



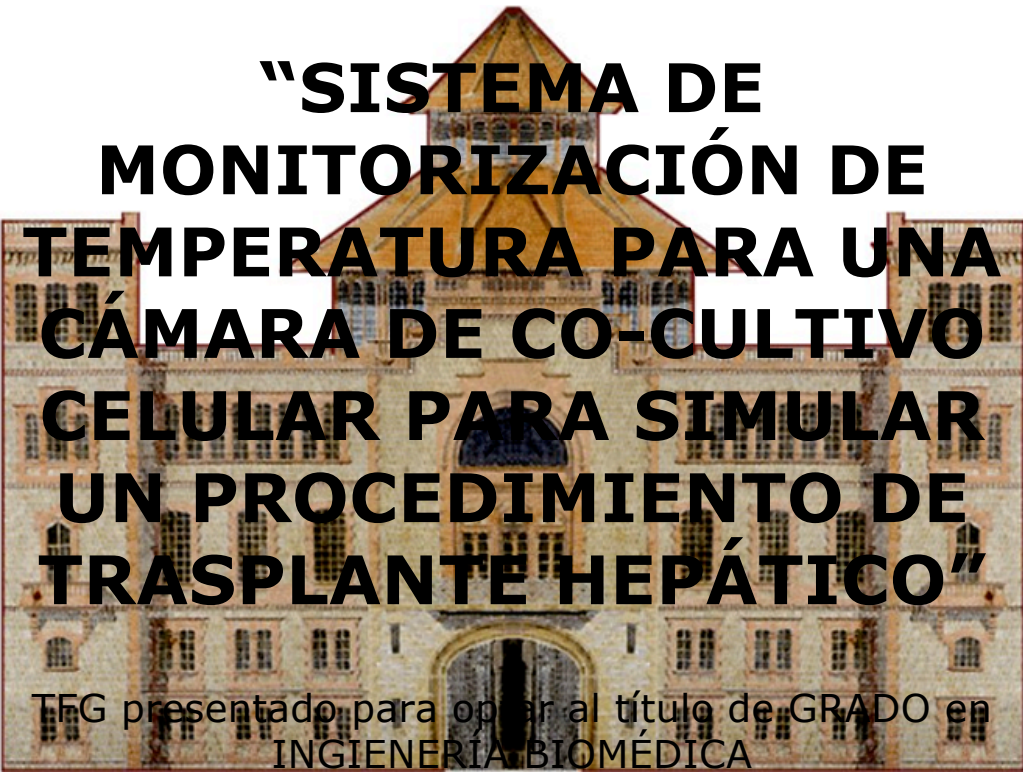
Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Volumen I

Memoria – Presupuesto – Anexo

TRABAJO DE FINAL DE GRADO



“SISTEMA DE MONITORIZACIÓN DE TEMPERATURA PARA UNA CÁMARA DE CO-CULTIVO CELULAR PARA SIMULAR UN PROCEDIMIENTO DE TRASPLANTE HEPÁTICO”

TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA

por **Júlia Villalba Burrull**

Barcelona, 09 de Junio de 2015

Tutor proyecto: Beatriz Giraldo Giraldo
Departamento de Ingeniería de Sistemas,
Automática e Informática industrial (ESAII)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE MEMORIA	5
ÍNDICE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	10
Resum.....	11
Resumen	12
Abstract	13
Agradecimientos	15
Capítulo 1: Justificación, objetivos y alcance	17
1.1. Justificación	17
1.2. Objetivos.....	18
1.2.1. Objetivo principal	18
1.2.2. Objetivos específicos.....	18
1.3. Alcance	19
Capítulo 2: Introducción	20
2.1. Institut de Microelectrònica de Barcelona.....	20
2.2. Institut d’Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS) ...	21
2.3. Ventajas de simular las condiciones de un trasplante hepático en el Organ on a Chip.....	21
Capítulo 3: El trasplante hepático	25
3.1. El hígado	25
3.1.1. Estructura del hígado	26
3.2. Características del trasplante hepático	28
3.2.1. Causas del trasplante hepático	29
3.2.2. Tipos de trasplante hepático	30
3.2.3. Procedimiento del trasplante hepático	32
3.2.4. Fases temperatura durante un trasplante hepático.....	33
Capítulo 4: Organ on a Chip	36
4.1. Concepto de <i>Liver On a Chip</i>	37
4.2. Experiencia del GAB en Organ on a Chip.....	37
Capítulo 5: Sistema de adquisición de datos	44

5.1.1. Características principales de un sistemas de adquisición de datos	45
5.1.2. Sensores de temperatura.....	47
5.1.3. Microcontroladores.....	50
5.1.4. Interfaz gráfica de usuario: Matlab GUI	51
Capítulo 6: Diseño e implementación del sistema de monitorización de temperatura	53
6.1. Sensor de temperatura: Termistor NTC	53
6.1.1. Acondicionamiento de señal	54
6.1.2. Integración del sensor en el biorreactor.....	57
6.2. Adquisición datos: Arduino.....	60
6.2.1. Configuración Hardware Arduino.....	62
6.2.2. Configuración Software Arduino.....	62
6.3. Interfaz Usuario: Matlab GUI.....	65
6.3.1. Configuración Matlab GUI	65
Capítulo 7: Diseño e implementación del sistema de simulación de las condiciones del trasplante hepático	72
7.1. Diseño de la simulación de las condiciones de un trasplante hepático .	73
7.1.1. Fases simuladas	73
7.1.2. Material para la simulación	78
7.1.3. Cálculo caudal	79
7.1.4. Calibración bomba peristáltica.....	81
Capítulo 8: Parte experimental	82
8.1. Experimentos: Simulación isquemia – reperfusión	82
8.1.1. Experimento 1.....	89
8.1.2. Experimento 2.....	92
8.1.3. Experimento 3.....	96
Capítulo 9: Conclusiones	99
Bibliografía.....	101
9.1. Referencias bibliográficas	101
9.2. Bibliografía de Consulta	103
ÍNDICE PRESUPUESTO.....	106
Presupuesto	107
1. Recursos humanos	107
2. Recursos materiales.....	108

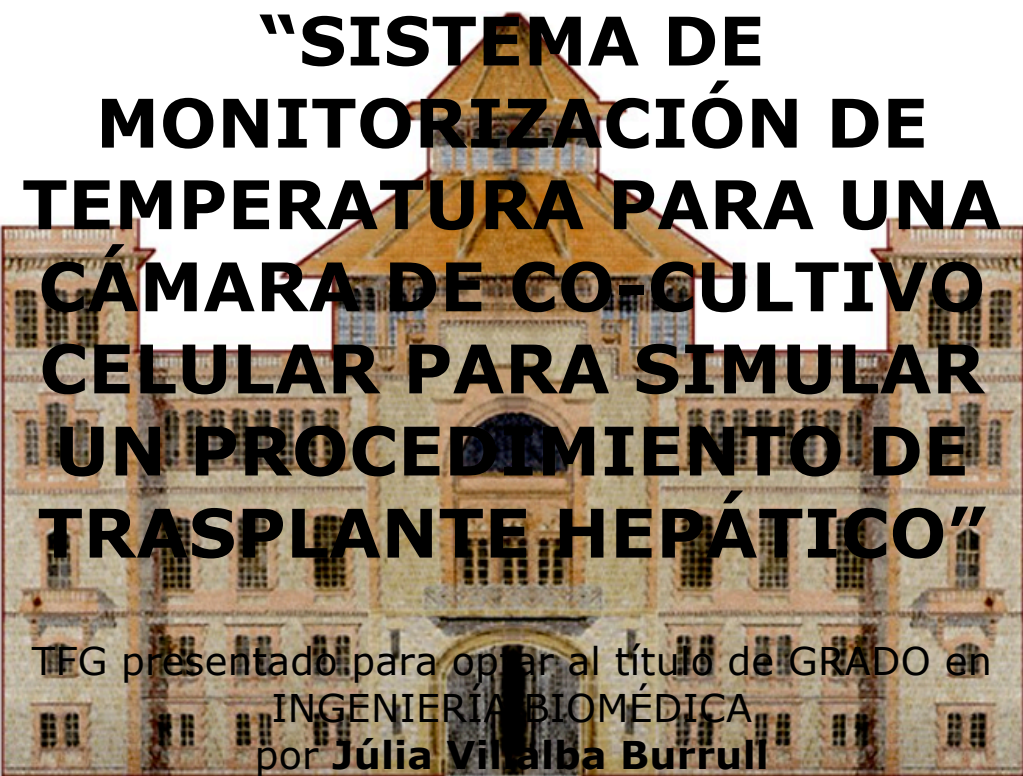
2.1. Sistema de monitorización de temperatura	108
2.2. Sistema de simulación de un procedimiento de trasplante hepático	109
3. Coste total.....	110
ÍNDICE ANEXO.....	112
1. Programa Arduino	113
2. Programa Matlab	115



Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Memoria



**“SISTEMA DE
MONITORIZACIÓN DE
TEMPERATURA PARA UNA
CÁMARA DE CO-CULTIVO
CELULAR PARA SIMULAR
UN PROCEDIMIENTO DE
TRASPLANTE HEPÁTICO”**

TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA
por **Júlia Vilalba Burrull**

Barcelona, 09 de Junio de 2015

Director: Beatriz Giraldo Giraldo
Departamento de Ingeniería de Sistemas,
Automática e Informática industrial (ESAII)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE MEMORIA

ÍNDICE MEMORIA	5
ÍNDICE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	10
Resum.....	11
Resumen	12
Abstract	13
Agradecimientos	15
Capítulo 1: Justificación, objetivos y alcance	17
1.1. Justificación	17
1.2. Objetivos	18
1.2.1. Objetivo principal	18
1.2.2. Objetivos específicos.....	18
1.3. Alcance	19
Capítulo 2: Introducción	20
2.1. Institut de Microelectrònica de Barcelona.....	20
2.2. Institut d’Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS) ...	21
2.3. Ventajas de simular las condiciones de un trasplante hepático en el Organ on a Chip.....	21
Capítulo 3: El trasplante hepático	25
3.1. El hígado	25
3.1.1. Estructura del hígado	26
3.2. Características del trasplante hepático	28
3.2.1. Causas del trasplante hepático	29
3.2.2. Tipos de trasplante hepático	30
3.2.3. Procedimiento del trasplante hepático	32
3.2.4. Fases temperatura durante un trasplante hepático.....	33
Capítulo 4: Organ on a Chip.....	36
4.1. Concepto de <i>Liver On a Chip</i>	37
4.2. Experiencia del GAB en Organ on a Chip.....	37
Capítulo 5: Sistema de adquisición de datos	44
5.1.1. Características principales de un sistemas de adquisición de datos... ..	45
5.1.2. Sensores de temperatura.....	47

5.1.3. Microcontroladores.....	50
5.1.4. Interfaz gráfica de usuario: Matlab GUI	51
Capítulo 6: Diseño e implementación del sistema de monitorización de temperatura.....	53
6.1. Sensor de temperatura: Termistor NTC	53
6.1.1. Acondicionamiento de señal	54
6.1.2. Integración del sensor en el biorreactor.....	57
6.2. Adquisición datos: Arduino.....	60
6.2.1. Configuración Hardware Arduino.....	62
6.2.2. Configuración Software Arduino.....	62
6.3. Interfaz Usuario: Matlab GUI.....	65
6.3.1. Configuración Matlab GUI	65
Capítulo 7: Diseño e implementación del sistema de simulación de las condiciones del trasplante hepático	72
7.1. Diseño de la simulación de las condiciones de un trasplante hepático .	73
7.1.1. Fases simuladas	73
7.1.2. Material para la simulación	78
7.1.3. Cálculo caudal	79
7.1.4. Calibración bomba peristáltica.....	81
Capítulo 8: Parte experimental.....	82
8.1. Experimentos: Simulación isquemia – reperfusión	82
8.1.1. Experimento 1.....	89
8.1.2. Experimento 2.....	92
8.1.3. Experimento 3.....	96
Capítulo 9: Conclusiones	99
Bibliografía	101
9.1. Referencias bibliográficas	101
9.2. Bibliografía de consulta	103

ÍNDICE FIGURAS

Figura 2.1. Centro Nacional de Microelectrónica.	20
Figura 2.2. Actividad de trasplante hepático (pmp). España versus otros países. 2005-2013	22
Figura 2.3. Hígados no válidos (nº absoluto y porcentaje). 1990-2013	23
Figura 2.4. Causas de no implante. 2013	23
Figura 2.5. Causas de hígado patológico. 2013.	24
Figura 3.1. Situación del hígado en el cuerpo humano.	26
Figura 3.2a. Corte 2D de la estructura de un hígado.	28
Figura 3.2b. Ilustración 3D de media estructura acino.	28
Figura 3.2c. Ilustración de un sinusoides hepático.	28
Figura 3.3. Trasplante hepático. Actividad en España. 1993-2013	29
Figura 3.4. Gráfico enfermedad de base de los receptores. 1984-2013	30
Figura 3.5. Hígado monitorizado para el estudio en el CNM.	33
Figura 3.6. Datos de temperatura intraparenquimosa durante el estudio del CNM	34
Figura 3.7. Bolsa estéril con el hígado en el interior.	34
Figura 3.8. Nevera con el hígado en el interior embalado.	35
Figura 4.1. Estructura del Liver on a Chip.	38
Figura 4.2. Sección esquemática del Liver on a Chip	38
Figura 4.3. Esquema del biorreactor de dos placas con detalle de la membrana y de la placa superior.	39
Figura 4.4. Membrana de PTFE con el borde de silicona estructurado sobre ella.	40
Figura 4.5. Parte interior de la tapa superior de la cámara de cultivo.	40
Figura 4.6. Simulación del flujo (velocidad) que circula por el canal.	41
Figura 4.7. Parte superior de la tapa inferior de la cámara de cultivo.	41
Figura 4.8. Cámara de cultivo cerrada con una membrana situada entre ambas tapas.	42
Figura 4.9. Montaje del sistema de perfusión.	43
Figura 5.1. Diagrama de bloques de un sistema de adquisición de datos	45
Figura 5.2. Componentes de un RTD.	48
Figura 5.3. Tipos de termistores	49
Figura 5.4. Placa Arduino UNO.	50
Figura 5.5. Editor de diseño de GUIDE.	52
Figura 6.1. Aguja para la monitorización del miocardio.	54

Figura 6.2. Curva R-T del termistor seleccionado.....	54
Figura 6.3. Esquema del circuito.	55
Figura 6.4. Script de Matlab para el cálculo de R1.	56
Figura 6.5. Gráfica del rango de tensiones (de 4°C a 37°C).....	56
Figura 6.6. Parte superior de la cámara señalando situación del sensor.....	58
Figura 6.7. Parte inferior de la cámara en la fresadora.	58
Figura 6.8a. Termistor.	59
Figura 6.8b. Termistor desmontado.....	59
Figura 6.9. Aguja en la parte superior de la cámara.....	59
Figura 6.10. Termistor integrado en la parte superior de la cámara.	60
Figura 6.11. Conector para el sensor en la placa de Arduino.	62
Figura 6.12. Algoritmo del programa de Arduino.	64
Figura 6.13. Editor Matlab GUI.	66
Figura 6.14. Características cajetín.	67
Figura 6.15. Características botón Open.....	67
Figura 6.16. Características botón Save.	68
Figura 6.17. Características botón Reset.	68
Figura 6.18. Resultado interfaz Matlab GUI.	69
Figura 6.19. Interfaz con botón Close.	69
Figura 6.20. Interfaz con botón Save.....	70
Figura 6.21. Experimento guardado en la carpeta que se encuentra el programa.....	70
Figura 6.22. Resultado de apretar el botón Reset.	71
Figura 7.1. Esquema fases simuladas.	74
Figura 7.2. Esquema diseño sistema de simulación de trasplante hepático.	75
Figura 7.3. Simulación hígado funcionando dentro del paciente.....	75
Figura 7.4. Simulación perfusión del líquido de preservación helado en el hígado.	76
Figura 7.5. Simulación hígado en la nevera.	76
Figura 7.6. Simulación perfusión del suero a 37°C en el hígado.....	77
Figura 7.7. Simulación hígado dentro del receptor.	77
Figura 7.8. Montaje calibración bomba peristáltica.	81
Figura 7.9. Gráfico de datos tomados para la calibración de la bomba.....	81
Figura 8.1. Esterilización cámara en la campana (ultravioleta).	84
Figura 8.2. Medio de cultivo en la membrana.....	84
Figura 8.3. Colocación de la membrana.....	85
Figura 8.4. Cámara con el sensor montada.....	85

Figura 8.5. Esquema montaje inicial.	85
Figura 8.6. Realización del montaje inicial real en la campana.	86
Figura 8.7. Inserción del medio de cultivo en el reservorio.	86
Figura 8.8. Cámaras en el refrigerador.....	87
Figura 8.9. Las dos bombas peristálticas, la incubadora y el sistema de monitorización de temperatura.	88
Figura 8.10. Parte inferior de la cámara en el microscopio.....	88
Figura 8.11a. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 1. Experimento 1.	89
Figura 8.11b. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 2. Experimento 1.	89
Figura 8.12. Gráfico temperaturas. Experimento 1.	90
Figura 8.13a. HUVEC con flujo final.....	91
Figura 8.13b. HUVEC sin flujo final.....	91
Figura 8.13c. Hepatocitos con flujo final.	91
Figura 8.13d. Hepatocitos sin flujo final.	91
Figura 8.14a. Placa P6. HUVEC que han estado sometidos a frío.	92
Figura 8.14b. Placa P6. HUVEC que no han estado sometidos a frío.....	92
Figura 8.14c. Placa P6. Hepatocitos que no han estado sometidos a frío.	92
Figura 8.15a. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 1 Experimento 2.	93
Figura 8.15b. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 2 Experimento 2.	93
Figura 8.16. Monitorización de la temperatura durante el experimento 2.....	94
Figura 8.17a. Cámara sometida a flujo al final.....	95
Figura 8.17b. Cámara no sometida a flujo al final.	95
Figura 8.18a. Placa P6 que ha estado sometida a frío.	95
Figura 8.18b. Placa P6 que no ha estado sometida a frío.....	95
Figura 8.18c. Cámara estática todo el tiempo.	95
Figura 8.19. Monitorización de la temperatura durante el experimento 2.....	97
Figura 8.20a. Hepatocitos Biorreactor 1.	97
Figura 8.20b. Hepatocitos Biorreactor 2.	97
Figura 8.21a. Placa P6 con Hepatocitos que no han estado sometidos a frío. ..	98
Figura 8.21b. Placa P6 con Hepatocitos que han estado sometidos a frío.....	98

ABREVIATURAS

- **ADC:** Conversor Analógico Digital
- **AO:** Orange Acridine
- **CNC:** Control numérico
- **CNM:** Centre Nacional de Microelectrónica
- **CSIC:** Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- **FOSS:** Open Source Software
- **GAB:** Grup d'Aplicacions Biomèdiques
- **GUI:** Interfaz Gráfica de Usuario
- **ICTS:** Infraestructura Científica y Tecnológica Singular
- **IDIBAPS:** Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer
- **IMB:** Institut de Microelectrònica de Barcelona
- **NTC:** Negative Temperature Coefficient
- **ONT:** Organización Nacional de Trasplantes
- **OSHW:** Open Source Hardware
- **PI:** Yoduro de Propidio
- **PMMA:** Metracrilato
- **PNF:** Disfunción Primaria
- **PTC:** Positive Temperature Coefficient
- **RAM:** Random Access Memory
- **RTD:** Resistance Temperature Detector
- **TH:** Trasplante Hepático
- **UAB:** Universitat Autònoma de Barcelona
- **UV:** Ultravioleta
- **UW:** Universidad de Wisconsin

RESUM

El trasplantament hepàtic és un procediment del que s'han realitzat nombrosos estudis al llarg dels anys. En aquest projecte, s'ha dissenyat i implementat un sistema per simular les condicions d'un procediment de trasplantament hepàtic en una càmera de co-cultiu cel·lular, que simula les condicions fisiològiques del fetge (Liver on a Chip), per poder fer estudis sense utilitzar models animals.

Un dels factors més importants per l'èxit del trasplantament, que sempre ha estat lligat a la disfunció primària del fetge, ha estat la temperatura de preservació. Per poder fer futurs estudis, s'ha dissenyat i implementat un sistema de monitorització de temperatura que s'ha integrat al Liver on a Chip.

El sistema de monitorització de temperatura ha estat desenvolupat amb Arduino i com a sensor s'ha utilitzat un termistor. Per la visualització de les dades s'ha realitzat una interfície gràfica d'usuari amb Matlab GUI. Posteriorment, per simular les condicions de trasplantament hepàtic s'ha dissenyat un sistema que permet canviar els líquids que entren al Liver on a Chip y s'ha dissenyat el protocol a seguir. Finalment s'ha realitzat una prova experimental per validar els dos sistemes.

