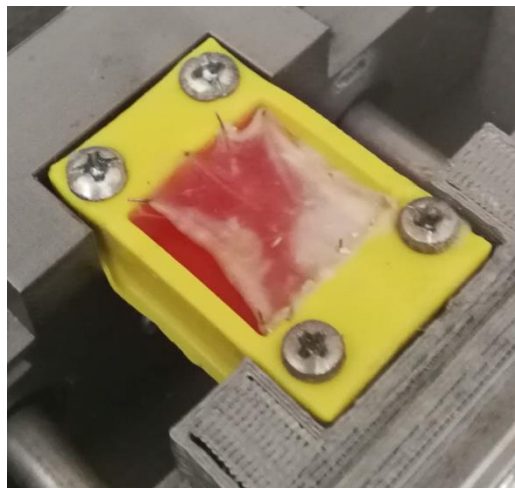


Figura 47: matriz de estiramiento cíclico recelularizada.

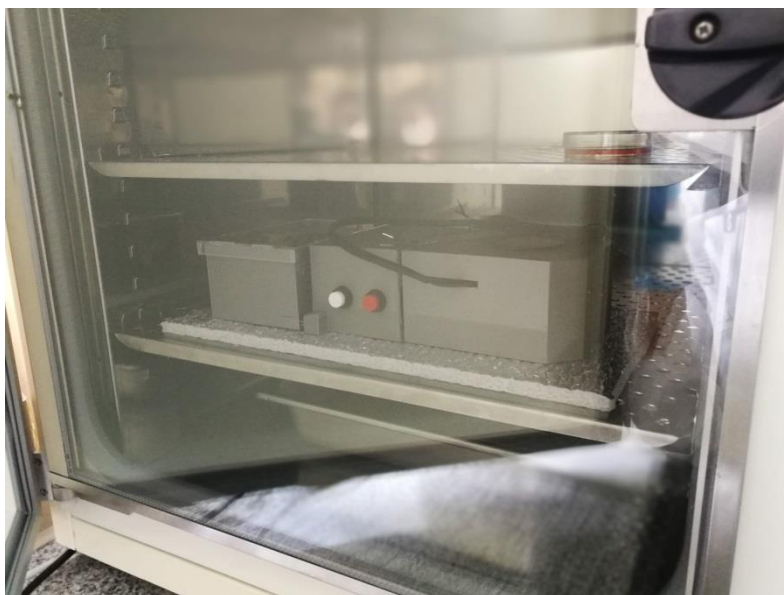


Figura 48: biorreactor posicionado dentro de la estufa de cultivo en las primeras 48 h de experimentación, sin estimulación cíclica.

Transcurrido ese tiempo, la matriz posicionada sobre el biorreactor fue estimulada mecánicamente al 5% y a una frecuencia de 1 Hz por 48 h. El porcentaje de estiramiento se eligió por ser un valor comúnmente utilizado en cultivo de tejido, mientras que la frecuencia fue fijada en 1 Hz ya que, como se busca imitar el comportamiento del corazón adulto, y el mismo late entre 60-100 veces por minuto, un ciclo de estiramiento por segundo (o 60 ciclos por minuto) representa esta condición.

Marcación de células

Se utilizaron dos fluorocromos aplicados conjuntamente para determinar la presencia y supervivencia celular: el diacetato de fluoresceína (25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de MEC) y el yoduro de propidio (25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de MEC a 1 mg/ml). El diacetato de fluoresceína penetra las células por difusión facilitada y es transformado por las esterasas celulares en fluoresceína, la cual emite fluorescencia amarillo-verdosa (λ : 514 nm). En forma de diacetato de fluoresceína no emite fluorescencia, por lo tanto, sólo aparecerán marcadas las células metabólicamente activas (viables). El yoduro de propidio (IP) es un fluoróforo impermeable a membranas celulares vivas, sólo atraviesa las membranas de las células muertas; interacciona con los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja (λ : 617 nm).

En primera instancia se lavaron las matrices con PBS y se adicionaron los fluorocromos, dejándolas reposar posteriormente por 15 min a 4 °C en oscuridad. Luego se procedió a realizar un lavado con PBS y finalmente se observaron las muestras bajo microscopio confocal de fluorescencia (*IX83; Olympus; Japón*).

Por otro lado, las matrices recelularizadas se sometieron a la técnica de tinción histológica H&E, de manera de poder ser comparadas contra una matriz descelularizada.

Resultados

Impresiones 3D

Se imprimieron en 3D las piezas que conforman la estructura del biorreactor y el disco ranurado del *encoder* incremental. El ensamblaje de la pieza fija, la pieza móvil y el *encoder* puede observarse en la Figura 49. En la pieza móvil se empotraron la tuerca trapezoidal y dos rodamientos lineales para guiar el desplazamiento; la longitud de las varillas lisas y del husillo se ajustó posteriormente y se ligó el motor al husillo, sujetándolo luego con cuatro tornillos como se muestra en la Figura 49.

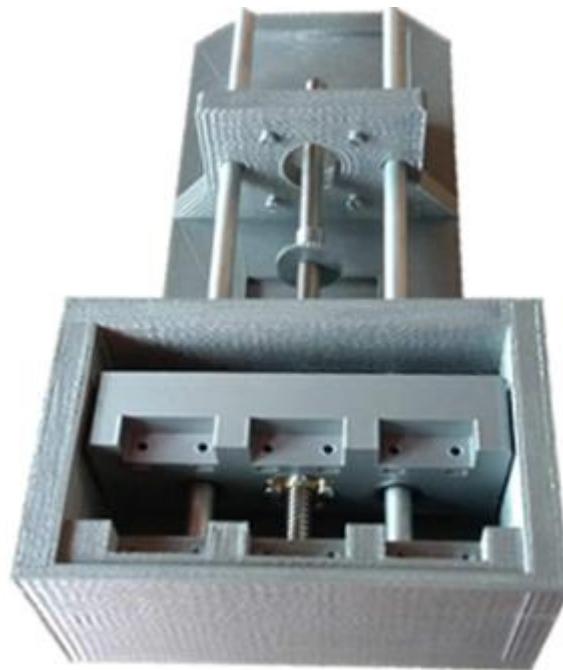


Figura 49: ensamblaje de las piezas impresas del biorreactor.

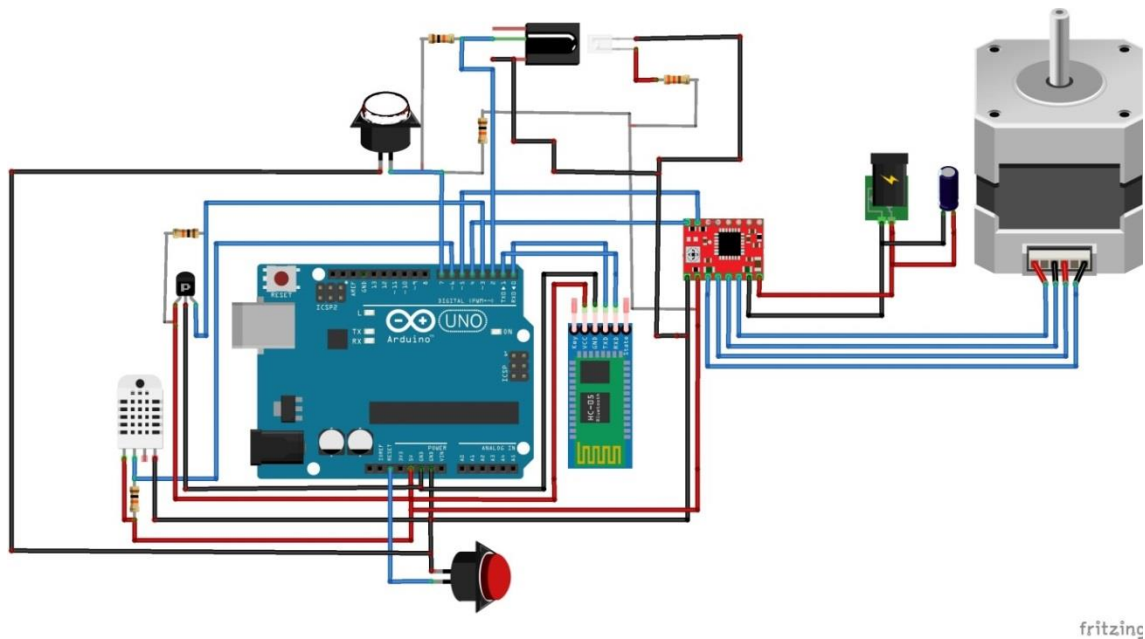
El montaje final del dispositivo, incluyendo la tapa confeccionada en acrílico, el resguardo móvil y el soporte de vidrio puede observarse en la Figura 50.



Figura 50: montaje final del biorreactor mecánico.

Control electrónico

Los componentes electrónicos necesarios para la creación del estímulo mecánico y el monitoreo de las condiciones de cultivo se interconectaron como se indica en la Figura 51. El montaje final se logró con el diseño de una placa de circuito impreso (PCB, del inglés *Printed Circuit Board*) en forma de *shield*, de manera de poder colocarla en la parte superior de la placa Arduino Uno R3. El resultado obtenido se observa en la Figura 52.



fritzing

Figura 51: esquemático del circuito eléctrico del biorreactor.

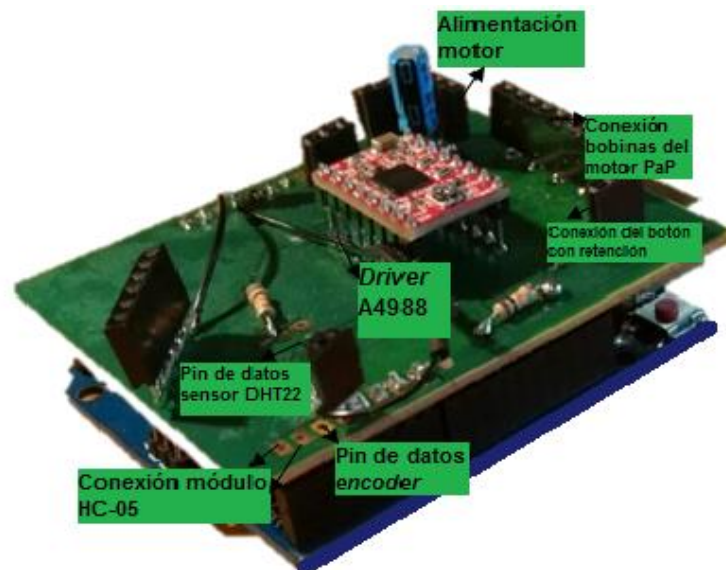


Figura 52: PCB y montaje de los componentes electrónicos del biorreactor.

Para el montaje final del circuito óptico del *encoder* incremental se diseñó también una PCB; el montaje de los componentes se muestra en la Figura 53.

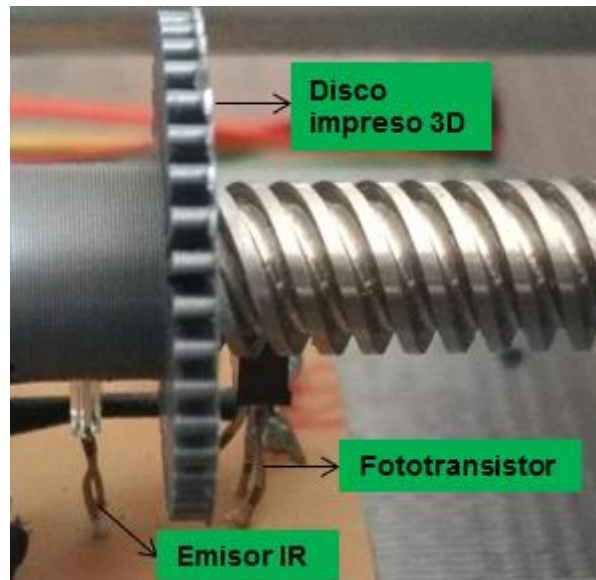


Figura 53: montaje del circuito óptico del *encoder* incremental.

Membranas flexibles

Se fabricaron las cámaras de estiramiento utilizando el molde negativo impreso en 3D, como se indica en la Figura 54. Al cabo de 15 min, se desmoldaron las piezas (Figura 55); finalmente se realizaron 4 perforaciones de 3 mm de diámetro en cada cámara para su sujeción a la estructura del biorreactor.

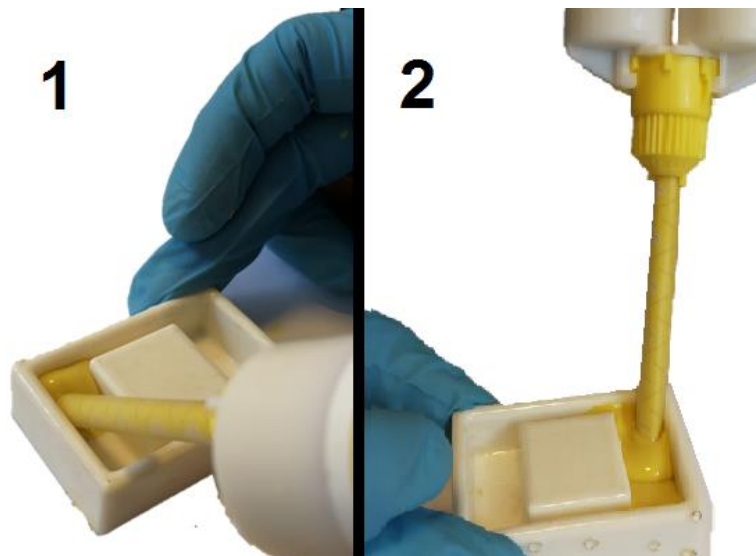


Figura 54: fabricación de las cámaras de estiramiento.



Figura 55: cámaras de estiramiento de PVS.

Comportamiento del sistema de estiramiento

La evaluación del sistema de estiramiento incluyó, en primer lugar, una verificación del comportamiento del motor PaP, analizando si el mismo soportaba la tensión ejercida por las cámaras de estiramiento en sentido contrario, a través del monitoreo por *encoder* incremental de los pasos efectivamente dados en cada ciclo. Se decidió trabajar con una sola cámara, ya que la elección del motor se efectuó en base a las propiedades mecánicas del PDMS, que es el biomaterial más difundido y validado para su aplicación en biorreactores mecánicos. Como ya se explicó anteriormente, el PDMS tiene un módulo de elasticidad considerablemente menor al del PVS; en otras palabras, el PVS tiene mayor rigidez que el PDMS.

Esto se manifestó cuando al ingresar un determinado porcentaje de estiramiento, se midió un desplazamiento menor al calculado. Ante esta situación, se trazó una curva de calibración para aquellos casos en los que el biorreactor se utilice con una cámara de estiramiento de PVS, determinando los valores de estiramiento que deben ser ingresados en la configuración para obtener la deformación buscada. La razón fundamental por la cual se procedió de esta manera yace en que el dispositivo desarrollado prevé ser utilizado en el futuro con las cámaras de estiramiento de PDMS comerciales, y existe evidencia bibliográfica del buen comportamiento con este material de motores de similares características al seleccionado para este PI (39).

Para determinar el estiramiento efectivo del pocillo de PVS, se configuraron distintos porcentajes de estiramiento a baja frecuencia (0,1 Hz) y se midió con un calibre digital la relación de estiramiento para cada caso, tal como se indica en la Figura 56. Se determinaron los porcentajes de estiramiento que debían ingresarse al sistema para conseguir un estiramiento del 5%, 7,5% y 10% (Tabla 1). Luego, se graficaron estos puntos y se trazó una línea de ten-

dencia; al calcular el coeficiente de correlación de Pearson (R^2) resultó ser muy próximo a 1, con lo cual se infiere que el comportamiento del sistema es lineal. Por lo tanto, con la ecuación de la recta que se observa en la Figura 57 puede obtenerse el porcentaje de estiramiento que debe introducirse (x) en el sistema para alcanzar un determinado estiramiento efectivo (y) para el caso particular de utilización de una cámara de estiramiento de PVS.

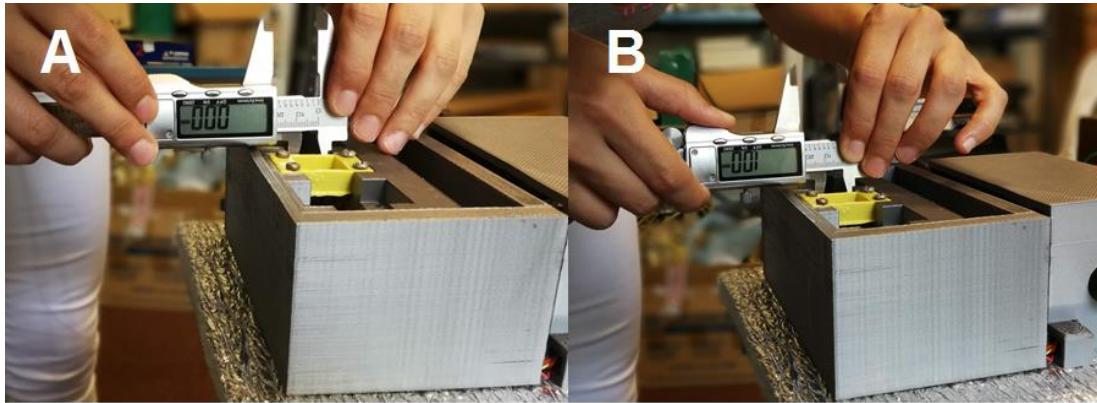


Figura 56: determinación del estiramiento efectivo del pocillo de PVS para un valor ingresado de 5,9%. (A) pocillo en posición inicial (reposo), configuración del cero de la medición. (B) Medición de la deformación uniaxial del pocillo una vez alcanzado el punto de retención del estiramiento.