RESUMEN

El trasplante hepático es un procedimiento del que se han realizado numerosos estudios a lo largo de los años. En este proyecto, se ha diseñado e implementado un sistema para simular las condiciones de un procedimiento de trasplante hepático en una cámara de co-cultivo celular, que simula las condiciones fisiológicas del hígado (Liver on a Chip), para poder hacer estudios sin utilizar modelos animales.

Uno de los factores mas importantes para el éxito del trasplante, que siempre ha estado ligado a la disfunción primaria del hígado, ha sido la temperatura de preservación. Para poder hacer futuros estudios, se ha diseñado e implementado un sistema de monitorización de temperatura que se ha integrado en el Liver on a Chip.

El sistema de monitorización de temperatura ha sido desarrollado con Arduino y como sensor se ha utilizado un termistor. Para la visualización de los datos se ha realizado una interfaz gráfica de usuario con Matlab GUI. Posteriormente, para simular las condiciones del trasplante hepático se ha diseñado un sistema que permite cambiar los líquidos que entran en el Liver on a Chip y se ha diseñado el protocolo a seguir. Finalmente, se ha realizado una prueba experimental para validar los dos sistemas.

ABSTRACT

The liver transplantation is a procedure, which has been studied for many years. In this project, the conditions of a liver transplantation have been simulated in a co-culture cell chamber, which simulates the physiological conditions of the liver (Liver on a Chip), for the use of further studies.

One of the main factors for the transplantations success, which has always been linked to the primary dysfunction of the liver, has been the preservation temperature. A monitoring system that tracks the temperature has been designed in order to research and improve the liver transplantation procedure.

The monitoring system that tracks the temperature has been developed with Arduino and a thermistor has been used as a sensor. A graphical user interface has been created using Matlab GUI for the visualization of the data. Also a fluidic system has been designed in the co-culture cell chamber for the simulation of the transplant. Finally, an experiment has validated both designs implemented in the project.

AGRADECIMIENTOS

Dar las gracias a Beatriz Giraldo, tutora del proyecto. A Jordi Gracia-Sancho por darme la oportunidad de realizar la parte experimental en IDIBAPS. A María Navarro por su tiempo dedicado en la realización de las pruebas del sistema y en especial a Rosa Villa y José Yeste por su paciencia, guía y buenos consejos a lo largo del desarrollo del proyecto.

Quisiera también agradecer a mi familia y amigos, en especial a Lourdes por su confianza, a mis padres, a Ricard y a Alejandro por todo el apoyo que día a día recibo y que sin el cual este trabajo jamás hubiese existido.

CAPÍTULO 1: JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y ALCANCE

Este primer capítulo está compuesto por tres apartados que completan el presente proyecto. El primero, denominado justificación, contiene las razones de su realización y la importancia del mismo. En el segundo apartado se expone el objetivo principal y los específicos propuestos para la realización del proyecto. Y por último, en el tercer apartado, se describe el alcance.

1.1. Justificación

El éxito de un trasplante depende de una conjunción de hechos, de los cuales se han realizado numerosos estudios; la temperatura óptima de preservación del órgano, tiempo de isquemia, fármacos para reducir daños durante la isquemia-reperusión, etc. El presente proyecto puede resultar muy útil para hacer nuevos hallazgos en el campo del trasplante hepático, ya que es la primera vez que se pretende simular las condiciones de un trasplante hepático en un Organ On a Chip.

En la actualidad, los estudios de trasplantes hepáticos se basan en la experimentación animal. Hoy en día los Organ on a Chip son una tecnología

investigación que se está desarrollando pero ya existen muchos modelos. Estos son una evolución de las técnicas in vitro convencionales que replican condiciones fisiológicas de una manera mas real que los cultivos convencionales. Realizar estudios sobre el trasplante hepático en un Organ On a Chip supondría llegar a nuevos hallazgos con un ahorro en el uso de animales así como una metodología rápida y de bajo coste.

La integración del sistema de monitorización de temperatura en la cámara microfluídica se ha realizado debido a la gran importancia que tiene este factor en el éxito del trasplante por lo que resultaría útil conocer esta variable a tiempo real durante los experimentos y poder hacer estudios donde intervenga este factor.

1.2. Objetivos

1.2.1. *Objetivo principal*

El objetivo principal del proyecto ha sido simular en una cámara fluídica con co-cultivos celulares (*Organ on a Chip*) las condiciones que se presentan durante un trasplante hepático. Además se propuso diseñar e implementar un sistema para la monitorización la temperatura durante la simulación de un trasplante hepático en el Organ on a Chip.

1.2.2. *Objetivos específicos*

Los objetivos específicos para la implementación del sistema de control de temperatura y para la simulación de las condiciones de trasplante fueron los siguientes:

- Definición de conceptos previos; *Organ On a Chip*, trasplante hepático, estructura cámara de co-cultivos, etc.
- Estado del arte de sistemas de monitorización de temperatura.
- Definición de los componentes y software utilizados para el sistema de monitorización (sensores, Arduino y Matlab GUI).
- Definición de las ventajas de la simulación del trasplante hepático en el Biorreactor.
- Diseño e implementación del sistema de monitorización de temperatura, y del protocolo a seguir para la simulación de un procedimiento de trasplante hepático.
- Validación experimental de los sistemas diseñados.

1.3. Alcance

Realizando la simulación de un procedimiento de trasplante hepático en un Organ on a Chip se podrían realizar numerosos estudios a cerca de todos los factores que intervienen en el éxito del trasplante.

Hoy en día, los Organ on a Chip se utilizan para realizar estudios de toxicidad de fármacos. La mayoría de los fallos primarios del órgano durante la primera semana después de la realización del trasplante hepático son a causa de los daños producidos por la isquemia reperusión. Se han realizado distintos estudios en los que se pretende conseguir un fármaco que reduzca estas lesiones pero la mayoría no han alcanzado una aplicación clínica. La simulación del trasplante en la cámara podría resultar muy útil para la prueba de estos fármacos para minimizar esta problemática.

El protocolo de isquemia reperusión que simula el sistema diseñado, permitirá realizar estudios in vitro que simulan mejor los comportamientos in vivo. Con este diseño se abrirán nuevas líneas de investigación que permitirán mejorar el procedimiento de trasplante de órgano (estudios comparativos entre líquidos de preservación, tolerancia a tiempos de isquemia, temperatura óptima de preservación, etc.).

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

Se trata de un proyecto multidisciplinar que se ha desarrollado en dos centros distintos. La parte tecnológica se ha trabajado en el Institut de Microelectrònica de Barcelona y la parte biológica en el Laboratorio de Hemodinámica de Barcelona del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer donde se han realizado los experimentos. A continuación se realiza una breve explicación de cada uno de los centros.

2.1. Institut de Microelectrònica de Barcelona

El proyecto ha sido desarrollado en el *Grup d'Aplicacions Biomèdiques* (GAB) del *Institut de Microelectrònica de Barcelona* (IMB). El IMB (Figura 2.1) es uno de los tres institutos que forman el *Centro Nacional de Microelectrónica* (CNM), el centro de investigación y desarrollo de Micro-Nanosistemas de España, el cual pertenece al *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, el CSIC.



Figura 2.1. *Centro Nacional de Microelectrónica.*

El IMB está situado en Bellaterra, en el campus de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) i tiene un equipo de unas 200 personas aproximadamente. Las estructuras principales del IMB-CNM son la Sala Blanca de Micro y Nanofabricación i algunos laboratorios complementarios para procesado de microsistemas, encapsulado de dispositivos y caracterización eléctrica. Todo este equipamiento está considerado como una "Infraestructura Científica y Tecnológica Singular" (ICTS).

Las actividades de investigación que se desarrollan en el GAB están en el marco de Micro-Nano-Biosistemas, es una de las líneas de investigación mas productivas del IMB. La misión principal del GAB es aprovechar las capacidades tecnológicas que ofrece el IMB para crear microsistemas aplicados a la biomedicina, las tecnologías en desarrollo y la fabricación de dispositivos innovadores capaces de ofrecer nuevas soluciones a diferentes aplicaciones en este campo. Actualmente una de las líneas de investigación del GAB esta centrada en el diseño y desarrollo de diferentes Organ on a Chip.

2.2. Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Las pruebas experimentales se han realizado en el Laboratorio de Hemodinámica Hepática de Barcelona del *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* (IDIBAPS/CIBER-EHD).

Este proyecto se realiza en colaboración con el Laboratorio de Hemodinámica Hepática Barcelona donde se está usando el biorreactor para el desarrollo de investigaciones de las enfermedades del hígado como por ejemplo la hepatitis, el carcinoma hepatocelular, la cirrosis, etc., así como para pruebas y elección de terapias personalizadas utilizando células hepáticas obtenidas de pacientes.

2.3. Ventajas de simular las condiciones de un trasplante hepático en el Organ on a Chip

El éxito del trasplante depende de una conjunción de hechos, entre los que los factores dependientes del donante son el primer eslabón cronológico (Seller-Pérez et al. 2008).

La principal limitación del trasplante hepático hoy en día es la falta de donantes. En España hay una tasa muy alta de donantes de órganos comparado con el resto de países, pero aun así el número de pacientes en lista de espera es mayor que el número de donantes.

El número total de trasplantes hepáticos realizados en territorio español durante el año 2013 es de 1093. Esto supone una tasa de 23,2 trasplantes por millón de habitantes, lo que sitúa a España entre las máximas registradas a nivel internacional junto con Bélgica, Croacia, Portugal o EUA, datos 2011 (Fig. 2.2).

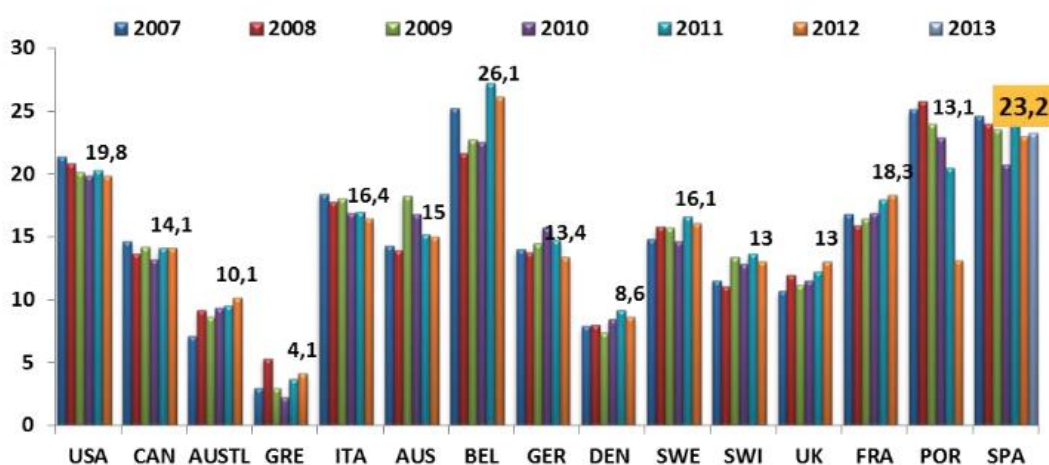


Figura 2.2. Actividad de trasplante hepático (pmp). España versus otros países. 2005-2013 (Organización Nacional de Trasplantes 2013).

Para contrarrestar la falta de órganos disponibles para ser trasplantados se han desarrollado diversas estrategias con el fin de optimizar el uso de los órganos de los que se dispone. Estas estrategias han ido encaminadas a aumentar, entre los órganos disponibles, el número de órganos que son trasplantados mediante: la reevaluación y ampliación de las variables de aceptación de un órgano para ser trasplantado; y el desarrollo de diversas técnicas de trasplante alternativas a la convencional.

No todos los órganos disponibles para ser trasplantados son aceptados (Figura 2.3). Los órganos son sometidos a una valoración individual y una vez conocidas sus características, son aceptados o no para ser trasplantados según unos criterios preestablecidos en la práctica clínica. Debido a la experiencia acumulada con el paso de los años, actualmente el número de órganos aceptados para ser trasplantados ha aumentado debido a que se han ampliado las variables de aceptación de un órgano.

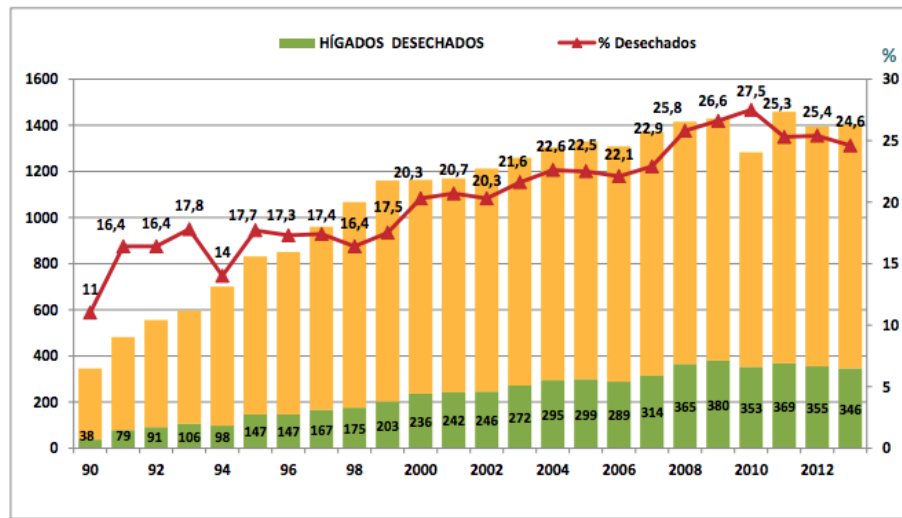


Figura 2.3. Hígados no válidos (nº absoluto y porcentaje). 1990-2013 (Organización Nacional de Trasplantes 2013).

De este modo, la edad máxima y media de los donantes de hígado ha ido ampliándose con los años y este factor ya no es considerado limitante a la hora de seleccionar o no como aceptable un órgano para ser trasplantado. De la misma forma, enfermedades crónicas padecidas por el donante, como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus que anteriormente provocaban que los órganos fueran descartados para trasplantar, no son consideradas actualmente como condición indispensable para que el órgano no sea utilizado.

Pese a todas estas consideraciones, una proporción elevada de los órganos disponibles para ser trasplantados son desechados por considerarse que no son aptos para el trasplante debido a que presentan un alto riesgo de desarrollar disfunción tras la intervención, son los denominados hígados subóptimos o marginales (Figura 2.4).

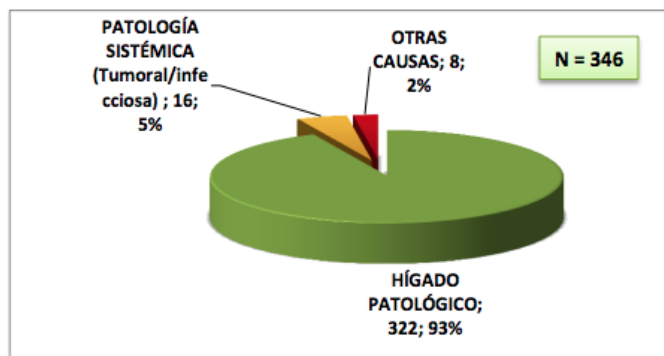


Figura 2.4. Causas de no implante. 2013 (Organización Nacional de Trasplantes 2013).

Una futura línea de investigación podría estar relacionada con la esteatosis hepática que es la mayor causa de no trasplante. Actualmente aproximadamente el 54% de los hígados marginales desechados por ser considerados no aptos para el trasplante son descartados por presentar infiltración grasa (esteatosis hepática) (Esther Carrasco Chaumel 2005) (Figura 2.5).

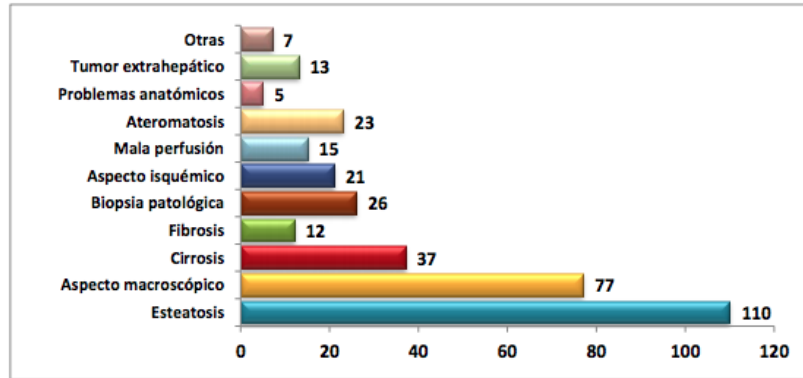


Figura 2.5. Causas de hígado patológico. 2013 (Organización Nacional de Trasplantes 2013).

La temperatura es otro parámetro clave en la preservación de órganos que ha sido constantemente ligado a disfunción primaria (PNF) por este motivo se han llevado a cabo muchas investigaciones utilizando medidas indirectas y/o en modelos animales durante un trasplante.

Otra de las ventajas que tendría tener la simulación de un trasplante de hígado sería poder investigar a cerca de la isquemia reperusión. La isquemia-reperusión esta estrechamente relacionada con el desarrollo de fallos primarios de los injertos (ocurre en menos del 5% de los trasplantes) y con la disfunción primaria de éste (ocurre en el 10-30% de los casos) debido a la lesión celular y de la matriz extracelular, lo que ocasiona mayor incidencia de rechazo inmunitario y favorece la pérdida del hígado trasplantado (Ildefonso and Arias-Díaz 2010).

CAPÍTULO 3: EL TRASPLANTE HEPÁTICO

3.1. El hígado

El hígado es un órgano complejo con multitud de funciones, es el órgano más grande del cuerpo. Es de color marrón y presenta una superficie externa lisa. Tiene un peso aproximado de 1400 g en las mujeres y 1800 g en los hombres, lo que supone alrededor del 2 % del peso de una persona adulta. El hígado recibe el aporte de sangre de dos fuentes: el 80 % le llega desde la vena porta, que tiene su origen en el bazo y el intestino, y el 20 % restante es sangre oxigenada procedente de la arteria hepática (Sibulesky 2013).

Se encuentra en la parte superior derecha abdominal (Figura 3.1) y desempeña un papel central en la homeostasis. Es responsable de la síntesis, el metabolismo, el almacenamiento, filtración y eliminación compuestos de vitales, junto con algunas funciones inmunes.

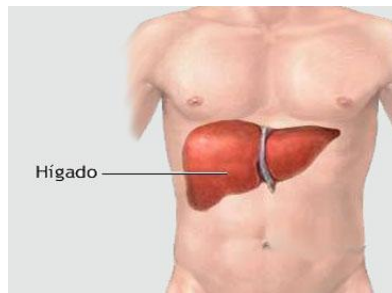


Figura 3.1. Situación del hígado en el cuerpo humano.

A través de la síntesis y la secreción de la bilis, el hígado permite la digestión y absorción de compuestos grasos, y muchos productos de desecho, como la bilirrubina, son eliminados por la secreción de la bilis. El hígado proporciona al cuerpo casi todas las proteínas plasmáticas principales como la albúmina, transferrina, la protrombina, fibrinógeno, lipoproteínas, etc. Una función importante del hígado es el mantenimiento de los niveles de glucosa en la sangre a través de la síntesis de (Glucogénesis) y almacenamiento de la glucosa (como glucógeno) (Tortora and Derrickson 2008).

3.1.1. Estructura del hígado

Está situado en la parte superior derecha del abdomen, justo debajo del diafragma. Se compone por dos lóbulos (derecho e izquierdo), y a su vez cada lóbulo se subdivide en segmentos. A cada segmento le llega una ramificación de la arteria hepática, sale una ramificación de la vena hepática y también le llega una ramificación de la vena porta. A esta paquete vascular tan complejo se le suma la vía biliar, también distribuidas sus ramas desde cada segmento (aecc contra el cáncer 2015).

El parénquima hepático está formado por (*segarra e. fisiología de los aparatos y sistemas, n.d.*):

Lobulillos hepáticos: Son subunidades irregularmente hexagonales (Figura 3.2a) formadas por láminas de hepatocitos que se disponen en forma radial en torno a una vena central, ubicada en el centro del lobulillo.

Espacios porta o tríades: Son áreas triangulares situadas en los ángulos de los lóbulos hepáticos, constituidas por un estroma conjuntivo laxo; contienen en su interior una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conductillo biliar; la bilis producida por los hepatocitos se vierte en una red de canalículos dentro de las láminas de hepatocitos y fluye, en forma centrípeta al lóbulo, hacia los conductillos biliares de los espacios porta.

Sinusoides hepáticos (Figura 3.2c): Son capilares que se disponen entre las láminas de hepatocitos y donde confluyen, desde la periferia de los lóbulos, las ramas de la arteria hepática y de la vena porta (Figura 3.2b); la sangre fluye desde las tríadas hasta la vena central, circulando en forma centrípeta; la pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales, que carecen de membrana basal. En los sinusoides confluyen la circulación hepática y porta. Éstos drenan su contenido a la vena hepática central, de ésta a las venas hepáticas derecha e izquierda, y finalmente a la vena cava inferior.