Estiramiento 2,00 mm (10%) Valor ingresado: 11,66%		Estiramiento 1,50 mm (7,5%) Valor ingresado: 8,75%		Estiramiento 1,00 mm (5%) Valor ingresado: 5,90%	
Nº Ciclo	Estiramiento (mm)	Nº Ciclo	Estiramiento (mm)	Nº Ciclo	Estiramiento (mm)
0	2,03	0	1,52	0	0,99
1	2,02	1	1,46	1	0,99
2	1,97	2	1,44	2	0,97
3	1,88	3	1,57	3	1,06
4	2,01	4	1,47	4	0,93
5	1,99	5	1,49	5	1,01
6	2,00	6	1,40	6	1,02
7	2,02	7	1,57	7	1,00
8	2,02	8	1,45	8	0,95
9	2,00	9	1,52	9	1,02
10	2,00	10	1,49	10	0,94
Media	1,99	Media	1,49	Media	0,99
Desviación estándar	0,04	Desviación estándar	0,05	Desviación estándar	0,04

Tabla 1: porcentajes de estiramiento ingresados y estiramiento efectivo.

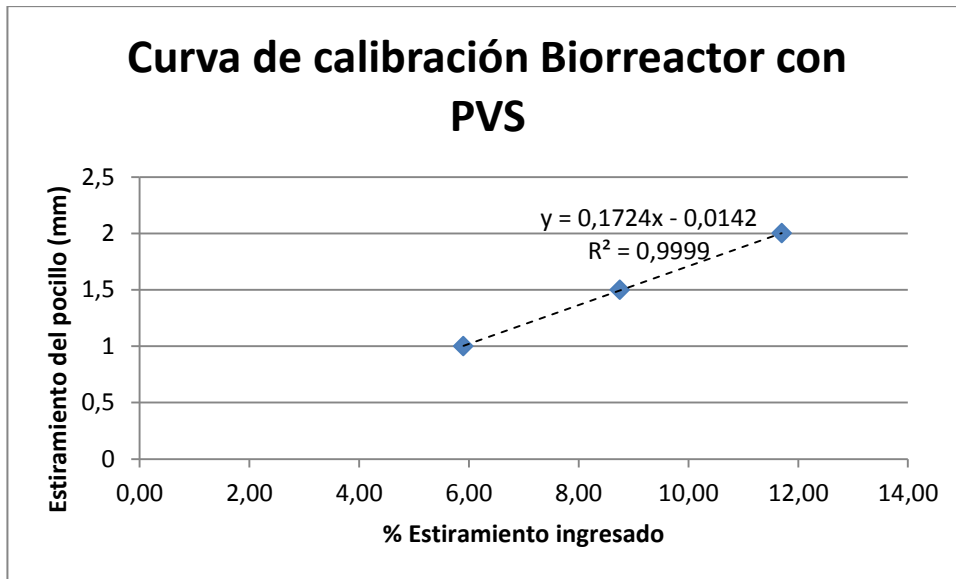


Figura 57: curva de calibración del biorreactor con cámaras de estiramiento de PVS.

Por otro lado, se verificó el correcto envío de datos entre la placa Arduino Uno R3 y la PC (utilizando el monitor serial) a través del módulo *Bluetooth* tanto para la configuración del dispositivo como para el monitoreo de las condiciones ambientales de incubación de las células desde el exterior de la sala de cultivo, obteniendo resultados muy satisfactorios.

Descelularización de miocardio

Luego de la aplicación del protocolo de descelularización, se obtuvieron parches como el que se observa en la Figura 58. En el mismo puede apreciarse macroscópicamente la conservación del árbol vascular, fundamental para la futura siembra celular y la supervivencia del tejido en el tiempo.

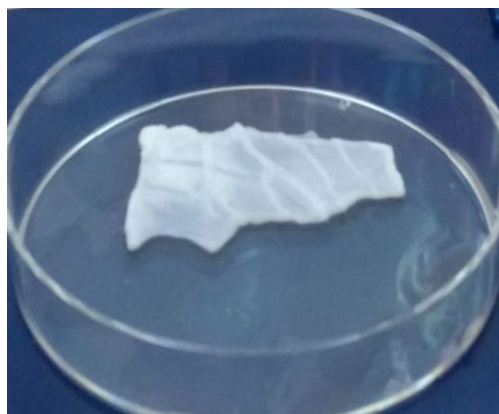


Figura 58: parche de MEC descelularizada.

La tinción de H & E (Figuras 59, 60 y 61) evidencia la ausencia de células y núcleos en la matriz descelularizada. De esta manera, se verifica que el protocolo aplicado resulta apropiado, ya que logra eliminarse el contenido celular conservando la estructura tridimensional del tejido.

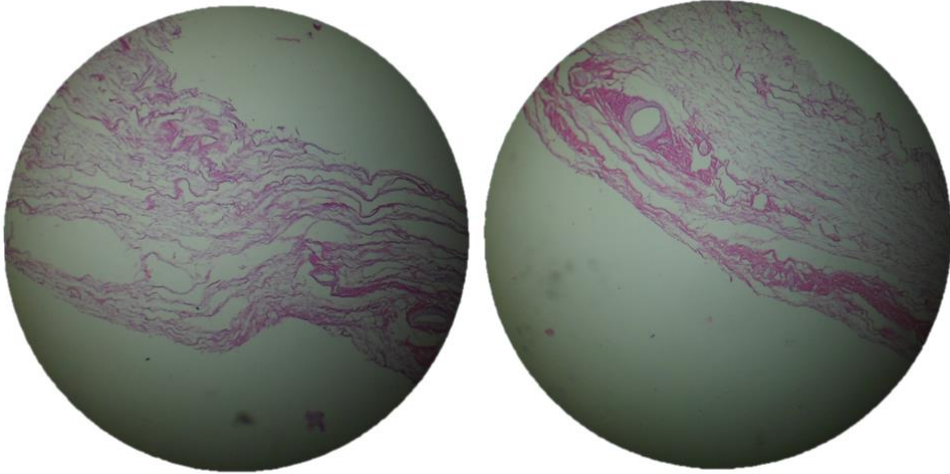


Figura 59: MEC descelularizada (10x). Se observan fibras extracelulares y corte transversal de los vasos sanguíneos.

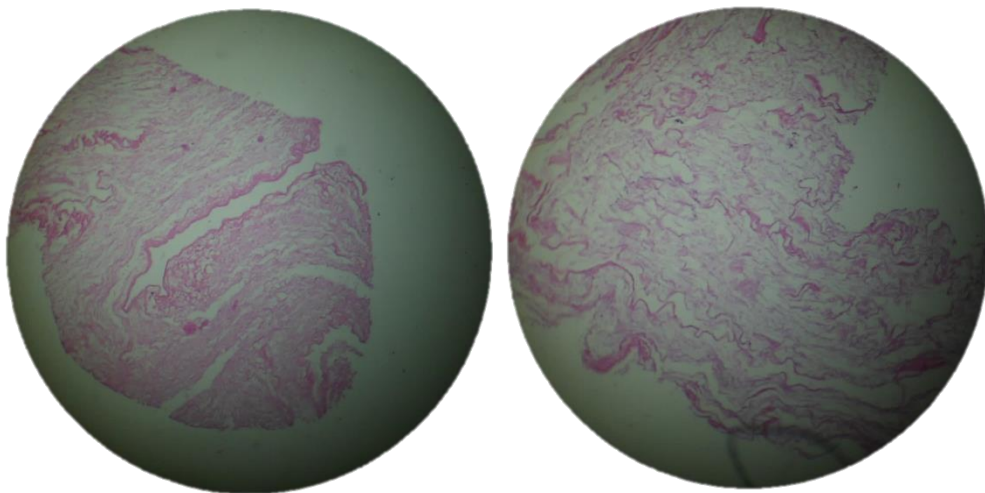


Figura 60: MEC descelularizada (10x). Se observa un corte longitudinal de los vasos sanguíneos y la conservación de la estructura tridimensional de la matriz.