Espacio de Disse: Es un estrecho espacio perisinusoidal que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie de los hepatocitos. En el espacio de Disse se produce el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma donde se forma la abundante linfa hepática. En este espacio también se encuentran células estrelladas hepáticas, de forma estrellada y su función es almacenar vitamina A, regula y produce tejido conectivo.

Células de Kupffer: Son macrófagos fijos pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear que se encuentran adheridos al endotelio y que emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Su función es fagocitar eritrocitos envejecidos (en un 20 %, y el 80 % en el bazo) y otros antígenos. Además actúan como células presentadoras de antígeno.

Hepatocitos: Constituyen alrededor del 80% de la población celular del tejido hepático. Son células poliédricas con 1 o 2 núcleos esféricos poliploides y un nucléolo prominente. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos, y son muy ricos en orgánulos. Además, en su citoplasma contienen inclusiones de glucógeno y grasa. La membrana plasmática de los hepatocitos presenta un dominio sinusoidal con microvellosidades que mira hacia el espacio de Disse y un dominio lateral que mira hacia el hepatocito vecino. Las membranas plasmáticas de dos hepatocitos contiguos delimitan un canalículo donde será secretada la bilis. La presencia de múltiples orgánulos en el hepatocito se relaciona con sus múltiples funciones: la síntesis de proteínas (albúmina, fibrinógeno y lipoproteínas del plasma), el metabolismo de hidratos de carbono, la formación de bilis, el catabolismo de fármacos y tóxicos y el metabolismo de lípidos, purinas y gluconeogénesis.

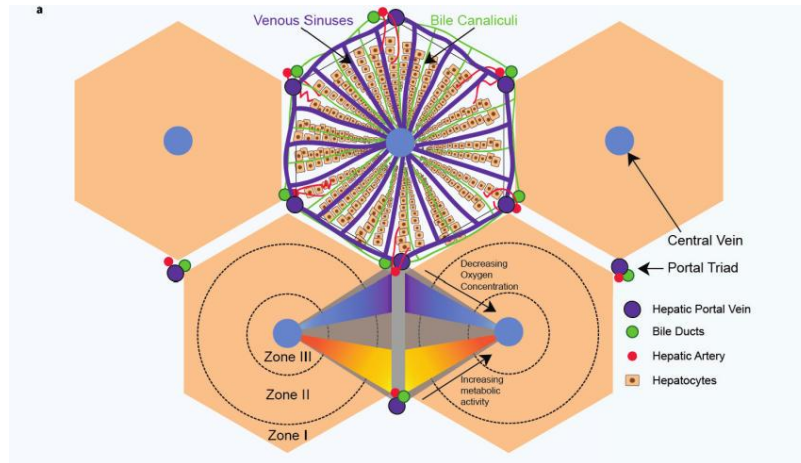


Figura 3.2a. Corte 2D de la estructura de un hígado (Alépée et al. 2014).

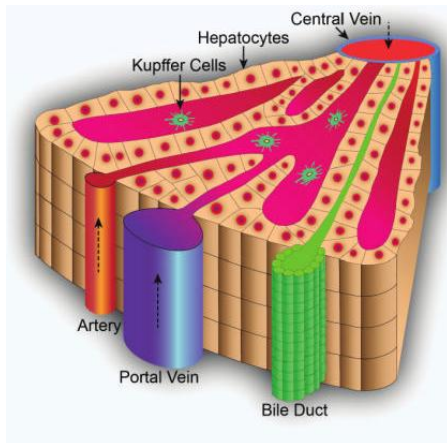


Figura 3.2b. Ilustración 3D de media estructura acino.

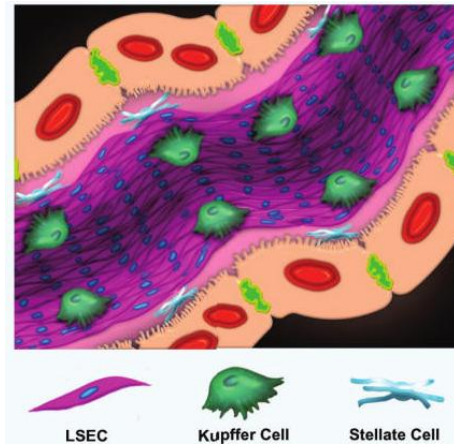


Figura 3.2c. Ilustración de un sinusoides hepático.

3.2. Características del Trasplante hepático

La historia del trasplante hepático (TH) se remonta al año de 1963, cuando Thomas Starzl realizó el primer TH en un niño que padecía atresia biliar, el cual sólo sobrevivió 5 horas. En el mismo año, 2 meses más tarde, Starzl practicó su segundo TH, esta vez en adultos, y se considera a éste como el primer TH exitoso de la historia. El paciente falleció a los 22 días del postoperatorio a causa de una embolia pulmonar (Villa et al. 2006). El TH está indicado en las enfermedades hepáticas progresivas en las que no sean posibles otras medidas terapéuticas y en las que la supervivencia esperada al año sea inferior a la que se conseguiría con el trasplante.

El trasplante hepático, hoy en día, no sólo es una de las alternativas terapéuticas plenamente consolidadas, sino que además se está convirtiendo en uno de los principales tipos de trasplante que se realizan en el mundo, y de forma especial en nuestro país.

Según datos del Registro Mundial de Trasplante desarrollado por la ONT (Organización Nacional de Trasplante) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, cada año se realizan en el mundo más de 21.000 trasplantes hepáticos, lo que hace que la actividad de los equipos españoles de trasplante hepático suponga el 5.4% de la actividad en el mundo, hecho de gran relevancia teniendo en cuenta que la población española representa apenas el 0.7% de la población mundial (Organización Nacional de Trasplantes 2013).

A continuación se puede observar la actividad global de todos los centros españoles desde el inicio de este tratamiento en España.

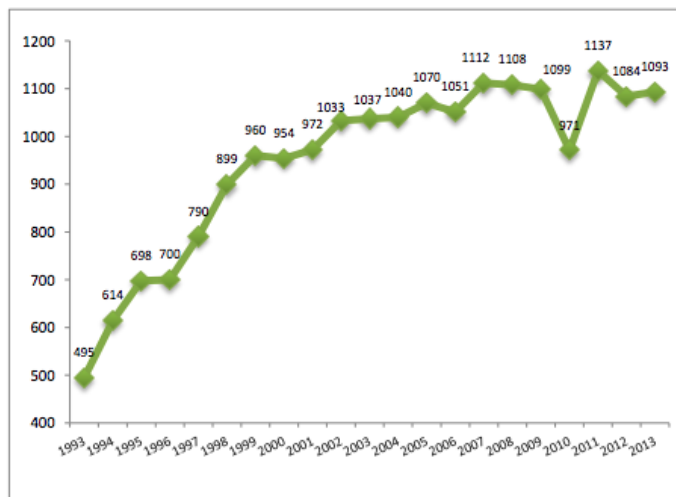


Figura 3.3. *Trasplante hepático. Actividad en España. 1993-2013 (Organización Nacional de Trasplantes 2013).*

3.2.1. *Causas del trasplante hepático*

En los adultos, la causa más frecuente que conduce a la necesidad de un trasplante de hígado es la infección con virus de la hepatitis C crónica. Otras condiciones en adultos que comúnmente requieren un trasplante de hígado incluyen:

- Virus de la hepatitis B
- Enfermedad de hígado graso no alcohólica
- Cirrosis biliar primaria

- Colangitis esclerosante primaria

Entre los tumores, hepatoblastoma (en niños) y carcinoma de hepatocellular (en adultos) son las formas más comunes que requieren un trasplante de hígado. Causas menos frecuentes incluyen sobredosis (accidental o suicida) con medicamentos que dañan el hígado como paracetamol o insuficiencia hepática aguda debido a hepatitis viral A o B.

Algunas condiciones comunes y raras que pueden conducir a insuficiencia hepática y la necesidad de un trasplante de hígado incluyen complicaciones de la cirrosis hepática (Prieto et al. 2003) (Figura 3.4).

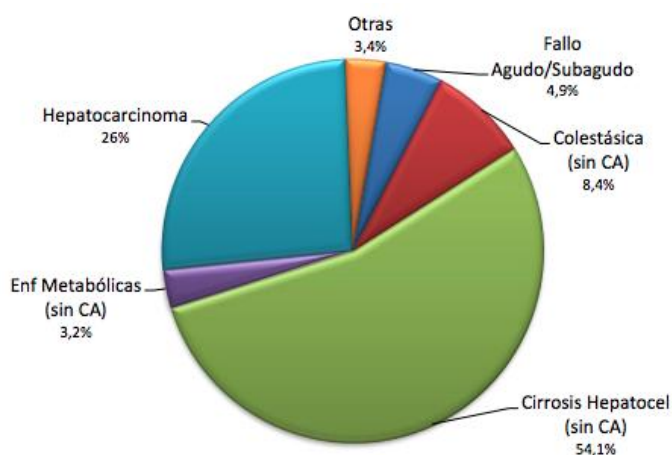


Figura 3.4. Gráfico enfermedad de base de los receptores (1984-2013) (Organización Nacional de Trasplantes 2013).

En los niños, una razón común de trasplante de hígado es atresia biliar, en la cual los conductos biliares que transportan la bilis del hígado a la vesícula biliar y ayuda en la digestión no desarrollados totalmente. En los meses iniciales de vida puede realizarse una cirugía reconstructiva para corregir esta condición. Sin embargo, algunos niños pueden pasar a desarrollar ictericia profunda y la insuficiencia hepática finalmente.

3.2.2. Tipos de trasplante hepático

Existen distintas técnicas de trasplante de hígado que pueden realizarse a un paciente:

Técnica de Split: La técnica de Split o bipartición hepática permite el uso de un solo hígado para trasplantar a dos pacientes diferentes. Inicialmente se desarrolló ante la dificultad de obtener hígados para pacientes pediátricos, ya

que éstos requieren un escaso volumen hepático. De esta forma, esta técnica comenzó a realizarse utilizando un mismo hígado que se implantaba en un receptor pediátrico y en otro adulto (Esther Carrasco Chaumel 2005).

Trasplante dominó. Pacientes con un hígado de estructura y función correcta son sometidos en algunas ocasiones al trasplante del órgano para controlar el avance de un trastorno metabólico que afecta gravemente a su salud, es lo que sucede en pacientes con polineuropatía amiloidótica familiar. El hígado sustraído de estos pacientes puede ser aprovechado para ser trasplantado a su vez en pacientes de edad avanzada o con tumores hepáticos de mal pronóstico en los que la supervivencia esperada tras el trasplante sea menor que el tiempo de desarrollo de los síntomas de polineuropatía amiloidótica familiar (Esther Carrasco Chaumel 2005).

Trasplante hepático con injerto procedente de donante vivo. Consiste en la escisión de un segmento de uno de los lóbulos del hígado de un donante vivo y su posterior implante, generalmente a un familiar con relación sanguínea con el donante. Actualmente esta modalidad quirúrgica representa una alternativa válida y segura en centros con experiencia en cirugía hepática llegando a representar el 25% del total de los trasplantes realizados (Esther Carrasco Chaumel 2005).

Donante a corazón parado. El donante a corazón parado fue en el inicio del trasplante hepático la única fuente de órganos hasta que se aceptó el concepto de muerte cerebral. Actualmente se distinguen dos tipos de donantes a corazón parado, controlados y no controlados. Muchos centros descartan el uso de los donantes no controlados (en los que el fallecimiento del donante ocurre en una situación fuera del control hospitalario) puesto que en este tipo de donantes no se puede conocer con exactitud el tiempo en el que el órgano permanece en el interior del organismo sin irrigación sanguínea antes de su extracción (tiempo de isquemia caliente) y las distintas experiencias en trasplante no son muy alentadoras. Sin embargo, numerosos estudios muestran que el trasplante de hígados y otros órganos, tales como el riñón, procedentes de donantes controlados (en los que el fallecimiento del donante tiene lugar bajo control hospitalario y por lo tanto en los que se puede minimizar el tiempo de isquemia caliente) da lugar a resultados semejantes a los obtenidos con donantes cadavéricos aunque con un mayor riesgo de complicaciones biliares, y por tanto podrían constituir una fuente importante de donantes de hígado (Esther Carrasco Chaumel 2005).

El desarrollo de algunas de estas técnicas ha sido posible debido a la capacidad de regeneración del hígado ante el daño tisular, que a diferencia de otros tejidos con capacidad de regeneración, no depende de un grupo de células germinales (células stem) sino que se produce por la proliferación de las células hepáticas maduras (Esther Carrasco Chaumel 2005).

3.2.3. Procedimiento del trasplante hepático

El tipo de trasplante hepático más corriente es el que se conoce como "trasplante ortotópico". Un trasplante de hígado ortotópico trata de tres operaciones:

- Extracción del hígado enfermo del receptor
- Extracción del hígado sano del donante
- Implante del hígado del donante receptor

La extracción del hígado enfermo del receptor es la más dificultosa de las tres operaciones, por las siguientes razones:

- El hígado es la fábrica de las sustancias coagulantes. Los pacientes con hígados enfermos no fabrican la suficiente cantidad de sustancias coagulantes, con lo que existe la tendencia al sangrado durante la cirugía.
- Un hígado enfermo ocasiona "hipertensión portal", que es un estado de congestión de la sangre que intenta filtrarse por el hígado. Esto hace más compleja la intervención quirúrgica.
- Una gran mayoría de las personas que necesitan un trasplante de hígado es porque tiene cirrosis, un proceso de cicatrización del tejido hepático que hace que la separación o aislamiento del hígado de los tejidos circundantes se vuelve más difícil.

La extracción del hígado del donante se verifica normalmente en el hospital dónde se produjo el fallecimiento. Esta operación no es especialmente difícil. Una vez que el hígado ha sido extraído, se enfría, se le hace fluir toda la sangre interna, y se introduce en una solución de preservación. Se coloca en una bolsa de plástico estéril y se rodea de hielo.

Una vez extraído el hígado enfermo, se introduce el nuevo hígado y se conectan los vasos sanguíneos y los conductos biliares. Se restablece el flujo circulatorio de la sangre y el hígado comienza poco a poco a fabricar las sustancias anticoagulantes, con lo que va disminuyendo progresivamente el riesgo de hemorragias, a la vez que se reduce también progresivamente la hipertensión portal. Se suturan las heridas y el trasplante está finalizado. Con frecuencia hay durante varias horas e incluso días un sangrado persistente, aún cuando la operación se ha desarrollado perfectamente, porque la función del hígado se vuelve perezosa al haberse enfriado en hielo durante varias horas. En casi un 20% de casos, se necesita una segunda operación uno o dos días después del trasplante a fin de limpiar la sangre que ha rezumado durante el periodo en el que el hígado todavía no había empezado a trabajar adecuadamente (Asociación de trasplantados de Asturias 2015).

3.2.4. Fases temperatura durante un trasplante hepático

La temperatura es un parámetro clave en la preservación de órganos que ha sido constantemente ligado a disfunción primaria (PNF). El CNM desarrolló un sistema miniaturizado previo a este proyecto para el monitoreo continuo de la temperatura del injerto durante el trasplante (Figura 3.5), para evaluar el verdadero valor de las temperaturas de almacenamiento utilizando protocolos estándar. Estas medidas abarcaban todo el proceso de trasplante e incluían la fase de transporte completo (Villa et al. 2006).

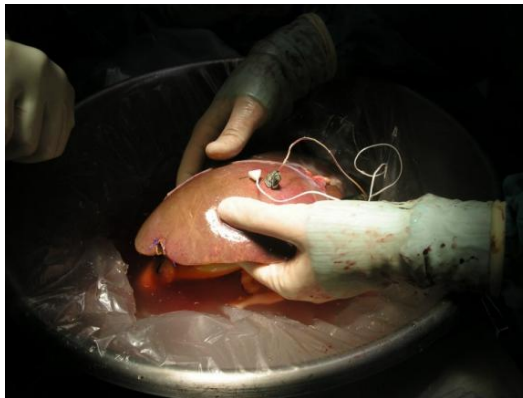


Figura 3.5. *Hígado monitorizado para el estudio en el CNM.*

En el campo de los trasplantes, la hipotermia ha sido considerada como el método estándar para la preservación de órganos. El protocolo seguido implicó la colocación de una bolsa estéril que contenía el órgano sumergido en solución UW en un recipiente con agua y hielo. Debido a que el injerto se perfunde con solución UW fría y la hipotermia se mantiene durante la exposición indirecta al granizado de hielo, se ha dicho siempre que el injerto se mantiene a una temperatura media de 4°C, que es también la temperatura de refrigeradores estándar y salas frías hospitalarias en las que se hace la preservación de los tejidos.

Se llevó a cabo la monitorización de la temperatura intraparenquimal continua del aloinjerto de hígado humano mediante la inserción de la aguja hasta la profundidad máxima en el hígado antes de la perfusión en la cavidad abdominal.

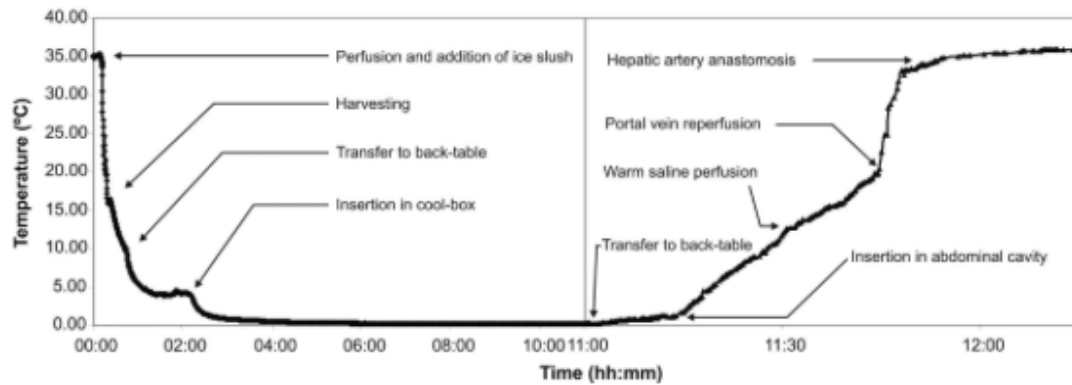


Figura 3.6. Datos de temperatura intraparenquimosa durante el estudio del CNM (Villa et al. 2006).

Los resultados de la Figura 3.6 describen las diferentes etapas de la preservación del injerto. En este trasplante, se utilizó una técnica rápida de perfusión para la recuperación del hígado. Tanto la aorta como la vena portal se canulan sin disección preliminar de la vasculatura hepática. Después del pinzamiento arterial y la perfusión con solución de preservación UW helada, se inicia la adición de granizado de hielo en la cavidad abdominal.

Como puede verse en la Figura 3.6, estos procesos provocan un rápido descenso de la temperatura del injerto, hasta 16 °C en 11 min, después de la perfusión de 2 L de solución de preservación de la Universidad de Wisconsin helada. Durante la siguiente fase (21 min), el hígado se extrae y todas sus estructuras vasculares se identifican en un entorno sin sangre. Al final de este período, la temperatura del hígado desciende a 10 °C, y es en esta temperatura que el injerto se coloca en la 'back table', rodeado de hielo granizado, donde finalmente llega y se estabiliza a 4 °C.



Figura 3.7. Bolsa estéril con el hígado en el interior.

A raíz de los embalajes (Figura 3.7) y de inserción del injerto en al fresco en la nevera de transporte (Figura 3.8), el injerto se enfría hasta 0.1 ° C a 0.2 ° C, una temperatura a la que se mantiene estable durante las próximas 6 horas. Una vez extraído el hígado de la nevera, la temperatura sube lentamente de 0,1°C a 1°C en 10 minutos.

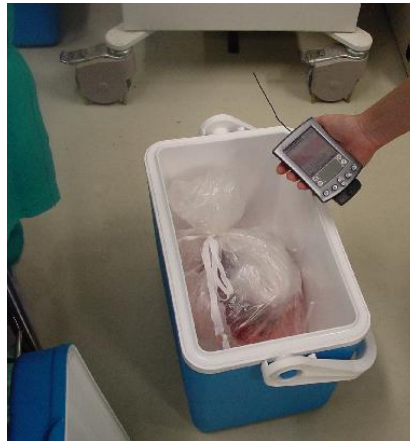


Figura 3.8. Nevera con el hígado en el interior embalado.

Pasado el tiempo de transporte, el hígado es extraído de la nevera y la temperatura del injerto sube de 0,1°C a 1°C en 10 minutos en la "back table". Entre el tiempo previo del refrigerador y el posterior en la "back table" la temperatura estuvo 75 minutos de media a 7°C, este periodo ha sido observado en varios estudios en el tiempo, en el que se decía que tiempos tan largos podían ser perjudiciales y en este trasplante que se realizó el monitoreo de la temperatura se demostró que el hecho de estar 75 minutos a esa temperatura superior a los 4°C no era perjudicial en los casos que hubiese complicaciones, confirmando estudios previos que se habían realizado con trasplantes de hígados de cerdos no estaban en lo correcto.