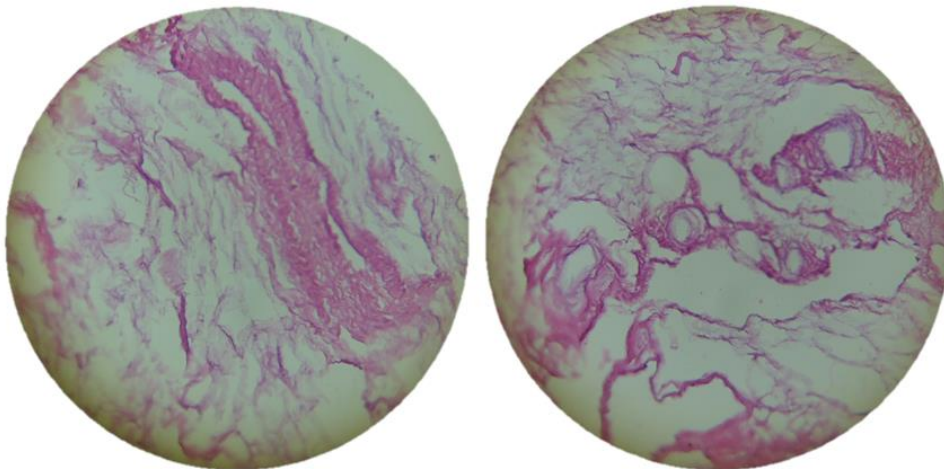


Figura 61: MEC descelularizada (40x). Se observan fibras extracelulares y corte longitudinal de los vasos sanguíneos.

Ensayo de citotoxicidad

Una vez finalizado el ensayo de MTT, se procedió a la lectura de la DO en el lector multiplaca. Previamente, se disolvieron los cristales de formazán con 100 μ l de isopropanol/pocillo (Figura 62). Los resultados de viabilidad celular se muestran en la Figura 63. Como puede observarse, tanto para la MEC descelularizada como el PVS se obtuvieron porcentajes de viabilidad superior al 70%, por lo tanto, puede concluirse que estos materiales no presentan potencial citotóxico.

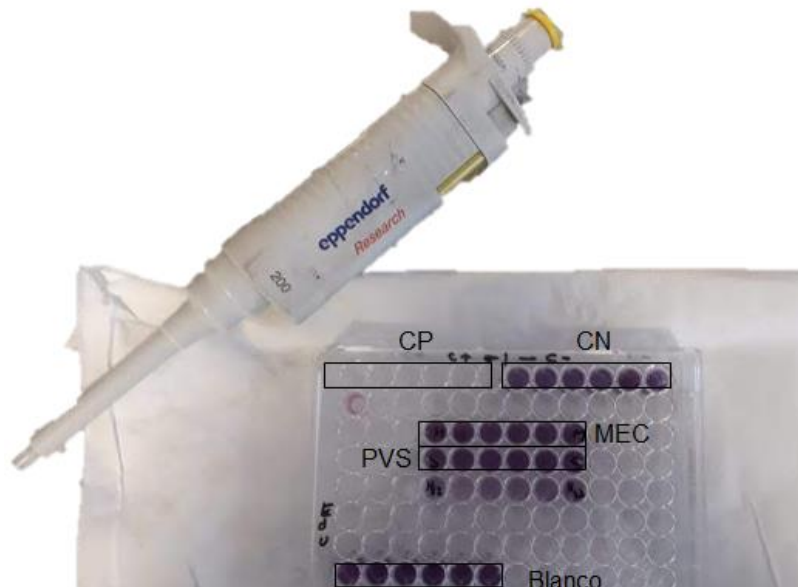


Figura 62: placa de 96 pocillos utilizada para la prueba de MTT, lista para ser leída en el lector multiplaca ELISA. CP: control positivo. CN: control negativo.

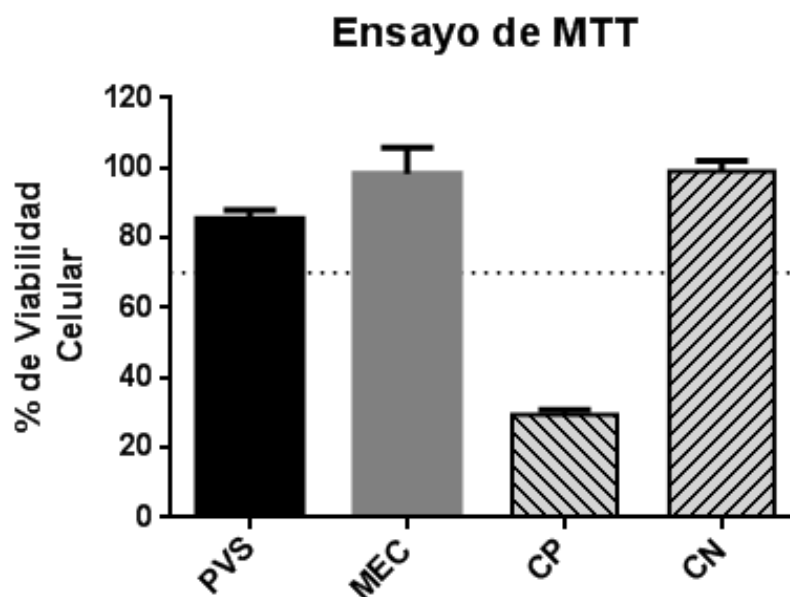


Figura 63: citotoxicidad de PVS y MEC determinado mediante el ensayo de MTT (media aritmética \pm SEM). CP: control positivo. CN: control negativo.

Experimento de prueba

Durante estimulación cíclica de la MEC recelularizada seleccionada para tal fin, se monitoreó la temperatura y humedad del recinto donde se cultivó la misma. La temperatura medida osciló entre $35,7 \pm 0,5$ °C y $36,5 \pm 0,5$ °C, mientras que la HR osciló entre $91,1 \pm 2\%$ y $91,7 \pm 2\%$.

Al finalizar el protocolo de prueba del biorreactor mecánico, se desmontó la cámara de estiramiento y se inspeccionó visualmente toda la electrónica involucrada en el control de la estimulación, sin encontrarse signos de corrosión ni de sobrecalentamiento del motor.

Las matrices sometidas a experimentación fueron evaluadas por microscopía confocal de fluorescencia y microscopía óptica para el caso de los preparados teñidos con H&E.

Las imágenes correspondientes a la tinción con H&E (Figuras 64, 65, 66 y 67) muestran los núcleos celulares en color púrpura, mientras que el citoplasma y el colágeno de la MEC se observan en color rosado. Como puede verificarse, en los tres casos hubo adhesión celular al andamio. Tanto para la MEC control y la MEC sometida a estiramiento cíclico se observa una mayor proliferación celular que para el caso de la MEC sometida a estiramiento estático. Una comparación entre la MEC recelularizada sometida estiramiento cíclico y la MEC control se muestra en la Figura 68.

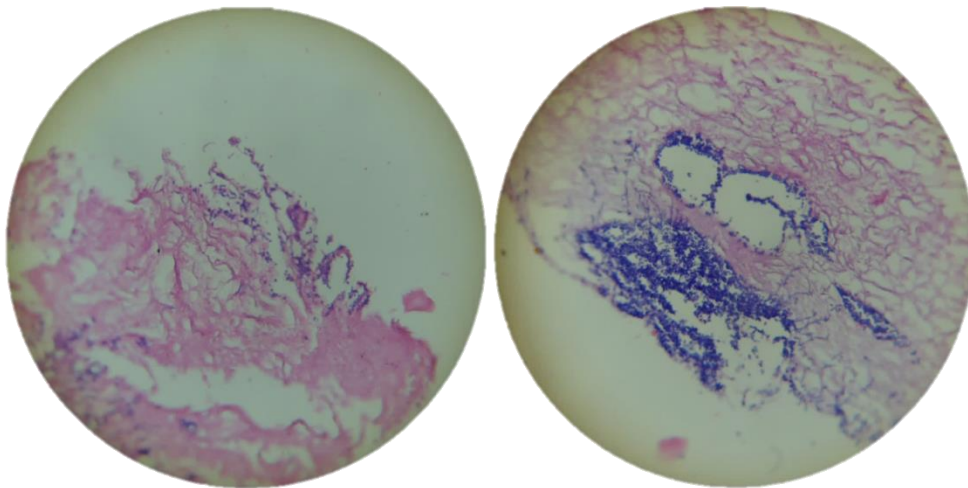


Figura 64: MEC recelularizada control (40x).

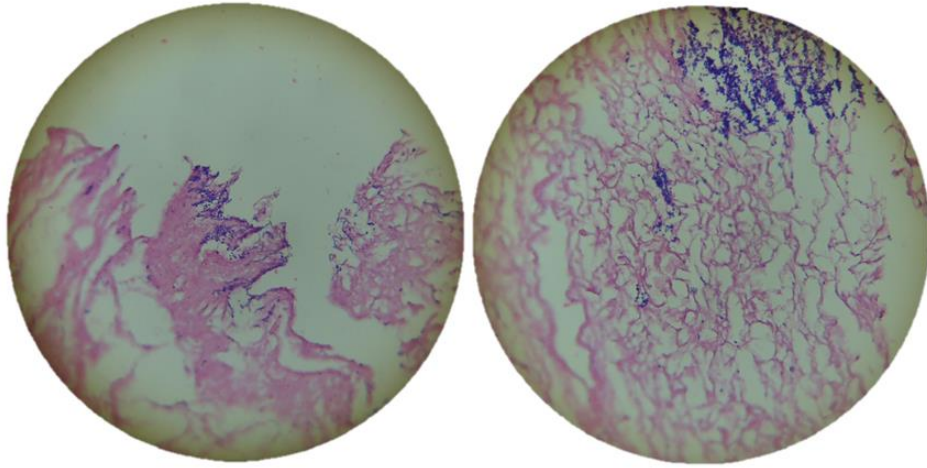


Figura 65: MEC recelularizada control (40x).