CAPÍTULO 4: ORGAN ON A CHIP

El concepto de Organ On a Chip es una evolución de las técnicas de los cultivos celulares in vitro convencionales, estos han sido desarrollados para superar las limitaciones de los sistemas in vitro. Aunque los sistemas in vivo, como podrían ser los modelos animales, nos ayudan a entender muchos fenómenos biológicos, a veces son demasiado complicados para algunos estudios (Blitterswijk and Boer 2014). Los *Organ on a Chip* son sistemas de cultivos celulares microfluídicos que simulan la fisiología y las funciones de un órgano y son utilizados para fines biológicos y médicos. Estas cámaras microfluídicas están en perfusión continuamente y son cámaras del tamaño de micrómetros.

El objetivo final no es construir y dar vida a un órgano completo para reemplazar un órgano en un trasplante sino para replicar condiciones fisiológicas y poder realizar estudios en ellos. Esta tecnología tiene un gran potencial para avanzar en el estudio del desarrollo de los tejidos, la fisiología de órganos y la etiología de enfermedades. En el contexto de descubrimiento y desarrollo de medicamentos, es especialmente valioso para el estudio de la toxicidad de los fármacos o para la identificación de biomarcadores.

El sistema más simple de Organ On a Chip es una única cámara microfluídica perfundida, que contiene un tipo de célula cultivada que exhibe funciones de un tipo de tejido. En diseños más complejos, dos o más microcanales están conectados por membranas porosas, bordeadas en lados opuestos por diferentes tipos de células, para volver a crear interfaces entre diferentes tejidos (por ejemplo, pulmón interfaz-alveolar capilar o barrera sangre-cerebro)(Huh et al. 2010).

Estos sistemas pueden incorporar fuerzas físicas, incluidos los niveles fisiológicamente relevantes de tensión de cizallamiento del fluido, deformación cíclica y compresión mecánica, y el análisis de respuestas específicas de órganos, incluido el reclutamiento de células inmunes circulantes, en reacción a los medicamentos, toxinas u otras perturbaciones ambientales. La palabra 'Chip' en el Organ On a Chip se deriva del método de fabricación original, una forma modificada de grabado fotolitográfico utilizado para la fabricación de microchips de ordenador, que permite el control de formas y tamaños característica de la superficie en la misma escala (nm a m) que las células vivas pueden detectar y responder en su medio natural. (Mummery et al. 2014)

4.1. Concepto de *Liver On a Chip*

El hígado es el órgano principal para el metabolismo de los fármacos y por este motivo es un objetivo primario para estudiar la toxicidad producida por ellos. La toxicidad in vivo es una de las principales razones para el fracaso de aproximadamente el 90% de los medicamentos después de la primera i costosa fase de los ensayos clínicos (Khetani et al. 2015).

En modelos in vitro se puede predecir mejor la toxicidad que en los modelos de animales vivos que se utilizan habitualmente para los ensayos preclínicos. Puede ayudar a reducir la tasa de fracaso de los medicamentos en las últimas etapas del proceso del descubrimiento de fármacos. Además, con estos modelos in vitro se eliminarían los problemas de diferencias entre especies y ensayos clínicos humanos y se podrían investigar enfermedades que actualmente no existe ningún buen modelo animal que sirva. Además se reduce el uso de animales para los estudios clínicos.

Para poder llegar a este objetivo, estos sistemas pretenden imitar de manera óptima las condiciones del hígado, para evaluar el metabolismo de los fármacos y la toxicidad. Los sistemas de cultivo estáticos no son ideales ya que carecen de la continua perfusión que tiene el órgano en realidad.

4.2. Experiencia del GAB en Organ on a Chip

Las enfermedades hepáticas son un problema clínico importante en nuestra sociedad, siendo considerado una prioridad en la investigación biomédica. El GAB ha desarrollado un biorreactor de cultivo de células en 3D que imita el interior de

un sinusoide hepático. Para ello, utiliza un sistema de fluídica para establecer un microambiente sinusoidal cercano a la realidad.

El Liver On a Chip desarrollado en el IMB trata de un biorreactor que consiste en una cámara de cultivo donde se adapta una membrana permeable que separa la cámara de cultivo en dos. La membrana está modificada previamente para delimitar el área de cultivo y también para adaptarse al canal del biorreactor, de manera que el cultivo celular que previamente se ha hecho sobre ella es sometido a una tensión de cizallamiento homogénea y controlada. Por otro lado, en el otro compartimento del biorreactor (base de la tapa inferior) se cultiva otro tipo celular y así poder estudiar su comunicación paracrina (Figura 4.1).

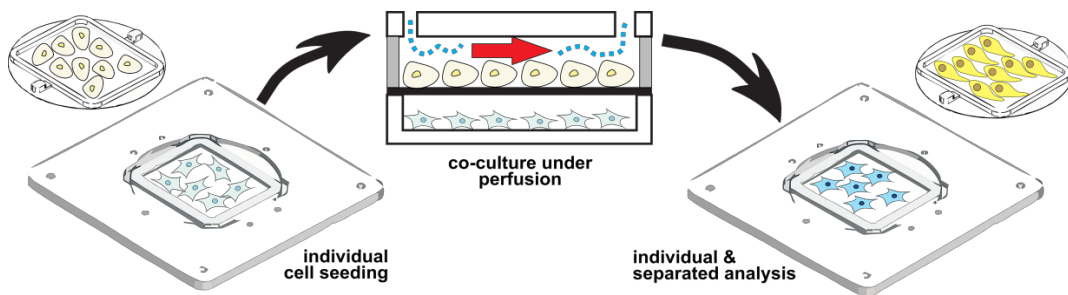


Figura 4.1. Estructura del Liver on a Chip.

En el caso de los experimentos realizados en el GAB, se han cultivado células endoteliales en la membrana y en la parte inferior células hepáticas, simulando así el sinusoide hepático (Figura 4.2).

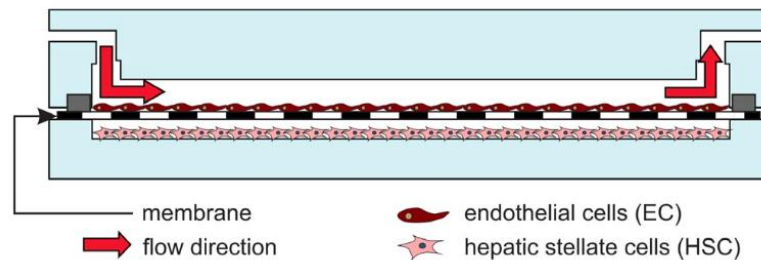


Figura 4.2. Sección esquemática del Liver on a Chip (Illa et al. 2014).

Este sistema permite una gran área de cultivo y al no estar la membrana integrada en la cámara, también permite que los cultivos se puedan realizar independientemente fuera de ella y en condiciones estáticas. Además, la membrana es el único elemento de un solo uso por lo que abarata y simplifica su utilización. Finalmente, y de la misma manera que el sistema permite el cultivo

independiente, también permite el estudio por separado de las células cultivadas una vez terminados los experimentos de co-cultivo.

En resumen, el diseño de la invención se puede dividir en tres partes:

- La membrana permeable que permite la interacción entre los dos tipos celulares.
- La cámara de cultivo que integra los canales microfluídicos y donde se inserta la membrana.
- El sistema fluídico externo de perfusión que incluye el sistema de inyección y recirculación.

La membrana porosa: La membrana porosa (Figura 4.3) usada en los experimentos es una membrana comercial de PTFE, hidrofílica, de 47 μ m de diámetro y poros de 1 μ m (Omnipore, Millipre). Para delimitar el área de cultivo y poder ser usada en la cámara, está modificada mediante la estructuración de un borde fabricado con un adhesivo elastomérico de silicona. De esta forma se define el área de cultivo, hace la función de junta tórica para que la cámara sea estanca bajo perfusión como podemos observar en la figura que se muestra a continuación:

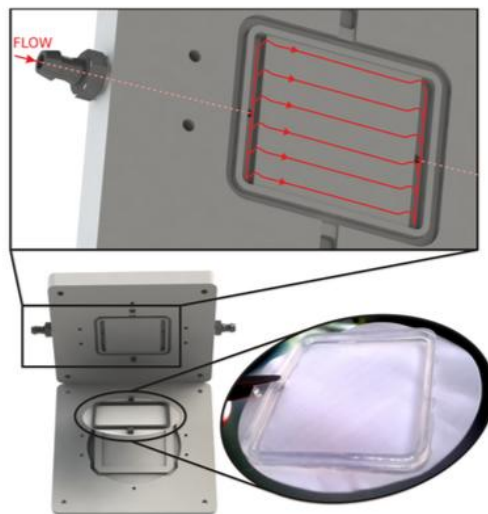


Figura 4.3. Esquema del biorreactor de dos placas con detalle de la membrana y de la placa superior.

Dicha junta está fabricada mediante fresado de un molde en metacrilato con el negativo del borde a fabricar. El molde está relleno con la silicona y tapado con la membrana para que la silicona difunda a través de ella. Seguidamente se expuso la silicona a luz UV para curar la silicona y que queda inmobilizada sobre la membrana. Finalmente se separó del molde obteniendo la membrana con el borde integrado (Figura 4.4).



Figura 4.4. Membrana de PTFE con el borde de silicona estructurado sobre ella.

La cámara de cultivo: La cámara de cultivo está formada por dos partes independientes. Las dos partes están fabricadas en metacrilato (PMMA). El mecanizado de las láminas de PMMA se realizó mediante fresado de alta precisión con control numérico (CNC).

En la parte interior de la tapa superior (Figura 4.5) se estructuran los canales de entrada y salida de líquidos, las piscinas de entrada y salida que sirven para uniformizar el flujo del líquido a lo largo de todo el ancho del canal (tal y como muestran las simulaciones teóricas de la Figura 4.6), el canal que delimita el área de cultivo y el alojamiento exterior dónde se incrusta el borde de silicona estructurado sobre la membrana.

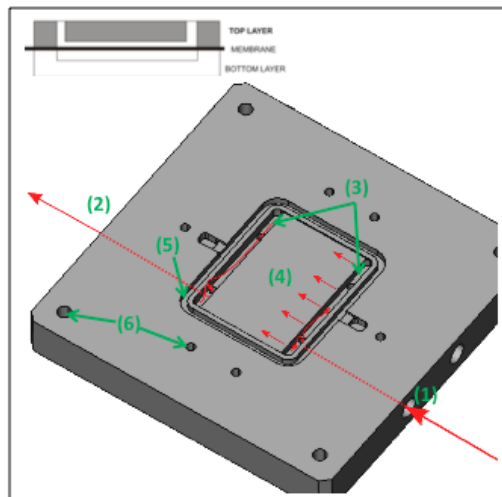


Figura 4.5. Parte interior de la tapa superior de la cámara de cultivo.

A continuación se detallan las partes de la tapa superior de la cámara de cultivo:

- (1) Canal de entrada.

- (2) Canal de salida.
- (3) Piscinas de entrada y salida.
- (4) Canal (piscina) que delimita el área de cultivo de la membrana.
- (5) Alojamiento exterior para incrustar el borde de silicona estructurado sobre la membrana.
- (6) Agujeros para unir las dos piezas de metacrilato. Las flechas rojas indican la dirección y sentido del flujo. De los dos agujeros de entrada y salida solo se ha usado uno (el otro se ha mantenido tapado).

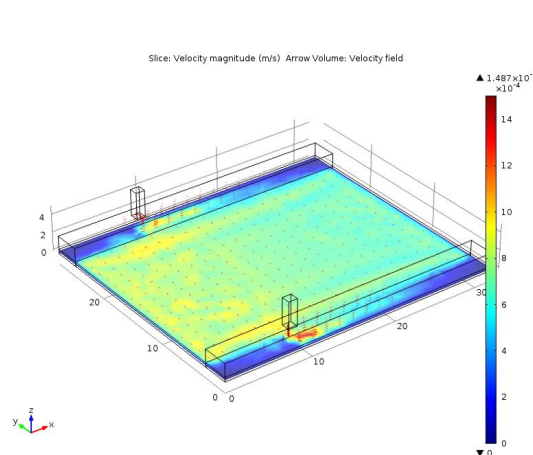


Figura 4.6. Simulación del flujo (velocidad) que circula por el canal.

En la simulación del flujo que circula por el canal que delimitan la membrana y la parte superior del biorreactor se observa que no existen diferencias significativas a lo largo del ancho y largo del canal a parte de las zonas donde hay las piscinas de entrada y salida (donde no hay cultivos).

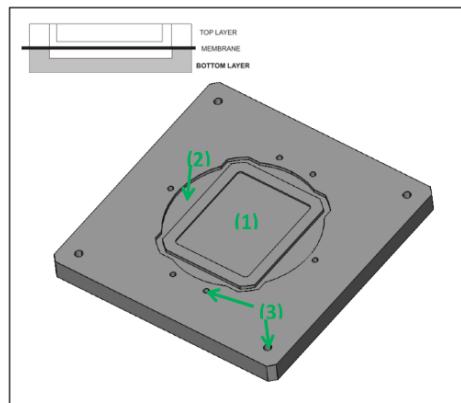


Figura 4.7. Parte superior de la tapa inferior de la cámara de cultivo.

A continuación se detallan las partes de la tapa inferior de la cámara de cultivo:

- (1) Piscina interior, área de cultivo.
- (2) Reservorio para almacenar los excedentes de líquido durante el cultivo en la piscina interior.
- (3) Agujeros para unir las dos piezas de metacrilato.

La tapa inferior (Figura 4.7) de PMMA también está mecanizada mediante fresado de alta precisión. En ella está definida una piscina de cultivo donde se cultiva el segundo tipo celular. También se mecanizó un reservorio externo para almacenar el líquido sobrante al cultivar dentro de la piscina interior.

La estanqueidad del sistema se consigue apretando ambas tapas de metacrilato gracias a los tornillos (Figura 4.8) que se alojan en los agujeros que hay hechos en ambas tapas de la cámara. Al apretar las tapas con la membrana estructurada entre ellas, la silicona actúa como junta tórica haciendo que el sistema sea estanco durante la perfusión. Además, este sistema modular, permite que una vez acabado el experimento la membrana pueda ser sacada de la cámara de cultivo y los diferentes tipos celulares puedan analizarse separadamente.

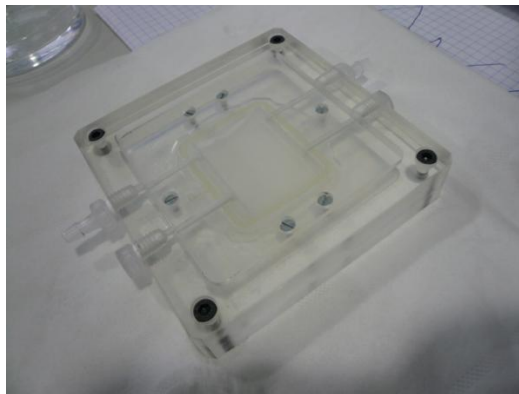


Figura 4.8. Cámara de cultivo cerrada con una membrana situada entre ambas tapas.

El sistema de perfusión: El sistema de perfusión consiste en una bomba peristáltica que inyecta el medio de cultivo contenido en un reservorio a la cámara de cultivo donde en la entrada y salida de líquidos se colocan conectores para poder conectar tubos de silicona por donde fluye dicho medio. La salida de la cámara va conectada directamente al reservorio de manera que el sistema es recirculante.

Antes de la entrada a la cámara de cultivo se instala un filtro antiburbujas (Speedflow, GVS) que evita que las burbujas que se puedan generar en el sistema lleguen a la zona de cultivo.

Durante los experimentos todo el sistema exceptuando la bomba peristáltica se sitúa dentro de una incubadora con % de CO₂ y humedad controlados, tal y como refleja el esquema de la Figura 4.9. Es importante destacar que todos los elementos del dispositivo pueden ser esterilizados mediante óxido de etileno o mediante luz UV (Centro Nacional de Microelectrónica 2014).

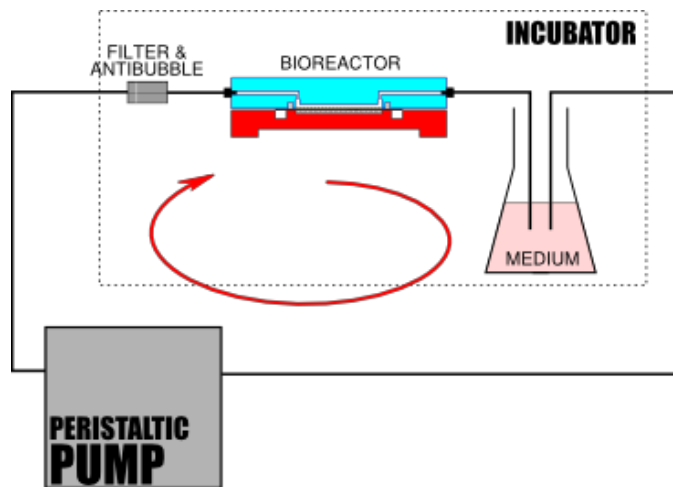


Figura 4.9. Montaje del sistema de perfusión.

CAPÍTULO 5: SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS

Es necesaria una fase inicial de análisis para hacer una selección del hardware y herramientas de software del que se hará uso para realizar un sistema de monitorización de temperatura aplicado a un biorreactor. En este capítulo se va a abordar la fase previa al desarrollo, donde se hace una pequeña descripción de los objetos seleccionados para el sistema de control de temperatura (Arduino i Matlab GUI).

Un sistema de adquisición de datos es un equipo que permite tomar señales físicas del entorno y convertirlas en datos que posteriormente se podrán procesar y presentar. A veces el sistema de adquisición es parte de un sistema de control, y por tanto la información recibida se procesa para obtener una serie de señales de control. En el diagrama de la Figura 5.1 se pueden observar los bloques que componen un típico sistema de adquisición de datos.



Figura 5.1. Diagrama de bloques de un sistema de adquisición de datos (Juan Antonio Rubia Mena 2010).

5.1.1. Características principales de un sistemas de adquisición de datos

A continuación se presentaran de manera general algunas de las características y funciones más sobresalientes de un sistema de adquisición de datos (Neyra and Fernando Gabino 2009).

- Especificaciones de las entradas analógicas.
- Número de canales.
- Velocidad máxima de muestreo.
- Resolución de los datos.
- Mecanismo de muestreo de las entradas analógicas.
- El bus de comunicación con la PC
- El aislamiento eléctrico del dispositivo.
- Software controlador o driver para comunicarse con el equipo.

Conocer cómo afecta cada una de las funciones y características anteriores, el rendimiento total del sistema de adquisición de datos, es clave para determinar si el sistema cumple con los requisitos que el proceso demanda. A continuación se describen las funciones y características anteriores.

Especificaciones de las entradas analógicas: Las especificaciones de la entrada analógica, sirven para determinar la capacidad y precisión del dispositivo de adquisición de datos. Las especificaciones más básicas son: el número de canales, la máxima velocidad de muestreo, la resolución y el rango de entrada.

El número de canales: El número de canales analógicos de entrada se especifica en número de entradas diferenciales y entradas de terminal sencilla. Las entradas de terminal sencilla están referenciadas a una terminal de tierra común. Es recomendable utilizar este tipo de entrada analógica cuando las señales de voltaje son mayores a 1 V, las terminales de la fuente de la señal están a menos de 5 metros y todas las entradas comparten la misma tierra. Si las señales no cumplen con los criterios anteriores, se recomienda utilizar los

canales de entrada en modo diferencial. Con entradas diferenciales, cada entrada tiene su propia referencia a tierra; de esta forma los errores por ruido se reducen debido a que el ruido captado normalmente por una sola terminal se cancela entre las terminales.

Velocidad máxima de muestreo: La velocidad máxima de muestreo de un convertidor analógico/digital determina la velocidad en que ocurren las conversiones. A mayores velocidades de muestreo, se adquieren más datos en un periodo de tiempo y por lo tanto se representa mejor la señal original. Para aplicaciones de múltiples canales, existen dos arquitecturas principales de los convertidores de señal analógica/digital para adquirir las señales: muestreo multiplexado y simultáneo.

Resolución de los datos: La resolución es el número de bits que el convertidor analógico/digital utiliza para representar la señal analógica. A mayores resoluciones, mejor será la detección en los cambios mínimos de voltaje de la señal.

Mecanismo de muestreo: Para configurar un sistema de adquisición de datos de múltiples canales, es importante no sólo considerar la máxima velocidad de muestreo y el número de canales, sino también el mecanismo de muestreo de los canales ya que éste también determinará la velocidad de lectura de los canales de entrada y la precisión del dispositivo de adquisición de datos. En términos generales, se pueden identificar tres mecanismos para el muestreo de los canales analógicos: multiplexado, simultáneo de muestreo y retención y simultáneo con múltiples convertidores de señal analógica/digital. A continuación se describirá cada uno de estos mecanismos y sus áreas de aplicación.

Bus de comunicación con la PC: El propósito principal de un bus de comunicación es enviar comandos y datos entre el dispositivo de medición y una unidad central, como un PC, o entre diferentes dispositivos, como tarjetas insertables. Hoy en día, existe una gran variedad de buses de comunicación disponibles para dispositivos de adquisición de datos: desde buses antiguos, como GPIB o serial hasta buses populares externos como USB. Terminando con buses internos de muy alta velocidad como PCI y PXI Express.

La elección del bus de comunicación en el dispositivo de adquisición de datos dependerá mucho de las características de las aplicaciones en donde se utilizara. En cuestiones de velocidad de transferencia, un bus de comunicación se puede definir por dos características: el ancho de banda y la latencia. El ancho de banda mide la velocidad a la cual los datos son enviados a través del bus, regularmente en mega bytes por segundo, o MB/s. Un mayor ancho de banda es importante para aplicaciones donde se trabaja con señales complejas o señales

de RF. La latencia mide el retraso en la transmisión de datos a través del bus. Una menor latencia introducirá menos tiempo de retraso entre los datos que son transmitidos desde un extremo de comunicación hasta que son procesados en el otro extremo.

Software controlador o driver para comunicarse con el equipo: El controlador es la capa de software que permite la comunicación con el hardware desde el software de aplicación en la PC. El controlador permite al usuario indicar al hardware de adquisición de datos cuáles son los parámetros bajo los cuales debe operar (como el rango o la velocidad de muestreo) además de indicarle las operaciones que debe realizar (configurar la memoria de entrada, leer uno o múltiples canales, etc.). Uno de los beneficios de contar con un controlador es que previene al ingeniero de programar a nivel de registro o enviar comandos complicados de manera manual para acceder a las funciones del hardware. Comúnmente el controlador es uno de los factores menos considerado al momento de elegir un sistema de adquisición de datos; sin embargo, un software controlador intuitivo y con acceso completo al hardware es crucial para asegurar un rápido desarrollo de la aplicación de medición.

5.1.2. *Sensores de Temperatura*

La temperatura es una de las variables más críticas en el momento de monitorizar un cultivo celular por lo que los equipos que se utilizan son de alta precisión. Una precisión de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ o menos, normalmente está considerado adecuado para la monitorización de cultivos celulares, mientras que variaciones de $1 - 1,5^{\circ}\text{C}$ pueden llegar a ser inaceptables en muchos casos.

Los sensores de temperatura son dispositivos que transforman los cambios de temperatura en cambios de señales eléctricas que son procesados por un equipo eléctrico o electrónico. Hay distintos tipos de sensores que pueden medir la temperatura, pero los más comunes son los termopares, las RTDs y los termistores ("Transductores de Temperatura Y Humedad" 2015). El sensor de temperatura, típicamente suele estar formado por el elemento sensor, de cualquiera de los tipos anteriores, la vaina que lo envuelve y que está rellena de un material muy conductor de la temperatura, para que los cambios se transmitan rápidamente al elemento sensor y del cable al que se conectarán el equipo electrónico.

RTD

Los instrumentos de medida de temperatura más comunes utilizados en los procesos biológicos son los RTD (Resistance Temperature Detector). Los RTDs

tienen una alta precisión y alta exactitud con un coste moderado y un tiempo de respuesta de pocos segundos. Un RTD es un sensor de temperatura basado en la variación de la resistencia de un conductor con la temperatura (Figura 5.2). Los metales empleados normalmente como RTD son platino, cobre, níquel y molibdeno. El RTD de platino es una buena opción debido a su alta linealidad y el amplio rango de temperaturas aplicable, por este motivo es el que se utiliza más comúnmente para los cultivos celulares.

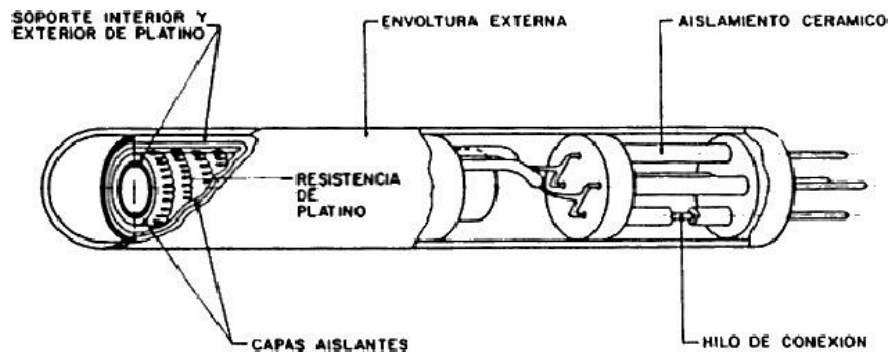


Figura 5.2. Componentes de un RTD (*"Instrumentación Para El Monitoreo de Un Biorreactor"* 2015).

Termopares

El termopar, también llamado termocupla, recibe este nombre por estar formado por dos metales, es un instrumento de medida cuyo principio de funcionamiento es el efecto termoeléctrico. Un material termoeléctrico permite transformar directamente el calor en electricidad, o bien generar frío cuando se le aplica una corriente eléctrica. El termopar genera una tensión que está en función de la temperatura que se está aplicando al sensor. Midiendo con un voltímetro la tensión generada, conoceremos la temperatura.

Para procesos biológicos también se utilizan los termopares. Estos, tienen un coste más bajo y son más robustos que los RTDs; no obstante, la medida de temperatura no es ni tan precisa ni tan estable como lo que obtenemos con un RTD. Por este motivo los termopares se utilizan en procesos menos sensibles a las fluctuaciones de temperatura, por lo que estaría descartado para este sistema.

Termistores

Los termistores están basados en que el comportamiento de la resistencia de un semiconductor variable en función de la temperatura. Pasa una corriente a través

del termistor, a partir de ahí se lee el voltaje y se puede determinar su temperatura, igual que las RTDs. El material base con que están fabricados los termistores es un semiconductor (igual que los transistores) que deja pasar parcialmente la corriente.

Existen dos tipos de termistores, los termistores tipo NTC (Negative Temperature Coefficient) y los termistores tipo PTC (Positive Temperature Coefficient). En los primeros, al aumentar la temperatura, disminuye la resistencia. En los PTC, al aumentar la temperatura, aumenta la resistencia.

El principal problema de los termistores es que no son lineales según la temperatura por lo que es necesario aplicar fórmulas para determinar la temperatura según la corriente que circula. La ventaja de los termistores frente a otros sensores de temperatura es el bajo precio de estos, su amplio rango de medida y lo extendidos que se encuentran, lo que permite encontrar dispositivos a los que se pueden conectar sin mayores problemas.

De igual forma que otros sensores resistivos como la PT100, los termistores sufren el efecto del autocalentamiento por el paso de corriente, por lo que hay que ser cuidadosos en la tensión y corriente que hacemos circular por el sensor para evitar falsos aumentos de temperatura. A continuación vemos una imagen de los distintos tipos de termistores.

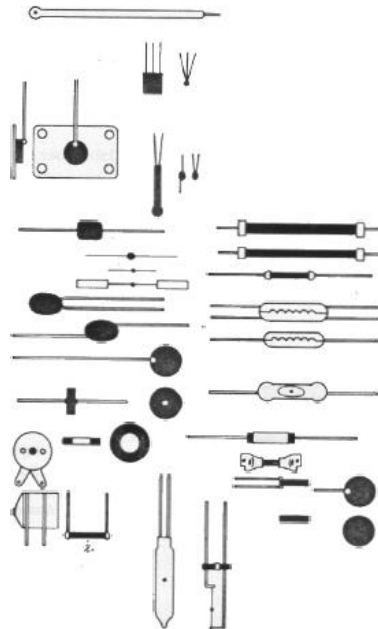


Figura 5.3. Tipos de termistores (*"Instrumentacion Para El Monitoreo de Un Biorreactor"* 2015).

5.1.3. Microcontroladores

Hardware libre

Open source hardware (OSHW) se refiere al conjunto de dispositivos diseñados con la misma filosofía que el software Free and open source software (FOSS). Open source hardware es parte del movimiento Open Source, que se aplica como concepto. El término significa que la información sobre el hardware está accesible fácilmente. Tanto el diseño del hardware se refiere (planos mecánicos, esquemas, PCB, código HDL y disposición del circuito integrado) como a software que utiliza el hardware. Ambos son llevados a cabo con el enfoque de software libre abierto y gratuito. Se eligió una plataforma que sigue esta filosofía (Wagenknecht 2015).

Arduino

Arduino es una plataforma de prototipado electrónico basada en el principio del hardware y software libre. Al igual que Firefox fue en su día el caballo de batalla del software libre, Arduino también lo está siendo en el mundo del Hardware Open Source. Arduino puede tomar información del entorno a través de sus pines de entrada de toda una gama de sensores y puede afectar aquello que le rodea controlando luces, motores y otros actuadores. El microcontrolador en la placa Arduino se programa mediante el lenguaje de programación Arduino (basado en *Wiring*) y el entorno de desarrollo Arduino (basado en *Processing*). Los proyectos hechos con Arduino pueden ejecutarse sin necesidad de conectar a un ordenador, si bien tienen la posibilidad de hacerlo y comunicar con diferentes tipos de software.

A continuación se enumeran una serie de datos importantes que condicionan la elección de la placa Arduino (Figura 5.4) según el uso que le vayamos a dar.

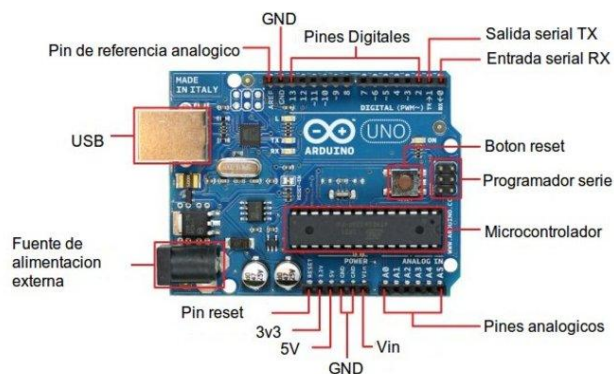


Figura 5.4. Placa Arduino UNO ("Arduino" 2015b).

Lo principal es tener una idea de la cantidad de pines analógicos y digitales que necesitamos para nuestro trabajo. Este primer escrutinio nos permite descartar algunas placas más simples que no tengan suficientes pines o, al contrario, descartar las de mayor número de ellos para reducir los costes puesto que con menos pines nos conformamos.

También podemos deducir el tamaño de código que vamos a generar para nuestros sketches. Un programa muy largo, con muchas constantes y variables demandará una cantidad mayor de memoria flash para su almacenamiento, por lo que se debe elegir una placa adecuada para no quedarnos cortos. La RAM será la encargada de cargar los datos para su inmediato procesamiento, pero no es uno de los mayores escollos, puesto que esto solo afectaría a la velocidad de procesamiento. La RAM va ligada al microcontrolador, puesto que ambos afectan a la agilidad de procesamiento de Arduino.

En los Arduino's oficiales podemos diferenciar entre dos tipos fundamentales de microcontroladores, los de 8 y 32 bits basados en ATmega AVR y los SMART basados en ARM de 32 bits y con un rendimiento superior, ambos creados por la compañía Atmel.

Por último, en cuanto al voltaje, no importan demasiado a nivel electrónico, excepto en algunos casos, para tener en cuenta la cantidad de tensión que la placa puede manejar para montar nuestros circuitos. Esto no supone mayor problema, puesto que una placa de Arduino podría trabajar incluso con tensiones de 220v en alterna con el uso por ejemplo de relés. Pero cuando queremos prescindir de una fuente de alimentación externa, hay que tener en cuenta que este es el voltaje que se puede manejar. Y entre otras cosas marcar el límite para no destruir la placa con sobretensiones no soportadas. Pero no confundas el voltaje al que trabaja el microcontrolador y al que funcionan los periféricos de la placa.

5.1.4. Interfaz gráfica de usuario: Matlab GUI

Las interfaces gráficas de usuario o interfaces de usuario (GUI) permiten un control sencillo (con uso de ratón) de las aplicaciones de software, lo cual elimina la necesidad de aprender un lenguaje y escribir comandos a fin de ejecutar una aplicación.

Las apps de MATLAB son programas autónomos de MATLAB con un frontal gráfico de usuario GUI que automatizan una tarea o un cálculo. Por lo general, la GUI incluye controles tales como menús, barras de herramientas, botones y controles deslizantes. Muchos productos de MATLAB, como Curve Fitting Toolbox, Signal Processing Toolbox y Control System Toolbox, incluyen apps con interfaces de usuario personalizadas. También es posible crear apps personalizadas propias, incluidas las interfaces de usuario correspondientes, para que otras personas las utilicen (MathWorks, 2015). GUIDE (entorno de desarrollo de GUI) proporciona herramientas para diseñar interfaces de usuario para Apps personalizadas (MathWorks 2015).

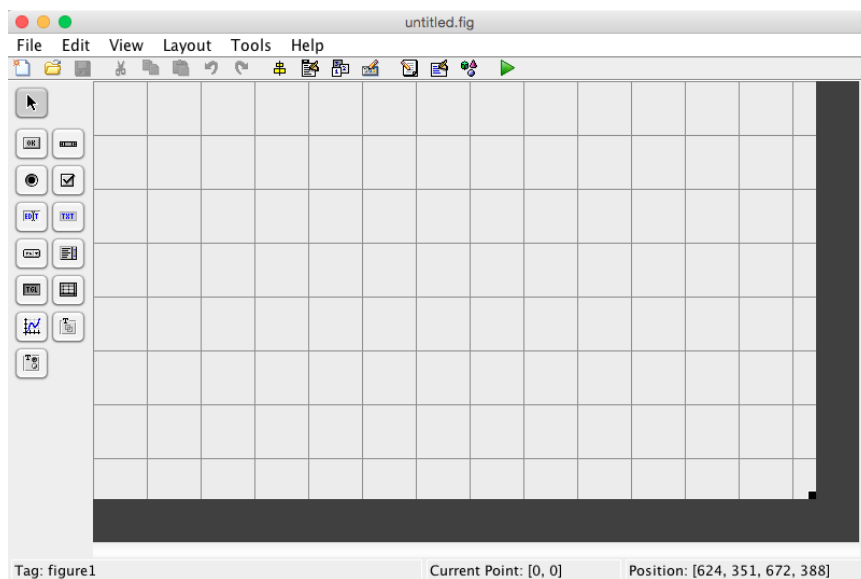


Figura 5.5. *Editor de diseño de GUIDE.*

Mediante el editor de diseño de GUIDE (Figura 5.5), es posible diseñar gráficamente la interfaz de usuario. GUIDE genera entonces de manera automática el código de MATLAB para construir la interfaz, el cual se puede modificar para programar el comportamiento de la app .

CAPÍTULO 6: DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE MONITORIZACIÓN DE TEMPERATURA

A continuación se detallan todos los pasos necesarios para el diseño e implementación del sistema de monitorización y la metodología seguida para la integración de este en el Liver on a Chip. Tanto el material utilizado como la disposición y configuración de estos.

6.1. Sensor de temperatura: Termistor NTC

Uno de los aspectos fundamentales para lograr una adquisición de datos correcta es elegir un sensor óptimo para la aplicación que se desea realizar. Como hemos visto en el marco teórico, existen diferentes sensores que se utilizan actualmente para la monitorización o control de temperatura en biorreactores. Entre ellos, los más frecuentes en cultivos celulares *in-vitro* son los termistores y las RTDs.

Para la monitorización de temperatura en el Biorreactor (Liver on a Chip) se ha optado por un termistor NTC (2123, Genesee BioMedical, Inc.) que podemos observar en la figura 6.1. Se trata de una aguja para la monitorización de la temperatura del miocardio durante la cirugía. Se ha seleccionado por su rango de medida de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y su resolución de $<0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, suficiente para las especificaciones requeridas en nuestra aplicación ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 4 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Figura 6.1. Aguja para la monitorización del miocardio.

6.1.1. Acondicionamiento de señal

Muchos transductores, como los termistores, presentan una variación de la resistencia con la temperatura no lineal. Resulta fundamental realizar un buen acondicionamiento de señal para obtener valores correctos al medir. Los datos del termistor NTC proporcionados por Genesee BioMedical están representados en la siguiente curva Resistencia –Temperatura:

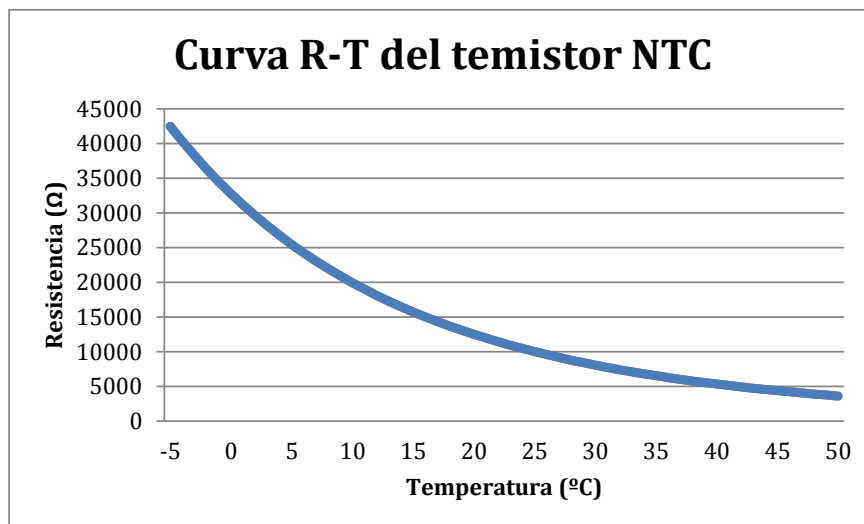


Figura 6.2. Curva R-T del termistor seleccionado.

Para compensar el comportamiento no lineal del sensor se ha optado por un divisor de tensión, tal como en la figura 4.30, donde la tensión de salida (V_S) es:

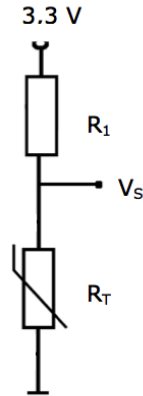


Figura 6.3. Esquema del circuito.

$$V_S = \frac{R_T(T)}{R_1 + R_T(T)} \quad (6.1)$$

Donde R_T es la resistencia del termistor. De esta manera se obtiene un valor de tensión que depende linealmente con la temperatura. Para maximizar la sensibilidad en el rango de temperatura especificado, se ha escogido el valor de R_1 que maximiza el rango de V_S para la escala de temperatura de 4 a 37 °C.

El valor máximo de V_S :

$$V_S = \frac{R_T(37^\circ C)}{R_1 + R_T(37^\circ C)} \quad (6.2)$$

El valor mínimo de V_S :

$$V_S = \frac{R_T(4^\circ C)}{R_1 + R_T(4^\circ C)} \quad (6.3)$$

Conociendo los valores proporcionados por el fabricante:

$$R_T(4^\circ C) = 26740,56 \, \Omega$$

$$R_T(37^\circ C) = 6014,23 \, \Omega$$

y con la ayuda del programa Matlab calculamos el rango de tensión de V_s (4 – 37 °C) dependiendo del valor de R_1 (Figura 6.4):

```
Rpu = linspace(1e3,100e3,1e3); %Creamos vector valores posibles de Rpu
R4 = 26740.56; % R a 4°C
R37 = 6014.23; % R a 37°C

Vin4 = 3.3 .* (R4./(R4+Rpu)); % Valor de tensión mín. a medir
Vin37 = 3.3 .* (R37./(R37+Rpu)); % Valor de tensión máx. a medir

Vr = Vin4 - Vin37; % Rango de tensiones

[Y I] = max(Vr); % Buscamos en que R la tensión Vs es máx.
disp(Rpu(I))

plot(Rpu, Vr)
title('Rango de tensión Vs (de 4°C a 37°C)')
xlabel('R1 (Ohmios)')
ylabel('Vs (V)')
```

Figura 6.4. Script de Matlab para el cálculo de R_1 .

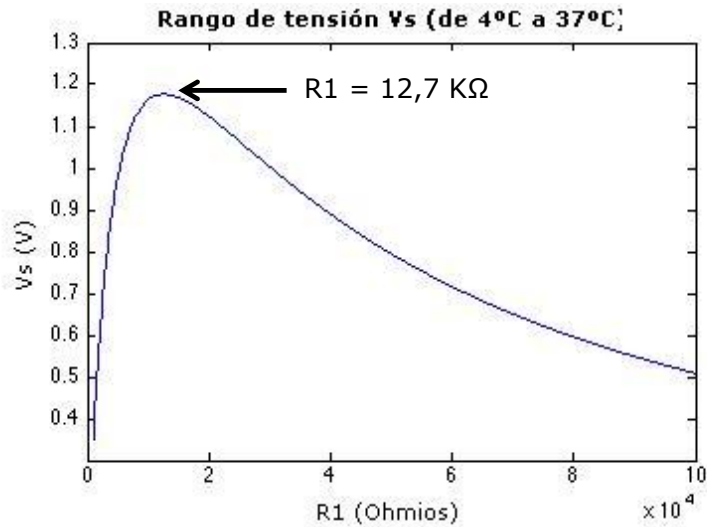


Figura 6.5. Gráfica del rango de tensiones (de 4°C a 37°C).