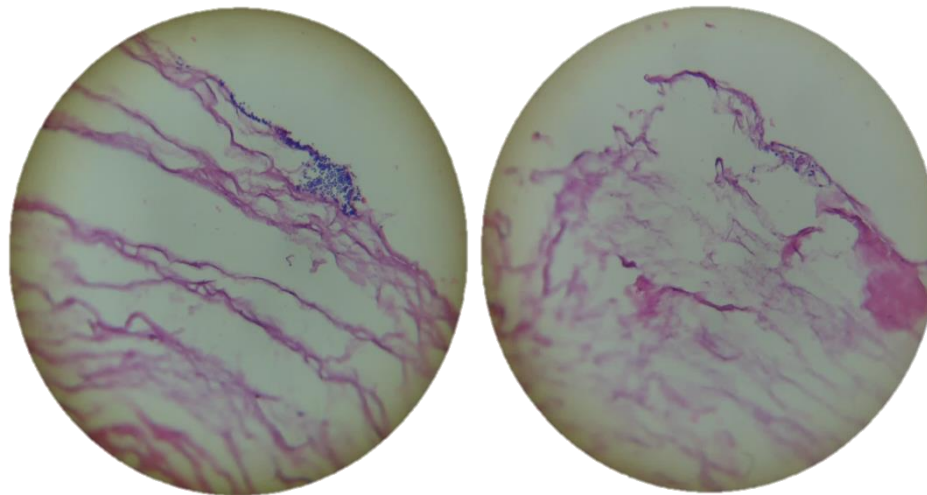


Figura 66: MEC recelularizada sometida a estiramiento estático (40x).

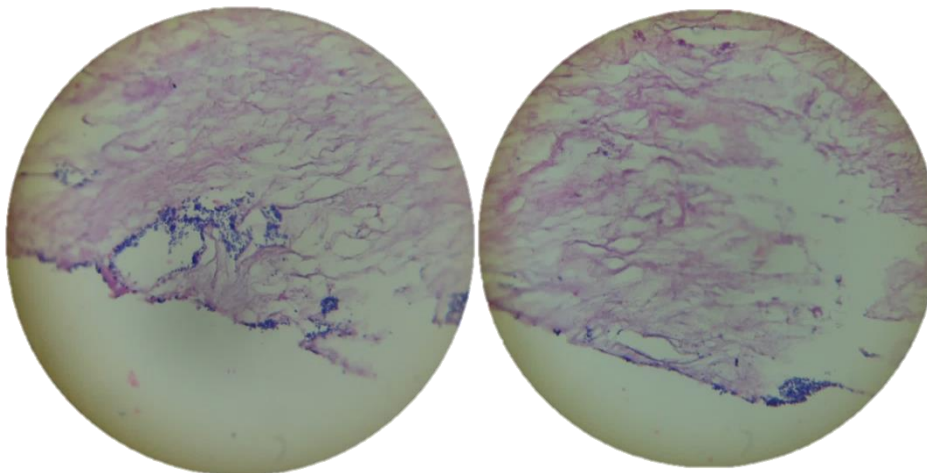


Figura 67: MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico (40x).

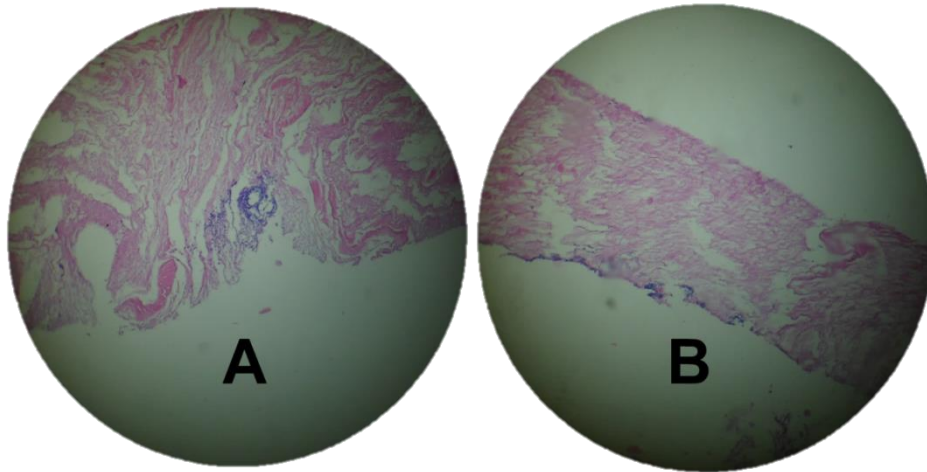


Figura 68: comparación entre dos matrices recelularizadas. (A) MEC recelularizada control (10x).
(B) MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico (10x).

Las imágenes obtenidas del microscopio confocal correspondientes a la MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico muestra la presencia de células vivas y apoptóticas a lo largo de toda la profundidad de exploración. En la Figura 69 se evidencia la penetración de células en la MEC hasta 53,46 μm desde la superficie en la cual fueron sembradas.

En la Figura 70 se observa una imagen resultante de realizar una proyección a lo largo de toda la profundidad de exploración, evidenciando la presencia de células teñidas con fluoresceína y con IP.

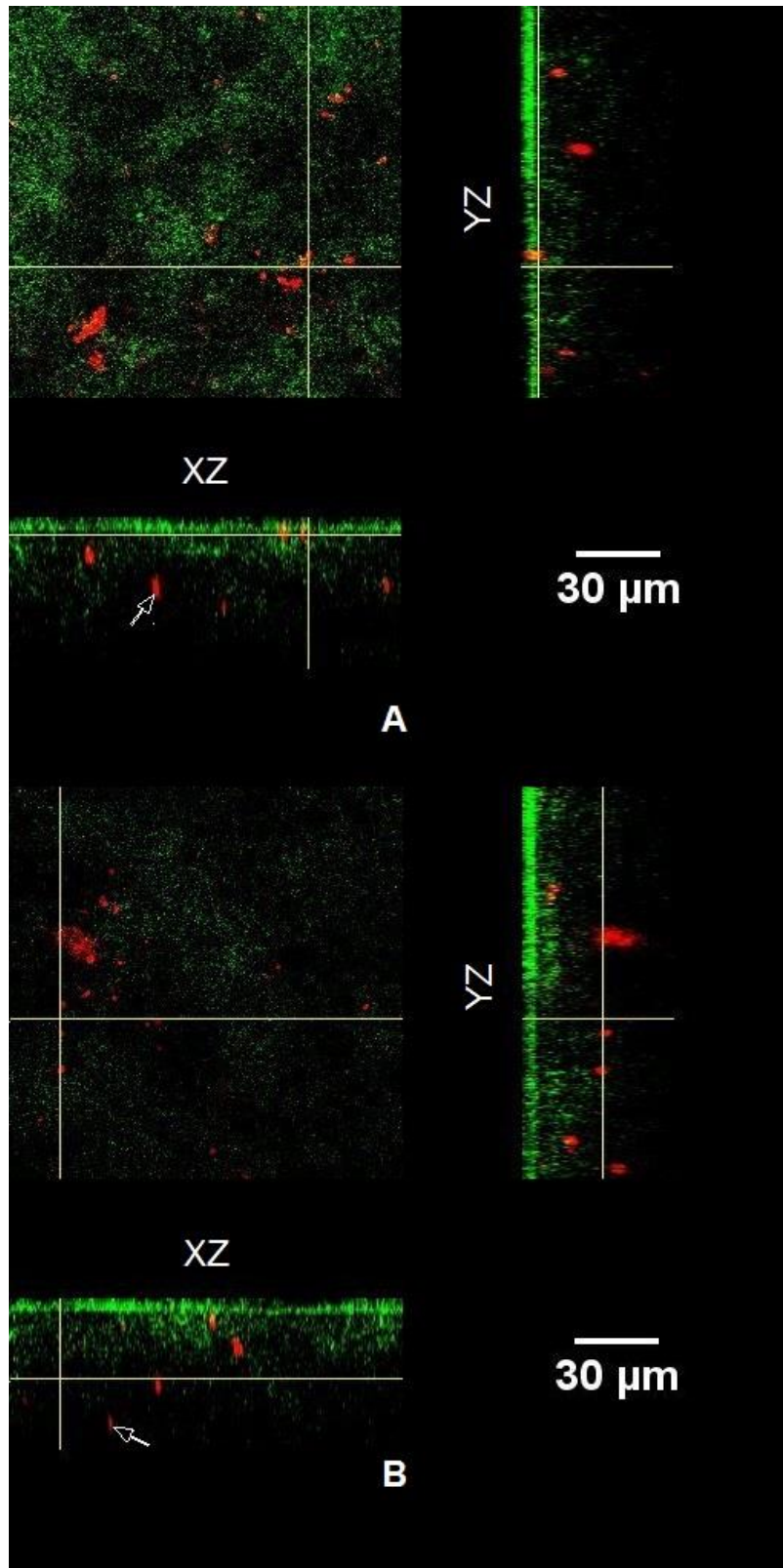


Figura 69: Micrografías de la MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico, con las correspondientes vistas ortogonales de 53,46 μm de espesor. (A) La flecha indica célula a 28,85 μm de profundidad. (B) La flecha indica célula a 44,82 μm de profundidad.

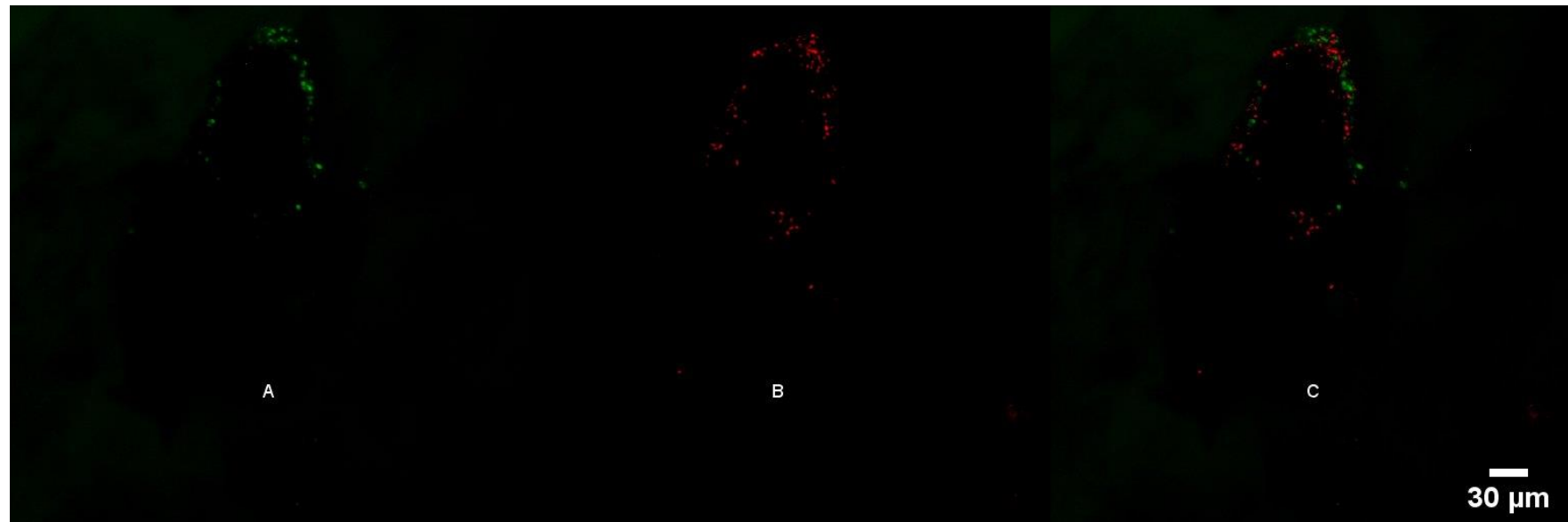


Figura 70: MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico. (A) Células penetradas por la fluoresceína. (B) células penetradas por el IP. (C) Fusión (*Merge*).

Presupuesto del proyecto

Una vez finalizado el proyecto, se confeccionó un presupuesto que contempla el costo de los materiales empleados para la fabricación del biorreactor, adicionando posteriormente el costo de las horas dedicadas al diseño y desarrollo del mismo.

Ítem	Cantidad/ horas	Precio Unitario	Precio Total
Impresión 3D pieza fija + pieza móvil + <i>encoder</i>	25	\$ 45,00	\$ 1.125,00
Impresión 3D resguardo mó- vil	13	\$ 45,00	\$ 585,00
Corte laser acrílico	1	\$ 85,00	\$ 85,00
Soporte de vidrio 4 mm de espesor	1	\$ 60,00	\$ 60,00
Motor Nema 17 Jk42hs34- 0404	1	\$ 539,00	\$ 539,00
Husillo trapezoidal ACME 8 mm + tuerca de bronce 8 mm/vuelta	1	\$ 450,00	\$ 450,00
Acople 5x8 mm	1	\$ 85,00	\$ 85,00
Rodamiento lineal Lm8luu 8 mm	2	\$ 120,00	\$ 240,00
Varilla lisa 8x250 mm	2	\$ 37,50	\$ 75,00
Arduino Uno R3	1	\$ 280,00	\$ 280,00
<i>Driver Stepstick</i> A4988	1	\$ 51,70	\$ 51,70
Módulo <i>Bluetooth</i> HC-05	1	\$ 320,00	\$ 320,00
Botón con retención	2	\$ 25,00	\$ 50,00
Sensor efecto Hall A3144	1	\$ 25,00	\$ 25,00
Sensor temperatura y hume- dad DHT22	1	\$ 190,00	\$ 190,00
PCB <i>shield</i> Arduino	1	\$ 360,00	\$ 360,00
PCB circuito óptico <i>encoder</i>	1	\$ 150,00	\$ 150,00
Tornillos 3x20 mm	12	\$ 1,00	\$ 12,00
Tuercas 3 mm	12		\$ 0,00
PVS 3M Imprint II consisten- cia liviana baja viscosidad	1	\$1.300,00	\$ 1.300,00
TOTAL MATERIALES			\$ 5.982,70
Dedicación en horas	480	\$ 162,50	\$ 78.000,00
TOTAL			\$ 83.982,70

Tabla 2: presupuesto del proyecto.

Desarrollo de un biorreactor mecánico para recelularización de matrices naturales

El precio de la hora de trabajo se determinó a partir del sueldo mínimo establecido por el Colegio de Ingenieros Especialistas de la Provincia de Córdoba actualizado al 01/01/2018, el cual corresponde a \$26.000 (40). Considerando una jornada laboral de 8 h, es decir 40 h semanales, se llega a la conclusión de que el precio por hora es \$162,50.

Conclusiones

Se desarrolló un biorreactor mecánico para cultivo celular 3D, procurando simular las condiciones de temperatura, humedad, pH y fisiológicas tisulares para el correcto mantenimiento celular. Para ello, fue necesario en primer lugar poner a punto la técnica de cultivo celular para comprender las especificaciones con las que debía cumplir el futuro biorreactor, teniendo presente que no sólo bastaría con cumplir los requerimientos de estimulación sino que además debería responder a las necesidades del usuario investigador. Además, el manejo de la técnica de cultivo celular permitió realizar parte de la caracterización biológica del dispositivo y de los andamios a través de un ensayo de citotoxicidad. La técnica de cultivo tridimensional se aplicó en la recelularización de matrices que luego se sometieron a estimulación mecánica para verificar la adhesión y supervivencia celular en el biorreactor implementado. El estiramiento uniaxial de las matrices se logró gracias a la confluencia de un motor PaP comandado por un *driver*, un sistema tuerca-husillo, sensores de posición y un microcontrolador encargado de gobernar el funcionamiento global del sistema. El elevado costo de sensores de desplazamiento para medir pequeñas distancias llevó al diseño y la implementación de un *encoder* incremental como sensor de posición, a partir de un disco impreso 3D y un circuito óptico; si bien las prestaciones de este último son más limitadas, resultaron suficientes para los requerimientos previamente planteados.

Las dificultades respecto a la disponibilidad y el costo del elastómero que se previó utilizar para las cámaras de estiramiento (PDMS) obligaron a trabajar con otro material, de propiedades similares, pero más rígido. Por lo tanto, fue crucial evaluar el desempeño del sistema mecánico para verificar que el estiramiento se producía aún en estas condiciones, que diferían a las de diseño inicial. El resultado obtenido fue satisfactorio, y permitió avanzar con el protocolo de prueba del biorreactor utilizando provisoriamente las cámaras de estiramiento de PVS.

Los resultados obtenidos luego de la fase de experimentación permiten concluir que el biorreactor mecánico desarrollado permitió la adherencia celular; pudo evidenciarse la presencia de células metabólicamente activas y apoptóticas, pero será necesario optimizar y poner a punto técnicas de biología molecular, como ser la evaluación en la penetración de los compuestos. Además, se deberán definir exhaustivamente los parámetros de adquisición de las imágenes provenientes del microscopio confocal de manera de lograr el recuento de células sobrevivientes y células muertas, pudiendo expresar así resultados cuantitativos.