De la figura 6.5 se obtiene que el rango de tensión de V_s entre 4 y 37 °C es máximo ($\sim 1,2$ V) cuando R_1 vale 1,27 k Ω . Con este valor de R_1 , la potencia disipada en R_T por efecto Joule será inferior a $\sim 0,3$ mW, de manera que el error por autocalentamiento será despreciable.

La curva resistencia/temperatura de un termistor se puede aproximar por la siguiente ecuación:

$$R_t = R_{ref} \cdot e^{B \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} \quad (6.4)$$

Donde las temperaturas están en °K, Rref es la resistencia a la temperatura Tref y B (o β) es una constante del termistor.

La constante del termistor en un rango de temperaturas se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$B = \frac{\ln \left(\frac{R_1}{R_2} \right)}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \quad (6.5)$$

Con los valores dados por el fabricante:

$$B = \frac{\ln \left(\frac{26740,5\Omega}{6014,23\Omega} \right)}{\frac{1}{(4^\circ C + 273)k} - \frac{1}{(37^\circ C + 273)k}} = 3882,49 K \quad (6.6)$$

Obtenemos que la constante B del termistor NTC es de 3882,49 K. Así, la ecuación que relaciona la resistencia del termistor con la temperatura queda de la siguiente manera:

$$R_t = 3279,78 \cdot e^{3882,49 \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{273} \right)} \quad (6.7)$$

6.1.2. Integración del sensor en el biorreactor

El mecanizado del biorreactor se ha realizado mediante la fresadora Roland MDX-40 usando el software VCarve Pro. Desde el software se puede indicar a la fresadora las profundidades a fresar en cada zona de un dibujo 2D. Para poder insertar el sensor el primer paso fue hacer la piscina de salida de flujo del biorreactor más profunda. El termistor fue integrado en la piscina que hay en la salida de la cámara (Fig. 6.6) para no interferir en el flujo homogéneo que se había conseguido previamente.

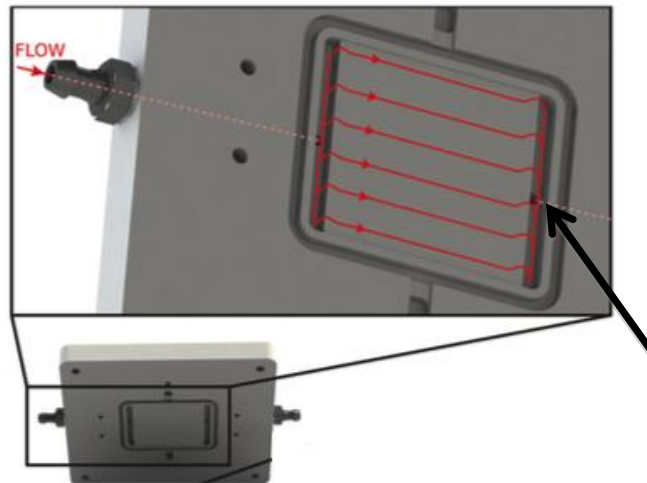


Figura 6.6. Parte superior de la cámara señalando situación del sensor.

La profundidad inicial de la piscina era de 2,5mm, con la ayuda del software VCarve Pro y la fresadora (Fig. 6.7) se ha modificado la profundidad de la piscina de salida, siendo ahora de 5 mm para que el sensor se pueda insertar dentro de la cámara y pueda estar en contacto completo con los fluidos que se perfunden en la cámara.

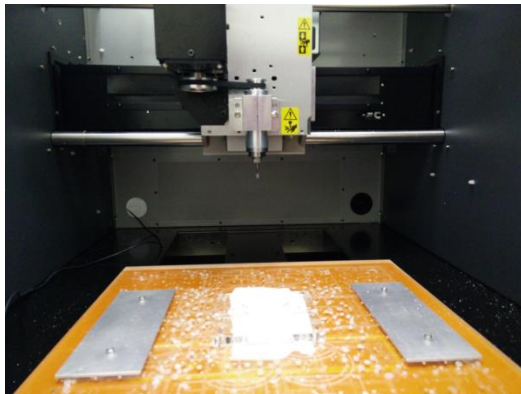


Figura 6.7. Parte inferior de la cámara en la fresadora.

Antes de insertar el termistor ha sido necesario desmontarlo (Figura 8.8a y 6.8b). El montaje que viene de fábrica es muy voluminoso, tiene una montura que complicaba la inserción de éste en la cámara. Por este motivo se ha separado, por un lado ha quedado el termistor con el cable (Figura 6.8b), por otro la aguja y por otro el cabezal, el cual ha sido desechado.



Figura 6.8a. *Termistor.*

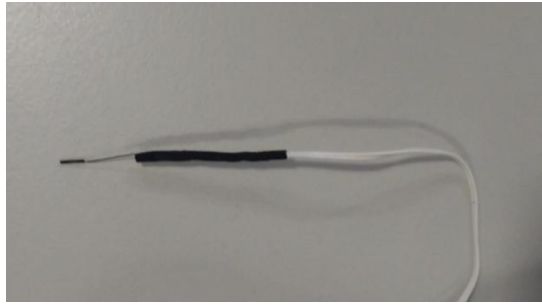


Figura 6.8b. *Termistor desmontado.*

Una vez desmontado el termistor, se hizo un agujero con una broca de 1,5 mm de diámetro en el lateral de la cámara a la altura de la piscina hasta llegar a la piscina que hay a la salida de la cámara del mismo diámetro que la aguja del termistor. Una vez realizado el agujero en primer lugar se ha insertado la aguja sola del sensor la cuál ha quedado sujeta a presión (Figura 6.9).

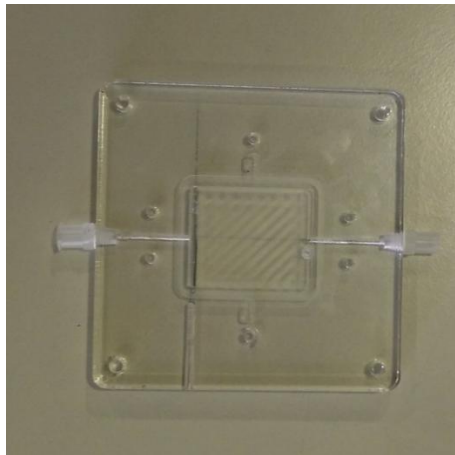


Figura 6.9. *Aguja en la parte superior de la cámara.*

Posteriormente, en el mismo agujero se ha vuelto a pasar la broca pero esta segunda vez con un diámetro de 2,5 mm para que pudiese pasar el cable del termistor hasta la aguja. A continuación se ha puesto el termistor dentro de la aguja a través del agujero que se ha ampliado (Figura 6.10).

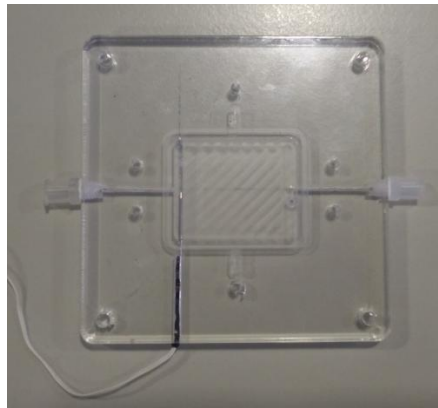


Figura 6.10. *Termistor integrado en la parte superior de la cámara.*

De este modo el termistor queda completamente dentro de la cámara y el sistema queda sujetado a presión y estanco.

6.2. Adquisición datos: Arduino

Existen una cantidad reseñable de proyectos que afrontan el reto de construir un sistema de monitorización de temperatura. Los proyectos existentes que miden la temperatura dependiendo del enfoque desde donde los miremos, los podemos clasificar de distintas maneras. La clasificación por la que hemos seleccionado el sistema la podríamos separar entre proyectos de código abierto y propietario. Existen varias comunidades, que desarrollan software de código abierto, orientadas a determinadas plataformas. Otras en cambio no publican su código. Pero no solo eso. Al tratarse de aparatos físicos, también los esquemas de alguna(s) parte(s) del hardware pueden hacerse públicas o no. Un claro ejemplo de hardware open-source es Arduino.

Arduino, además de simplificar el proceso de trabajar con microcontroladores, ofrece algunas ventajas respecto a otros sistemas:

- Sistema asequible, de bajo coste.
- El software de Arduino funciona en los sistemas operativos Windows, Macintosh OSX y Linux. La mayoría de los entornos para microcontroladores están limitados a Windows.
- El entorno de programación de Arduino es fácil de usar para principiantes y lo suficientemente flexible para los usuarios avanzados. Pensando en los profesores, Arduino está basado en el entorno de programación de Processing con lo que el estudiante que aprenda a programar en este entorno se sentirá familiarizado con el entorno de desarrollo Arduino.

- El software Arduino está publicado bajo una licencia libre y preparado para ser ampliado por programadores experimentados. El lenguaje puede ampliarse a través de librerías de C++, y si se está interesado en profundizar en los detalles técnicos, se puede dar el salto a la programación en el lenguaje AVR C en el que está basado. De igual modo se puede añadir directamente código en AVR C en tus programas si así lo deseas.

Para la implementación del diseño se ha optado por Arduino Due. Las especificaciones del Arduino Due son las siguientes:

Tabla 6.1. *Tabla de las especificaciones de Arduino Due (Arduino 2015a).*

Especificaciones	
Microcontrolador	AT91SAM3X8E
Voltaje de operación	3,3V
Voltaje de entrada (recomendado)	7-12V
Límites de voltaje	6-20V
Pines I/O	54 (12 con PWM)
Entradas analógicas	12 (12 bits)
Salidas analógicas	2 (DAC)
Salida máxima I/O	130 mA
Corriente máxima	800 mA
SRAM	96 KB (64 + 32 KB)
Memoria para programa	512 KB
Velocidad	84 MHz

Como hemos visto en el marco teórico, para que un sistema de adquisición de datos cumpla con nuestros objetivos tenemos que fijarnos principalmente en las siguientes características:

- Especificaciones de las entradas analógicas: Arduino Due cuenta con 12 entradas analógicas y un convertor analógico digital (ADC). A través de un multiplexor se consigue un multiplexado temporal que permite muestrear las 12 entradas analógicas con un único ADC.
- Número de canales: La placa Arduino posee 6 canales conectados a un convertor analógico de 12 bits.
- Velocidad máxima de muestreo: El convertor tarda aproximadamente 100 μ s (0,0001 s) en leer una entrada analógica por lo que se puede llevar

una tasa de lectura máxima aproximada de 10.000 lecturas por segundo. La velocidad resulta suficiente ya que el objetivo es obtener 1 muestra cada 2 segundos.

- Resolución de los datos: Arduino Due tiene un ADC de 12 bits de resolución. Esto significa que el número de cuentas será de 2^{12} (4096). Esto proporciona una resolución en la lectura de: $3,3 \text{ V} / 4096$, es decir, $0,0008 \text{ V}$ (0,8 mV).
- El bus de comunicación con la PC: Una vez configurado el Arduino, los datos se envían por la propia conexión USB, pero simulando un puerto serie, en este caso el puerto es `/dev/tty.usbmodem1411`.

6.2.1. Configuración Hardware Arduino

Una vez elegido el sensor, se preparó la placa Arduino. Para ello, se soldaron los componentes del esquema 4.26 en una placa de topes que posteriormente iría insertada en la placa Arduino. Un conector entre los pines de masa y entrada analógica A0 para facilitar la conexión del termistor, y una resistencia de $1,27 \text{ k}\Omega / 0,1 \%$ (R_1) entre los pines de +3,3 V y A0. El montaje final se puede ver en la figura 4.35.

Por otro lado se ha cambiado el conector del termistor para adecuarlo a la placa de arduino:

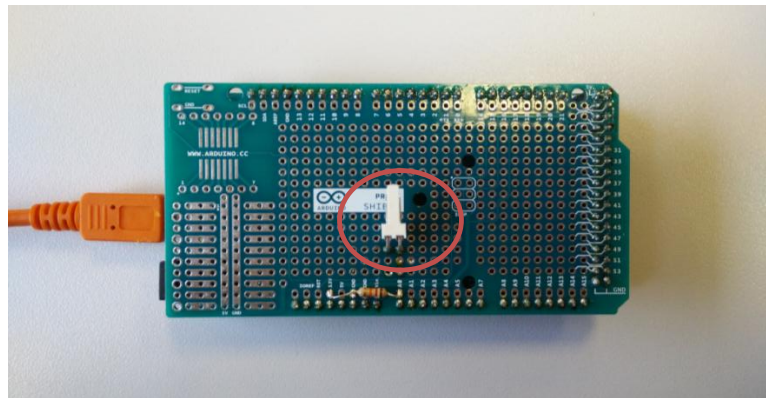


Figura 6.11. Conector para el sensor en la placa de Arduino.

6.2.2. Configuración Software Arduino

A continuación se programó el Arduino para muestrear A0 en intervalos de 10 s, procesar los datos para obtener la temperatura y enviar el resultado al PC. El procedimiento para adquirir los datos es el siguiente;

- Se leen las cuentas de la entrada analógica A0.
- Se realiza la media de las cuentas cada 5 valores para que no haya tanta fluctuación entre datos.
- Se convierte el valor de cuentas en voltaje.
- Mediante la ecuación del circuito calculamos la resistencia del termistor.
- Con la ecuación del termistor en función de la resistencia encontramos el valor de temperatura.

A continuación vemos el algoritmo del procedimiento seguido (Figura 6.39).

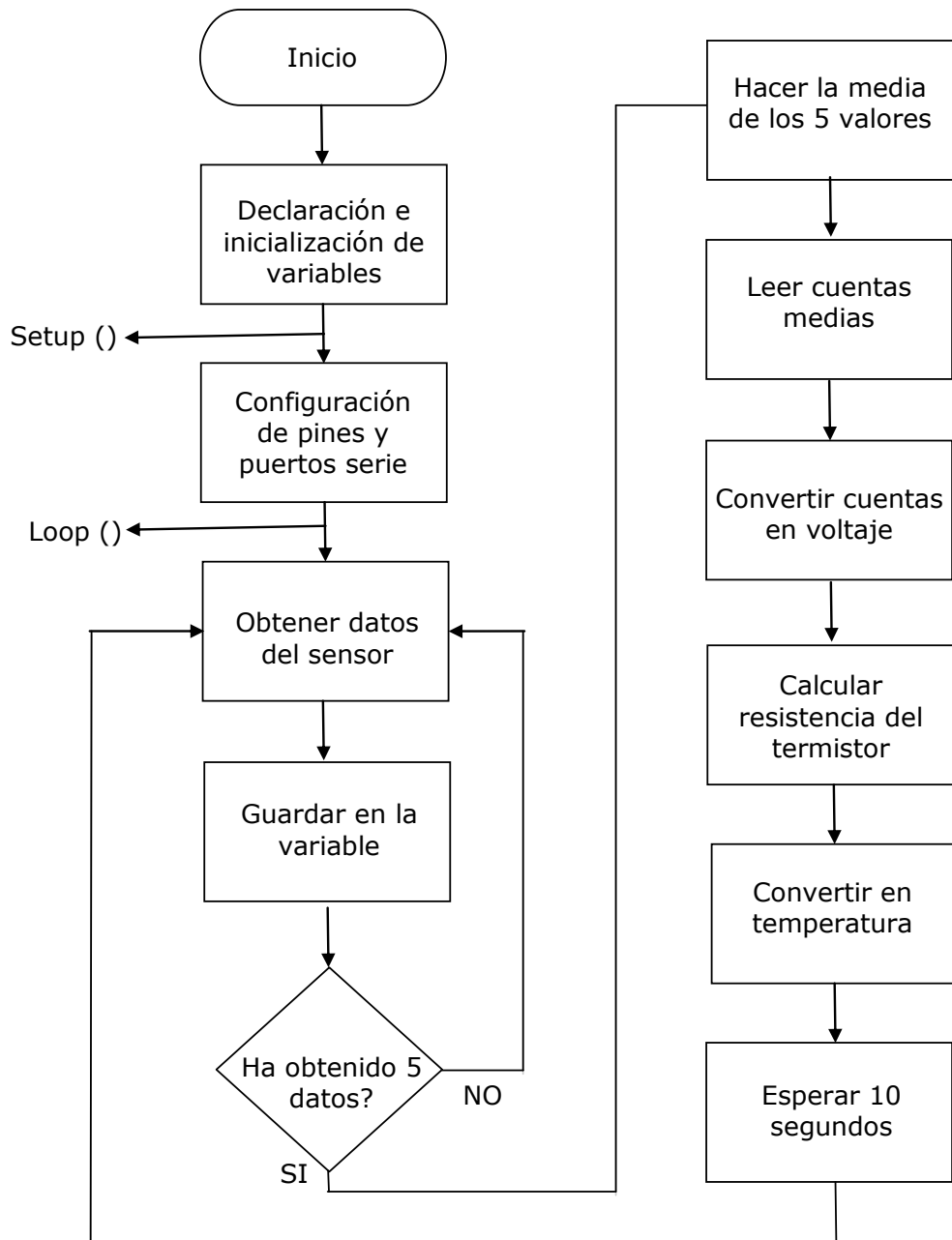


Figura 6.12. Algoritmo del programa de Arduino.

En el apartado 1 del Anexo se puede encontrar el programa completo.

6.3. Interfaz Usuario: Matlab GUI

Con el fin de desarrollar una plataforma que para el uso del sistema de cara al usuario sea cómodo y sencillo se ha optado por el uso de la interfaz Gráfica de Usuario (GUI) de Matlab. Se trata de una interfaz de usuario que utiliza un conjunto de imágenes y objetos gráficos para representar la información y acciones disponibles en la interfaz.

Como en GUI las acciones se realizan mediante la manipulación directa, el usuario no tiene que crear un script ni conocer los detalles de programación para poder hacer una adquisición de los datos, de esta manera puede ser usado por cualquier usuario sin necesidad de conocer el código.

6.3.1. Configuración Matlab GUI

Se ha hecho que el usuario pueda empezar la monitorización de la temperatura con tan solo un clic. También tienen la opción de guardar un documento Excel con los datos recogidos durante el experimento y resetearlo. Por último, un cajetín le permite al usuario introducir en nombre del puerto USB en el cual se conectará el Arduino.

Como resumen, en la interfaz han tenido que aparecer los siguientes objetos:

- Cajetín donde poner el nombre del puerto del cual queremos obtener los datos.
- Botón para empezar/acabar.
- Gráfica donde visualizamos la temperatura en °C en función del tiempo en horas.
- Cajetín donde poner el nombre que queremos guardar el experimento.
- Botón para guardar.
- Botón para resetear.

Para diseñar la interfaz se ha usado el editor donde hemos colocado los botones necesarios comentados anteriormente (Figura 6.13).

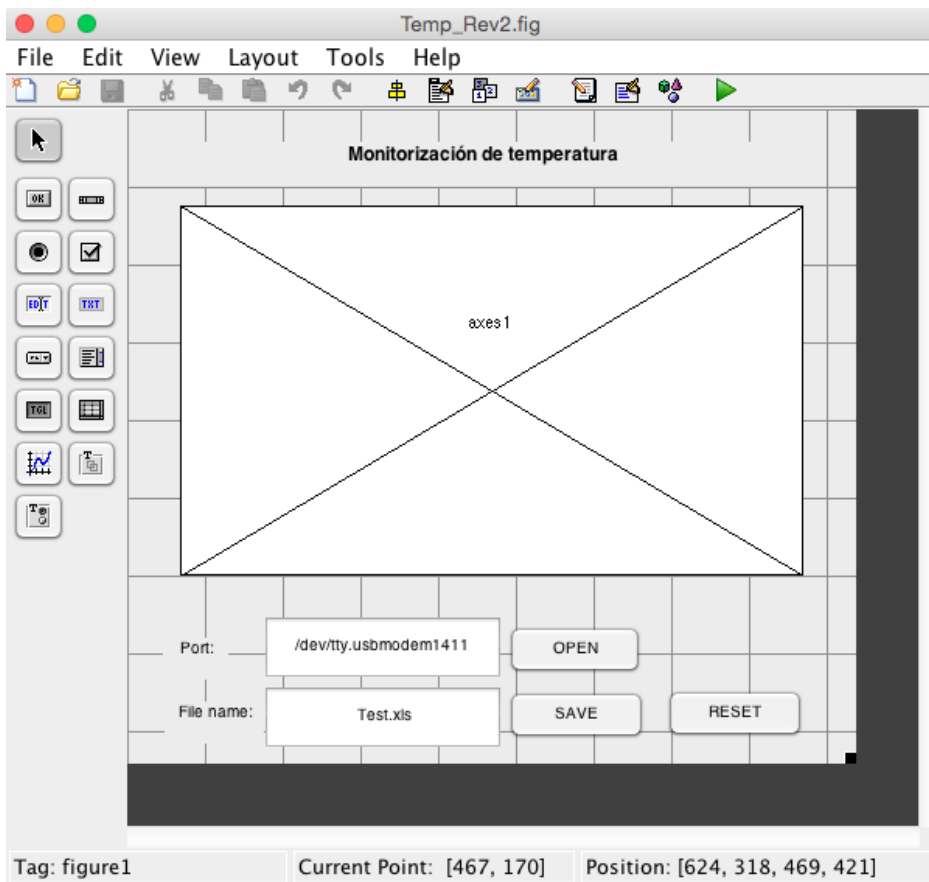


Figura 6.13. Editor Matlab GUI.

Si haces doble clic en los objetos se abre una ventana donde puedes seleccionar sus características; tamaño de letra, tipo de letra, tipo de botón, nombre del botón que se usará para escribir el programa, etc. A continuación se detallan las principales características que se han elegido para los objetos:

- Cajetín donde poner el nombre del puerto del cual queremos obtener los datos: Se trata de un *Edit Text*, para poder modificarlo según el puerto que queremos usar. En este caso se ha puesto como string que aparezca el puerto que hemos utilizado habitualmente aunque es modificable (Figura 6.14).

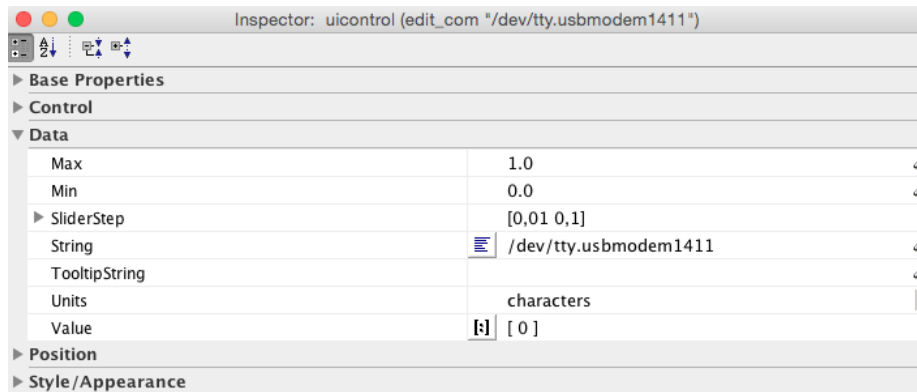


Figura 6.14. Características cajetín.

- Botón para empezar/acabar (OPEN/CLOSE): Se ha optado por un *pushbutton*. Posteriormente con la programación en matlab se ha hecho que este varíe su nombre de OPEN a CLOSE cada vez que se pulse. Y que al pulsarlo empiece o pare la adquisición de datos (*Figura 6.15*).

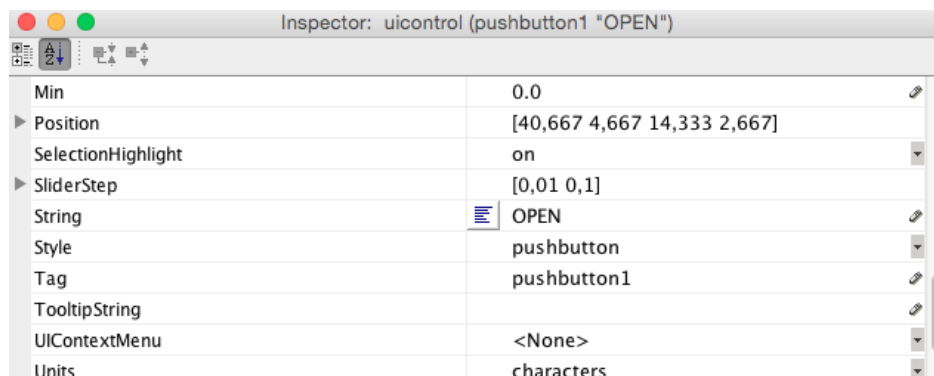


Figura 6.15. Características botón Open.

- Gráfica donde visualizamos la temperatura en °C en función del tiempo en horas: Se trata de un *Axes*.
- Cajetín donde poner el nombre que queremos guardar la experiencia: Se trata de un *Edit Text*, para poder modificarlo según el experimento que estemos realizando. Este nombre es con el que quedaran guardados los datos de la experiencia en la misma carpeta donde se encuentra el programa.
- Botón para guardar (SAVE): Se trata de un *pushbutton* que guardará los datos cada vez que se pulse (*Figura 6.16*).

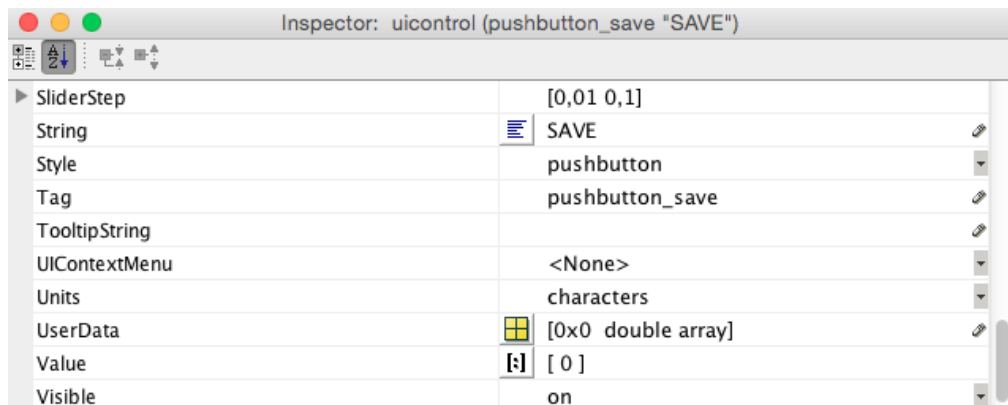


Figura 6.16. Características botón Save.

- Botón para resetear (RESET): Se trata de otro *pushbutton* que cada vez que se pulse pondrá las variables a cero (tiempo, temperaturas y gráfica) (Figura 6.17).

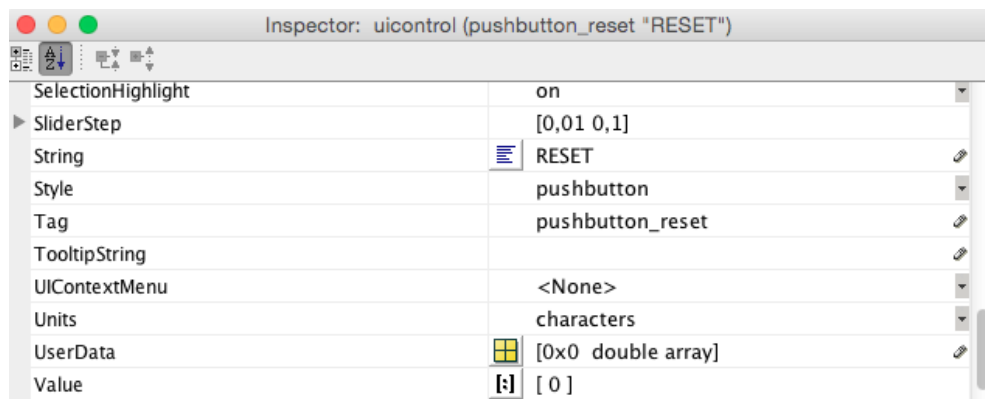


Figura 6.17. Características botón Reset.

Una vez diseñada la figura que visualizaremos se ha ejecutado y se ha creado una función donde se ha realizado la programación, para que cada botón cumpla con su objetivo. En el Anexo podemos encontrar la programación completa y todas las características de cada objeto.

A continuación podemos ver el resultado de las distintas capturas de pantalla uno de los experimentos, el cual nos sirvió para la validación del sistema. En primer lugar presionamos el Botón OPEN (Figura 6.18):

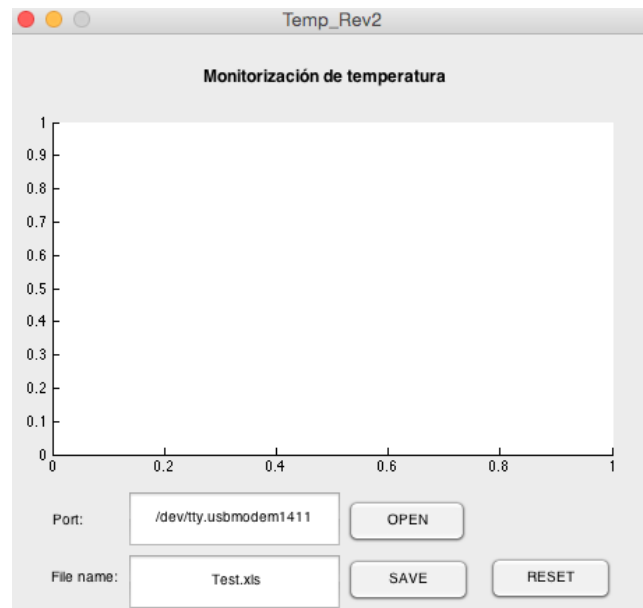


Figura 6.18. Resultado interfaz Matlab GUI.

Como vemos a continuación el botón *OPEN* ha pasado a llamarse *CLOSE*. Este lo pulsaremos en el momento que queramos finalizar el experimento. Aquí vemos los primeros datos tomados y observamos el cambio del botón a *CLOSE* (Figura 6.19):

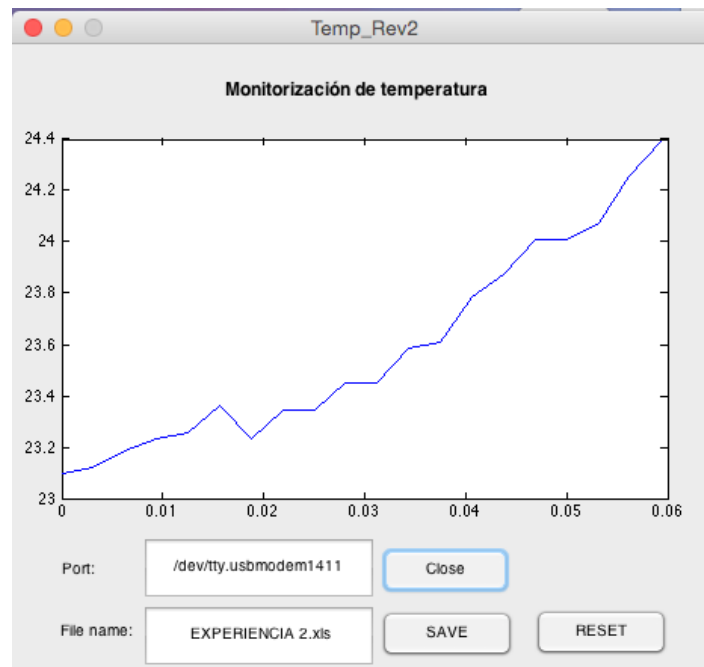


Figura 6.19. Interfaz con botón Close.

Una vez hemos realizado el experimento hacemos clic en *SAVE* para guardar el archivo con el nombre que hemos elegido en el cajetín *File name* , con los datos de temperatura obtenidos (Figura 6.20).

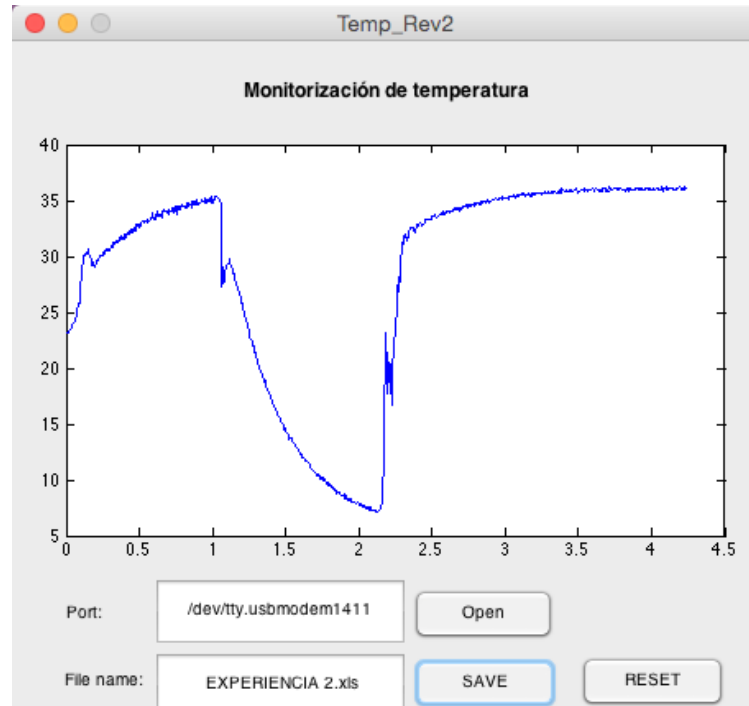


Figura 6.20. Interfaz con botón Save.

El programa se ha realizado de manera que se guarden los resultados en la misma carpeta donde está el programa. De este modo podemos observar como se nos crea al instante el archivo con los datos y con el nombre que hemos elegido (Figura 6.21):

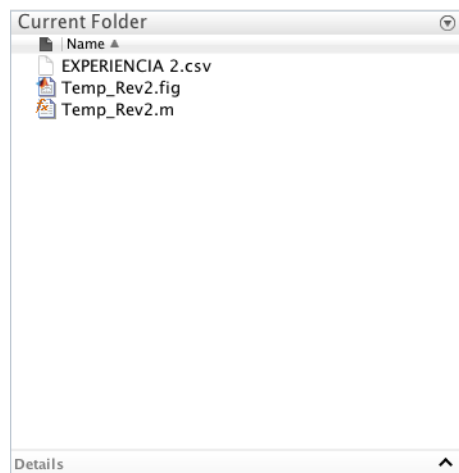


Figura 6.21. Experimento guardado en la carpeta que se encuentra el programa.

Finalmente podemos hacer clic en RESET para realizar un nuevo experimento y poner a cero todas la variables de tiempo, temperatura y gráfica (Figura 6.22).

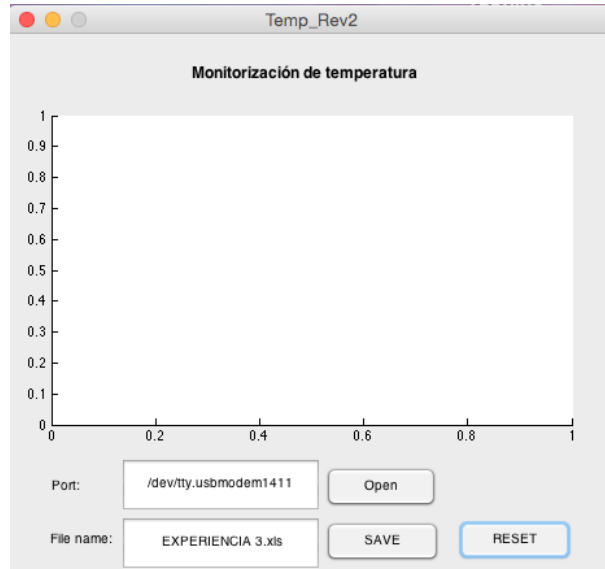


Figura 6.22. Resultado de apretar el botón Reset.

En el punto 2 del Anexo se puede encontrar el programa completo.

CAPÍTULO 7: DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE SIMULACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

En este capítulo se detalla el diseño realizado para la simulación de las condiciones de trasplante hepático. Después de hacer una búsqueda de información vemos que el éxito de un trasplante hepático depende de muchos factores. En este punto se describen posibles líneas de investigación en las que se podrían realizar hallazgos gracias al diseño realizado en el proyecto.

Posteriormente, para el diseño se han seguido los conceptos adquiridos en el apartado del marco teórico donde se detallaban tanto el procedimiento de trasplante hepático como las temperaturas por las que es sometido el hígado durante un trasplante hepático.

7.1. Diseño de la simulación de las condiciones de un trasplante hepático

7.1.1. Fases simuladas

Para el diseño del procedimiento de trasplante hepático se ha realizado una modificación del circuito de perfusión diseñado en el GAB previo a este proyecto. En la Figura 4.22 se puede encontrar el esquema del montaje realizado por el GAB.

Después de realizar el estudio del marco teórico acerca del procedimiento de trasplante hepático se ha visto la necesidad de modificar el circuito de manera que permita cambiar el líquido que se perfunde en la cámara. Para ello se ha optado por colocar una válvula de 3 vías a la entrada de la bomba que nos permite conmutar en los distintos medios:

- Reservoirio de medio de cultivo
- Reservoirio de líquido de preservación
- Reservoirio de PBS (solución salina)

Para la salida se ha optado por el uso de otra válvula de tres vías de manera que se puede conmutar entre los distintos reservoirios:

- Reservoirio de medio de cultivo: para que recircule.
- Reservoirio de desechos ('Waste'): para que vayan tanto el PBS que usamos para limpiar la cámara como el líquido de preservación cuando se saca después de la nevera.

Para realizar la simulación del trasplante hepático en la cámara de co-cultivos se ha simplificado el procedimiento detallado en el marco teórico en las siguientes etapas:

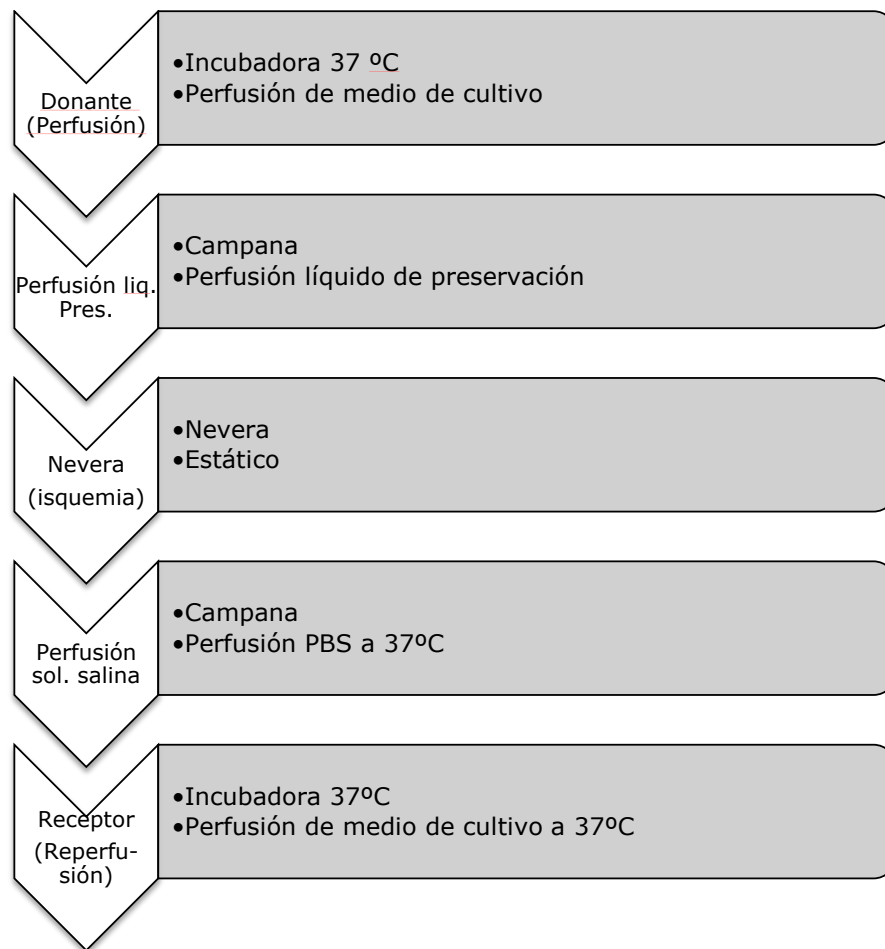


Figura 7.1. Esquema fases simuladas.

En esta nueva configuración realizada para la simulación del trasplante hepático el Biorreactor ha sido montado como se muestra en la Figura 7.2 y conectado con el sistema de perfusión usando conectores fluidicos. Los tubos utilizados para conectar todo el sistema son tubos de silicona, mediante ellos se realiza la recirculación de fluidos con una bomba peristáltica comercial (Minipuls 3, Gilson).

Después de hacer distintas pruebas del circuito con el sistema de monitorización de temperatura se observó que la temperatura en la cámara dentro de la incubadora no era la esperada, era inferior a la de la incubadora aún dejándola más de 10 horas dentro. Se llegó a la conclusión que el trozo de tubo que iba y salía de la bomba peristáltica provocaba que el medio se enfriase. Para resolver este problema se decidió añadir un serpentín de tubo a la entrada de la incubadora, de tal manera que la temperatura del medio se estabilizase antes de llegar al biorreactor. Después de esta mejora se comprobó que la temperatura sí que era la esperada.