Un hecho a destacar de este trabajo es la sinergia interdisciplinar que se obtiene de la confluencia de la ingeniería, la biología, la bioquímica, la mecánica y demás disciplinas estudiadas en este PI; sin los valiosos aportes de cada rama no se habría arribado a los resultados previamente mencionados. Es sumamente importante aprender a trabajar en distintos dominios epistemológicos y metodologías para obtener resultados prometedores en el laboratorio, y ser capaces de trasladar algún día tal conocimiento a la sociedad.

Como trabajo a futuro, se propone la implementación de una interfaz gráfica de usuario que facilite la interacción del investigador con el dispositivo y almacene los datos enviados desde el Arduino; se sugiere además llevar a cabo la caracterización mecánica de las cámaras de estiramiento de PVS para evaluar la factibilidad como material alternativo para su uso en la ingeniería de tejidos. Por otro lado, sería interesante la implementación de protocolos de prueba variando el tiempo, la frecuencia y el porcentaje de estiramiento, y la caracterización del biorreactor utilizando tipos celulares específicos con respuesta a estimulación mecánica que ya hayan sido reportados en bibliografía.

Bibliografía y Referencias

1. Kamble TK, Kansal S. Review Article Tissue Engineering. Vidarbha Journal of Internal Medicine. 2014;17(julio):36–42.
2. Robbins S, Cotran R. Patología Estructural y Funcional. Elsevier. 2005.
3. Enfermedades cardiovasculares. Última visita: 19/10/2018. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
4. Calandrelli ME, Caminos M, Bocian JL, Saavedra ME, Zgaib ME, Bazán A, et al. Incidencia anual y letalidad del infarto agudo de miocardio en la Ciudad de San Carlos de Bariloche . Estudio REGIBAR. 2017;85:428–34.
5. Domenech M, Polo-Corrales L, Ramirez-Vick JE, Freytes DO. Tissue Engineering Strategies for Myocardial Regeneration: Acellular Versus Cellular Scaffolds. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2016;22(6):438–58.
6. Wang F, Guan J. Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy. Advanced drug delivery reviews. 2010;62(7–8):784–97.
7. Riehl BD, Park J-H, Kwon IK, Lim JY. Mechanical Stretching for Tissue Engineering: Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2012;18(4):288–300.
8. Tortora G, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. México, D. F.: Editorial Medica Panamericana; 2006.
9. Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Soler-Botija C, Bayes-Genis A. Ingeniería tisular cardiaca y corazón bioartificial. Revista Española de Cardiología. 2013;66(05):391–9.
10. Chachques J. Cardiomioplastia celular: investigación y desarrollo. Cardiovascular Risk Factors. 2004;13(1):19–24.
11. Beltrán Vargas NE, González de la Rosa CH. Técnicas de Cultivos Celulares e Ingeniería de Tejidos. México, D. F.; 2016. 198 p.
12. Debbi L, Drori S, Tzlil S. The Influence of the Timing of Cyclic Load Application on Cardiac Cell Contraction. Frontiers in Physiology. 2018;9:917.
13. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials Today. 2011;14(3):88–95.
14. Jessica Viola, Bhavya Lal OG. The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field. 2003;30.
15. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto. Cultivo de células bi y tridimensionales, aplicaciones. Río Cuarto; 2015.
16. Francisco Arencibia Arrebola D, Alfredo Rosario Fernández L, Lazara Curveco Sánchez. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel.




2003;(mayo 2014):40-52.

17. Wang B, Borazjani A, Tahai M, de Jongh Curry AL, Simionescu DT, Guan J, et al. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;94A(4):1100–10.
18. Yost MJ, Simpson D, Wrona K, Ridley S, Ploehn HJ, Borg TK, et al. Design and construction of a uniaxial cell stretcher. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H3124–30.
19. Kreutzer J, Ikonen L, Hirvonen J, Pekkanen-Mattila M, Aalto-Setälä K, Kallio P. Pneumatic cell stretching system for cardiac differentiation and culture. *Medical Engineering and Physics*. 2014;36(4):496–501.
20. Seriani S, Del Favero G, Mahaffey J, Marko D, Gallina P, Long CS, et al. The cell-stretcher: A novel device for the mechanical stimulation of cell populations. *Review of Scientific Instruments*. 2016;87(8).
21. Wang JH-C, Thampatty BP. Chapter 5 - Advances in tendon mechanobiology. In: Verbruggen SW, editor. *Mechanobiology in Health and Disease*. Academic Press; 2018. p. 127–55
22. Motores paso a paso. Última visita: 20/10/2018. Disponible en: http://platea.pntic.mec.es/vgonzale/cyr_0204/cyr_01/robotica/sistema/motores_p-p.htm
23. Husillo y tuerca. Última visita: 20/10/2018. Disponible en: <http://almez.pntic.mec.es/jgonza86/Mecanismo de husillo y tuerca.htm>
24. Microcontrolador. Última visita: 28/11/2018. Disponible en: <https://aprendiendoarduino.wordpress.com/category/microcontrolador/>
25. Arduino Uno Rev3. Última visita: 20/10/2018. Disponible en: <https://store.arduino.cc/usa/arduino-uno-rev3>
26. Pololu - A4988 Stepper Motor Driver Carrier. Última visita: 20/10/2018. Disponible en: <https://www.pololu.com/product/1182>
27. Liu T. Digital-output relative humidity & temperature sensor/module DHT22.
28. Areny RP. *Sensores y acondicionadores de señal*. Marcombo; 2004.
29. Serna A, Ros F, Rico JC. *Guía práctica de sensores*. Creaciones Copyright, S.L.; 2010.
30. ALLEGRO. A3141, A3142, A3143, and A3144: Sensitive Hall Effect Switches for High-Temperature Operation.
31. Richi Castellano A. *Bluetooth. Introducción a su Funcionamiento*. 2011. p. 16.
32. HC-05 Bluetooth module HC-05-Bluetooth to Serial Port Module. 2010. Última visita: 20/10/2018. Disponible en: <http://www.electronicaestudio.com/docs/istd016A.pdf>
33. Lagla Chicaiza MI, Iván M. Estudio comparativo de las propiedades físicas y mecánicas de hidrocoloides irreversibles. *Estudio in vitro*. 2018.



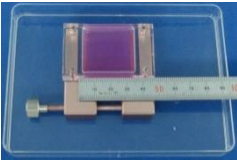
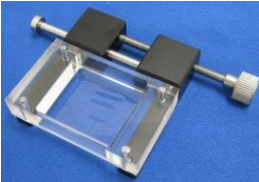
34. Natera JLC. Biomateriales dentales . Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica; 2004.
35. 3M. 3M IMPRINT™ II VINYL POLISILOXANO CUERPO PESADO/LIVIANO Sistema de Material de Impresión- Perfil Técnico del Producto.
36. Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, Kearney JN, Watterson KG, Fisher J, et al. Development and Characterization of an Acellular Human Pericardial Matrix for Tissue Engineering. Tissue Eng. 2006;12(4):763–73.
37. ISO. ISO 10993-12, Evaluación biológica de dispositivos médicos. Parte 12: Preparación de muestra y materiales de referencia. 2009.
38. Jason J. Lau, Raymond M. Wang and LDBI. Development of an Arbitrary Waveform Membrane Stretcher for Dynamic Cell Culture. 2015;345(6195):455–9.
39. Pla-Terrada OA, Albert R, Rodrigo M, Climent AM, Guillem MS. Desarrollo de un estimulador electromecánico programable para el entrenamiento electromecánico de cultivos monocapas de células miocárdicas. Libro de Actas XXXIV Congreso Anual la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica. 2016;215–8.
40. ::CIEC:: Colegio de Ingenieros Especialistas de Córdoba. Última visita: 8/12/2018. Disponible en: <http://www.ciec.com.ar/sitio/aranceles.php>


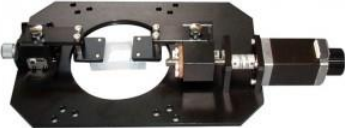


Anexos

Anexo N° 1: dispositivos para estimulación mecánica disponibles en el mercado




Modelo	Fabricante	Tipo de estiramiento	Área de cultivo	Cantidad de cámaras de estiramiento	Apto para ser utilizado en incubadoras	Compatible con microscopio óptico	Modo de funcionamiento	Imagen
NST 140-04	Nepage-ne	Uniaxial	4 cm ²	7	Sí	No	Automático	
NST 140-10	Nepage-ne	Uniaxial	10 cm ²	6	Sí	No	Automático	
NST-150	Nepage-ne	Uniaxial	4 cm ²	1	No	Sí	Automático	

Desarrollo de un biorreactor mecánico para recelularización de matrices naturales

Modelo	Fabricante	Tipo de estiramiento	Área de cultivo	Cantidad de cámaras de estiramiento	Apto para ser utilizado en incubadoras	Compatible con microscopio óptico	Modo de funcionamiento	Imagen
NST-190-XY	Nepagene	Biaxial, y compresión	4 cm ²	1	No	Sí	Automático	
STB-140-10	Strex	Uniaxial	10 cm ²	6	Sí	No	Automático	
STB-10-04	Strex	Uniaxial	4 cm ²	1	Sí, solo dentro de una placa tipo Petri	No	Manual	
STB-10-10	Strex	Uniaxial	4 cm ²	1	Sí, solo dentro de una placa tipo Petri	No	Manual	

Modelo	Fabricante	Tipo de estiramiento	Área de cultivo	Cantidad de cámaras de estiramiento	Apto para ser utilizado en incubadoras	Compatible con microscopio óptico	Modo de funcionamiento	Imagen
STB-190-XY	Strex	Biaxial, y compresión	4 cm ²	1	Sí	Sí	Automático	
STB- 150	Strex	Uniaxial	4 cm ²	1	No	Sí	Automático	
ShellPa	Menicon Life Science	Uniaxial	4 cm ²	6	Sí	No	Automático	
dcCS10- Linear	Electron Microscopy Sciences	Uniaxial	4 cm ²	1	Sí	Sí	Automático	

Desarrollo de un biorreactor mecánico para recelularización de matrices naturales

Modelo	Fabricante	Tipo de estiramiento	Área de cultivo	Cantidad de cámaras de estiramiento	Apto para ser utilizado en incubadoras	Compatible con microscopio óptico	Modo de funcionamiento	Imagen
DCCS10 - Biaxial	Electron Microscopy Sciences	Biaxial	18 cm ²	1	Sí	Sí	Automático	
DCCS10 - Compensation	Electron Microscopy Sciences	Uniaxial	18 cm ²	1	Sí	Sí	Automático	
mcCS10	Electron Microscopy Sciences	Uniaxial	18 cm ²	1	Sí	Sí	Manual	

Anexo Nº 2: *firmware* de Arduino

```

#include <TimerOne.h>
#include "DHT.h"
#define DHTTYPE DHT22
#define DEBUG(a) Serial.println(a);

volatile int FT1=0;          //variable que se incrementa cada vez que
                             //hay overflow del timer 1 (cada 4.194 se
                             //gundos)
volatile int reposo=0;      //variable que actúa como bandera de la
                             //interrupción de final de carrera
volatile int cambio_estado=0; //variable que se incrementa cada vez
                             //que
                             //ingresa una interrupción del encoder

const int DHTPin = 6;       // pin conectado al sensor de temperatura
const int boton=7;         //pin conectado al botón para frenar el
                             //estiramiento cíclico
const int stepPin = 5;     //pin conectado a step del driver
const int dirPin = 4;      //pin conectado a dir del driver
const int hallpin=3;

DHT dht(DHTPin, DHTTYPE);

int x;                      //variable utilizada en los ciclos for

int no_reposo=0;

float stretch;             //variable ingresada por el usuario (entre 1-15)
float deformacion;         //variable calculada a partir de stretch
float frecuencia;          //variable ingresada por el usuario (entre 0,1-2)
int cantidad_pasos;        //declarada como entera para que redondee en caso
                             //de no dar un valor exacto, se calcula a partir de
                             //frecuencia y deformación
int retardo;               //variable declarada como entera para que
                             // redondee en caso de no dar un valor exacto

String str;                //para lectura del puerto serie

void encoder()              //ISR encoder
{
  cambio_estado++;
}

void hall()                 //ISR sensor Hall final de carrera
{
  reposo=1;
}

```


Desarrollo de un biorreactor mecánico para recelularización de matrices naturales

```
void ISR_1()          //rutina de atención de la interrupción por timer1
{
  FT1++;
}

void setup()
{
  pinMode(stepPin,OUTPUT); //a pin step del driver
  pinMode(dirPin,OUTPUT); //a pin dir del driver
  pinMode(boton,INPUT); //pin que recibe el estado del botón con
                          //retención
  pinMode(hallpin,INPUT);

  Serial.begin(9600); //inicialización puerto serie
  Serial.print("Ingrese el porcentaje de estiramiento deseado: ");
  while(Serial.available()==0); //empleo de la función
                                //Serial.readStringUntil() para recibir
                                //una línea en un String
  str = Serial.readStringUntil('\n'); //String.toFloat() función para
                                      //convertir el String a número

  stretch = str.toFloat();
  DEBUG(stretch);

  Serial.print("Ingrese la frecuencia (en Hz) deseada: ");
  while(Serial.available()==0);
  str = Serial.readStringUntil('\n');
  frecuencia = str.toFloat();
  DEBUG(frecuencia);

  deformacion=(stretch*20)/100; //valor expresado en mm
  cantidad_pasos=deformacion*(200/8); //8 es el paso de la varilla
                                      //roscada en mm
  retardo=((1/(frecuencia*0.001))-4*2*cantidad_pasos)/2; //cálculo del
  //delay durante el cual el pocillo se mantiene estirado o en reposo

  attachInterrupt(0, encoder, RISING); //habilitación de interrupción,
                                       //el pin 0 de interrupción corresponde
                                       //al pin digital 2 del Arduino Uno R3

  Timer1.initialize(4194000); //interrupción cada 4.194 segundos
                              //(el valor está en microsegundos)
  Timer1.attachInterrupt(ISR_1); //ir a la función ISR_1 cada vez
                                 //que aparezca una interrupción por
                                 //timer1

  dht.begin();

  if (digitalRead(hallpin)==HIGH)
  {
    no_reposo=1;
  }
}
```

```

}

attachInterrupt(1, hall, FALLING); //habilitación de interrupción
//externa de final de carrera
//El pin 1 de interrupción
//corresponde al pin digital 3 de
la
//placa Arduino UNO

if (reposo==0)
do
{digitalWrite(stepPin, HIGH);
delayMicroseconds(2000);
digitalWrite(stepPin, LOW);
delayMicroseconds(2000);
}while(reposo==0);

reposo=0;
no_reposo=0;
cambio_estado=0;

Serial.println(retardo);
}

void loop()
{
digitalWrite(dirPin, HIGH); //inicio del giro del motor para generar
//la tracción (la parte móvil se desplaza
//hacia atrás)
for(x = 0; x < cantidad_pasos; x++)
{
digitalWrite(stepPin, HIGH); //stepPin entrega pulsos cuadrados,
// cada pulso es un paso

delayMicroseconds(2000);
digitalWrite(stepPin, LOW);
delayMicroseconds(2000);
}

while ((cambio_estado*5)<cantidad_pasos) //si el motor se saltó
//pasos (el encoder no lo detectó), continuar girando en el mismo sen-
tido hasta completar el sentido
{
digitalWrite(stepPin, HIGH);
delayMicroseconds(2000);
digitalWrite(stepPin, LOW);
delayMicroseconds(2000);
}

Serial.println(cambio_estado);
cambio_estado=0; //resetear variable antes de cambiar el
//sentido de giro

```

Desarrollo de un biorreactor mecánico para recelularización de matrices naturales

```
delay(retardo);

digitalWrite(dirPin, LOW); //el motor comienza a girar para el lado
                          //contrario, para que los pocillos retornen
                          //al estado de reposo
for(x = 0; x < cantidad_pasos; x++)
{
    digitalWrite(stepPin, HIGH);
    delayMicroseconds(2000);
    digitalWrite(stepPin, LOW);
    delayMicroseconds(2000);
}

if (reposo==0&&cantidad_pasos>15) //se pone la limitación en la
//cantidad de pasos porque para valores de paso menores el despla-
zamiento es tan pequeño que el imán nunca sale del rango de detección
del sensor Hall)
    do
    {digitalWrite(stepPin, HIGH);
      delayMicroseconds(2000);
      digitalWrite(stepPin, LOW);
      delayMicroseconds(2000);
    }while(reposo==0);

reposo=0;

cambio_estado=0;           //resetear variable antes de cambiar el
                          //sentido de giro

if(digitalRead(boton)==LOW);
{
    delay(50); //eliminación de rebote por software
    while(digitalRead(boton)==LOW);
}

if(FT1==855){             //855*4.194 segundos es aproximadamente una hora
    FT1=0;                //en primer lugar, se reinicia el contador de
                          //interrupciones por timer1

    float h = dht.readHumidity();
    float t = dht.readTemperature();

    if (isnan(h) || isnan(t)) {
        Serial.println(";Error al leer el sensor de temperatura y hume-
dad!");
        return;
    }

    Serial.print("Humedad: ");
    Serial.print(h);
    Serial.println(" %\t");
```

```
Serial.print("Temperatura: ");  
Serial.print(t);  
Serial.println(" °C ");  
}  
  
delay(retardo);  
}
```