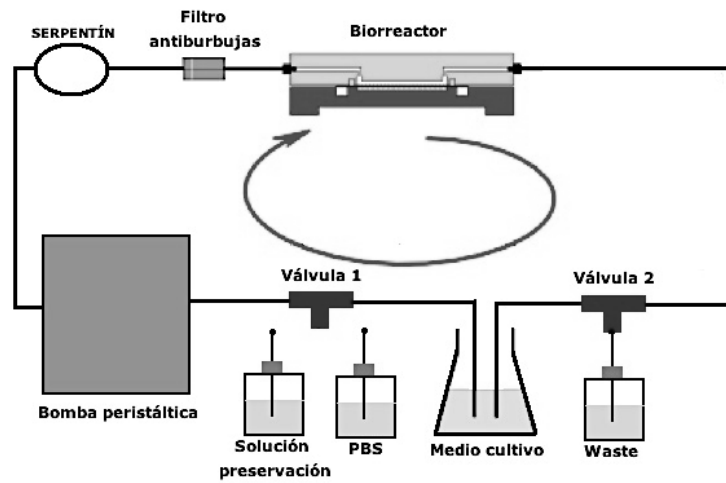


Figura 7.2. Esquema diseño sistema de simulación de trasplante hepático.

A continuación se detalla como se simula cada fase del trasplante en la que se simula la etapa de isquemia-reperfusión:

Hígado en el donante: El primer paso a simular son las condiciones del hígado en el donante. Para ello, la bomba inyecta el medio de cultivo desde un reservorio al biorreactor que se encuentra dentro de la incubadora a 37°C (Figura 7.3).

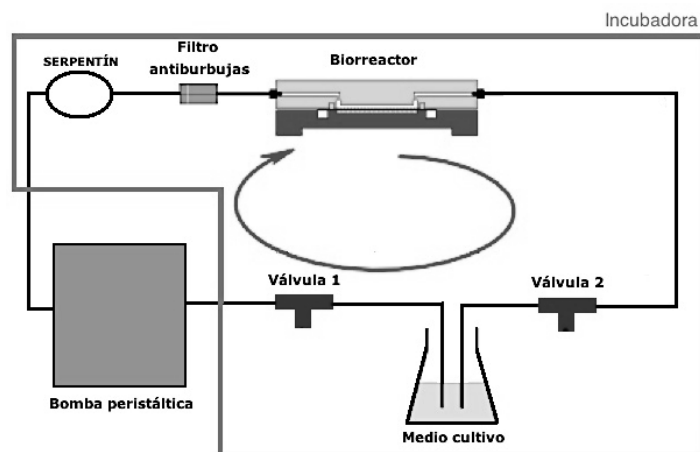


Figura 7.3. Simulación hígado funcionando dentro del paciente.

Perfusión del líquido de preservación: Pasadas mínimo 12 horas, empieza la simulación del trasplante. Para ello, mediante una válvula cambiamos el medio de perfusión que estaba circulando (medio de cultivo) para pasar a la perfusión

del líquido de preservación (Figura 7.4). Este procedimiento se realiza dentro de la campana, se perfunde el líquido hasta que ha pasado por todo el Biorreactor.

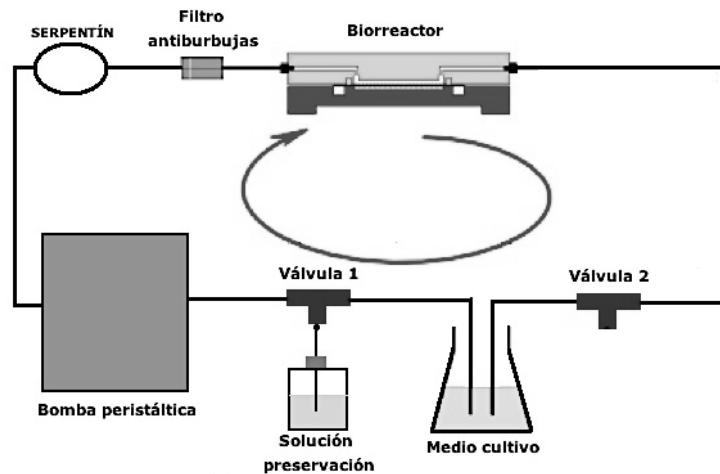


Figura 7.4. Simulación perfusión del líquido de preservación helado en el hígado.

Órgano en la nevera: Una vez ha recorrido el líquido de preservación por todo el Biorreactor gracias a la bomba peristáltica, se cierra con un tapón tanto la entrada del biorreactor como la salida, dejando a la entrada de la cámara el filtro atrapaburbujas (Figura 7.5) para evitar futuras burbujas al volver a conectar el sistema de perfusión. De este modo simularemos la isquemia fría que sufre el hígado durante el transporte. Una vez provocada la isquemia se mantendrá el Biorreactor (con los tapones) en la nevera (4 °C) por un tiempo que dependerá del experimento que se quiere realizar, en los experimentales llevados a cabo para validar el sistema este tiempo ha sido de 1 h.

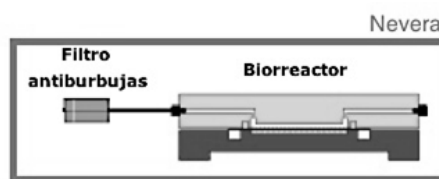


Figura 7.5. Simulación hígado en la nevera.

Perfusión solución salina (PBS): Según el experimento que se desee realizar el Biorreactor se dejará un tiempo u otro en el refrigerador, al sacarlo lo pondremos dentro de la campana. Allí se sacan los tapones y mediante el mismo sistema, con la bomba, se hace la perfusión de PBS caliente (a 37°C) hasta que haya pasado por toda la cámara. Así simularemos el lavado que realizan al hígado previo a la inserción de éste en el receptor, de manera que el hígado queda libre de líquido de preservación (Figura 7.6).

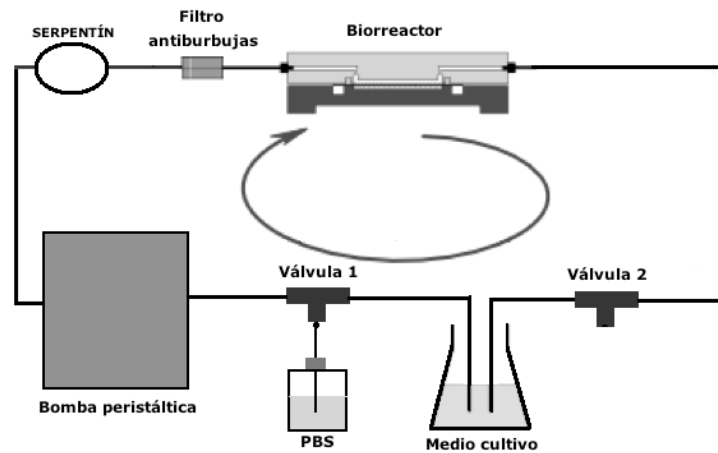


Figura 7.6. Simulación perfusión del suero a 37°C en el hígado.

Hígado en el receptor: Mediante las válvulas podemos empezar a hacer la reperfusión del medio de cultivo igual que se realiza en el primer paso, pero en este caso estaríamos simulando las condiciones del hígado dentro del receptor (Figura 7.7). De este modo el cultivo celular habrá sido sometido a todos los cambios de temperatura que sufre el hígado a lo largo de un trasplante y por tanto se podrán analizar las células después del proceso.

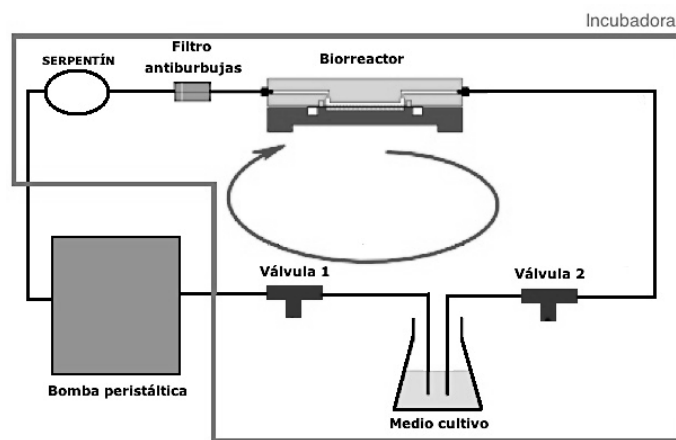


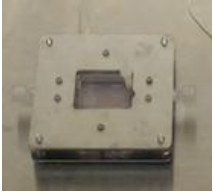





Figura 7.7. Simulación hígado dentro del receptor.





Durante la privación del flujo en el Biorreactor simulamos la isquemia y luego con el restablecimiento del mismo (reperfusión) se provoca el daño que se denomina lesión por isquemia-reperfusión.

7.1.2. Material para la simulación

Para el sistema diseñado el material necesario es el siguiente:

Tabla 7.1. Material para simular el procedimiento de trasplante hepático (Figuras tomadas en el laboratorio donde se ha realizado el estudio)

Cantidad	Material	Imagen
1 ud	Biorreactor	
1 ud	Bomba peristáltica	
1 ud	Tubo bomba peristáltica	
6 m	Tubo silicona 3,2 mm de diámetro	
2 ud	Válvulas de 3 vías	
4	Tapones	

1	Filtro `antiburbujas`	
4	2 reservorios con 1 agujero en el tapón 2 reservorios con 2 agujeros en el tapón	
1	Incubadora (37 °C, 5% CO ₂)	
1	Nevera (4 °C)	

7.1.3. Cálculo caudal

Las células endoteliales hepáticas dentro del hígado se encuentran sometidas a una tensión de cizallamiento "shear stress" provocada por la perfusión del flujo sanguíneo. En numerosos estudios *in vitro* se ha demostrado que un valor óptimo de tensión de cizallamiento influye positivamente en la diferenciación celular. En este estudio el valor de tensión de cizallamiento al que las células han sido sometidas ha sido de 3 dyn/cm² (Illa et al. 2014).

Para someter las células endoteliales a una tensión de cizallamiento determinada se ha ajustado el caudal del medio de cultivo teniendo en cuenta la fórmula de la tensión de cizallamiento para la perfusión en una cámara de flujo de placas paralelas:

$$\tau = \frac{6 \cdot \mu \cdot Q}{w \cdot h^2} \quad (7.8)$$

siendo:

τ = Tensión de cizallamiento

μ = Viscosidad del medio

Q = Caudal

w = ancho cámara

h = altura cámara

La tensión de cizallamiento para obtener la estimulación óptima que requieren las células endoteliales para permanecer sanas ha sido buscada en distintos estudios. Finalmente se ha llegado a la conclusión que la tensión de cizallamiento óptima para las células endoteliales es de 3 dyn/cm² (Illa et al. 2014). Por tanto este ha sido el valor de tensión de cizallamiento que se ha utilizado para calcular el caudal necesario.

Conociendo la viscosidad del medio de cultivo, las dimensiones de la cámara y la tensión de cizallamiento necesaria para estimular las células endoteliales, podemos encontrar el caudal necesario:

$$Q = \frac{\tau \cdot h^2 \cdot w}{6 \cdot \mu} \quad (7.9)$$

Conociendo las medidas de la cámara y la viscosidad;

$$\mu_{\text{medio cultivo}} = 7,8 \cdot 10^{-3} \text{ dyn} \cdot \text{s} / \text{cm}^2$$

$$w = 2,6214 \text{ cm}$$

$$h = 0,04 \text{ cm}$$

tenemos que el caudal para someter las células a una tensión de cizallamiento de 3 dyn/cm² en nuestro biorreactor es de

$$Q = \frac{\frac{3 \text{ dyn}}{\text{cm}^2} \cdot (0,04 \text{ m})^2 \cdot 2,6214 \text{ m}}{6 \cdot 7,8 \cdot 10^{-3} \text{ dyn} \cdot \text{s} / \text{cm}^2} \quad (10)$$

$$Q = \frac{0,2687 \text{ cm}^3}{\text{s}} = \mathbf{15,8 \text{ ml/min}}$$

7.1.4. Calibración bomba peristáltica

Para poder aplicar los caudales calculados ha sido necesario hacer la calibración de la bomba peristáltica utilizada, para así poder conocer la relación entre las revoluciones por minuto que marca el display de la bomba peristáltica con los caudales que hemos calculado.



Figura 7.8. Montaje calibración bomba peristáltica.

En la figura 7.57 se muestra la curva de calibración obtenida.

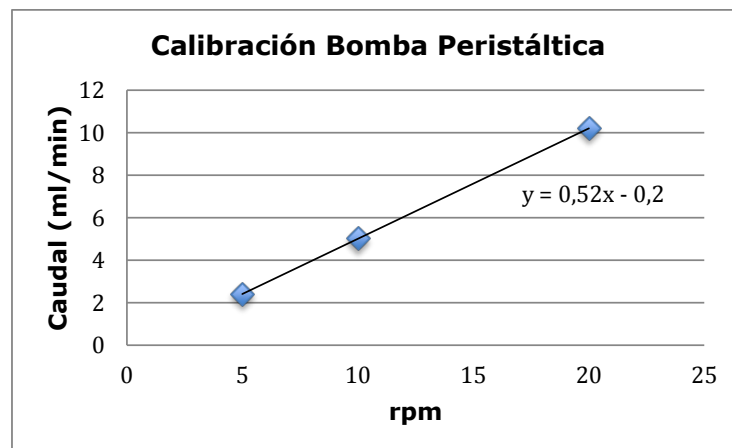


Figura 7.9. Gráfico de datos tomados para la calibración de la bomba.

A partir de la ecuación de la recta encontrada podemos ver las revoluciones por minuto aplicadas, según el caudal calculado en el apartado anterior.

$$Q = 15,8 \text{ ml/min} \rightarrow Q = 30 \text{ rpm}$$

CAPÍTULO 8: PARTE EXPERIMENTAL

Se han realizado 3 experimentos completos con células hepáticas para validar los dos sistemas diseñados; tanto la simulación de la isquemia-reperfusión (trasplante hepático) como la monitorización de temperatura. Se detallan los 3 experimentos; el objetivo, el material, el procedimiento y los resultados. Todos los experimentos se han desarrollado en el Laboratorio de Hemodinámica Hepática Barcelona (IDIBAPS/CIBER-EHD).

Antes de la simulación del trasplante ha sido necesario preparar los cultivos celulares en las distintas partes de la cámara. En la membrana se han cultivado células endoteliales, concretamente células HUVEC. Las células HUVEC son células endoteliales que provienen del cordón umbilical humano. En la parte inferior de la cámara se han cultivado hepatocitos de rata, de la misma forma que se realizaba en el GAB anteriormente para simular el sinusoides hepático.

8.1. Experimentos: Simulación isquemia – reperfusión

Se han realizado tres experimentos con células donde se ha simulado un procedimiento de trasplante hepático completo. Cada uno de los 3 experimentos se ha realizado con 2 biorreactores a la vez.

Objetivo

El objetivo principal del experimento ha sido comparar los daños producidos por la isquemia y los daños producidos por la isquemia-reperfusión en la cámara después de la simulación de la fase de isquemia – perfusión que se produce durante un trasplante hepático para validar los dos diseños.

Material

- 2 Biorreactores
- 2 Bombas peristálticas
- 4 Válvulas de 3 vías
- 8 Tapones
- 1 Filtros antiburbujas
- 8 Reservorios
- Tubos de silicona
- 1 Incubadora (37 °C)
- 1 Nevera (5,5 °C)
- Células:
 - HUVEC (endoteliales)
 - Hepatocitos de rata
- 30 mL Líquido de preservación
- 60 mL Suero (PBS)
- 60 mL Medio de Cultivo

Procedimiento

Hasta el paso 6 se realizan los mismos pasos en los dos biorreactores. A partir del 7 hay que seguir un procedimiento distinto en cada uno de ellos.

1. Esterilizar todo el material exceptuando la cámara.
Autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después calefactor para secar el material (autoclave húmeda).
2. Esterilizar la cámara en la campana con ultravioleta (Figura 8.1).

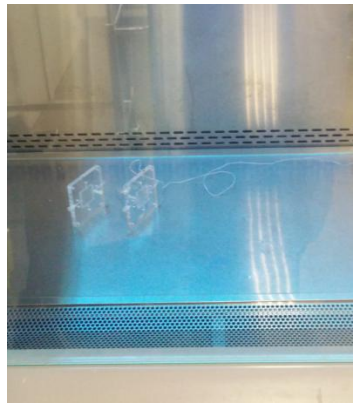


Figura 8.1. Esterilización cámara en la campana (ultravioleta).

3. Montaje de la cámara.

- a) Sacamos de la incubadora la membrana con las células HUVEC cultivadas y la parte inferior de la cámara con los hepatocitos después de 24 horas.
- b) Aspiramos el medio de cultivo de la membrana y de la parte inferior de la cámara.
- c) Lo lavamos con PBS y aspiramos el PBS.
- d) Ponemos 1 mL de medio de cultivo sobre los hepatocitos que se encuentran en la parte inferior de la cámara.
- e) Colocamos la membrana encima de los hepatocitos de modo que queden las células endoteliales (HUVEC) arriba.
- f) Ponemos 1 mL de medio de cultivo en la membrana (Figura 8.2).

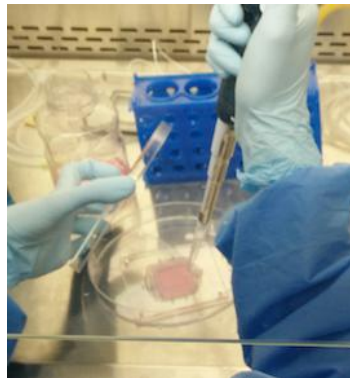


Figura 8.2. Medio de cultivo en la membrana.

- g) Encajamos la parte superior de la cámara con la membrana y ponemos todos los tornillos (Figura 8.3).

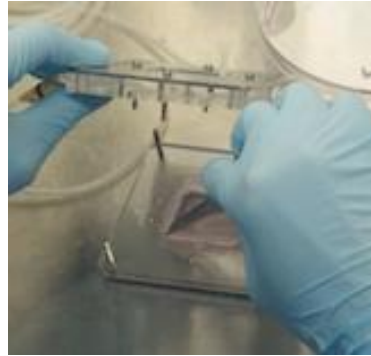


Figura 8.3. Colocación de la membrana.

- h) Si ha quedado alguna burbuja dentro de la cámara se mueve el tornillo que hay en el centro de la cámara hasta que no quede ninguna (Figura 8.4).

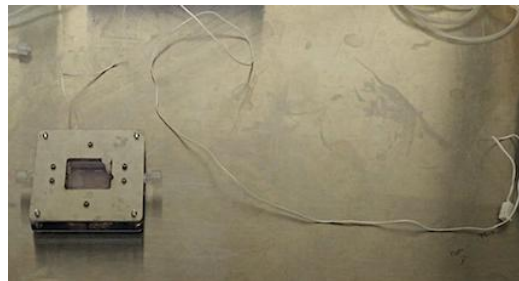


Figura 8.4. Cámara con el sensor montada.

4. Realizar el montaje completo inicial dentro de la campana, para no contaminar:

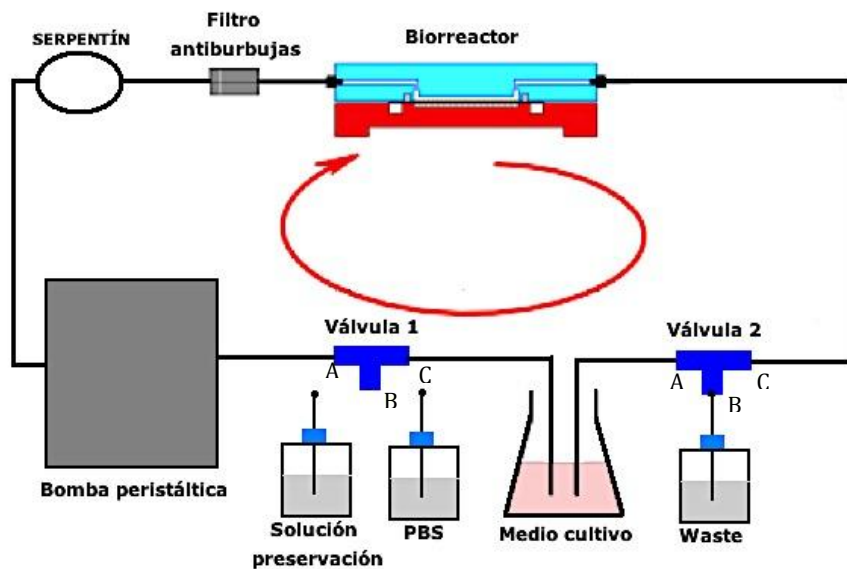


Figura 8.5. Esquema montaje inicial.

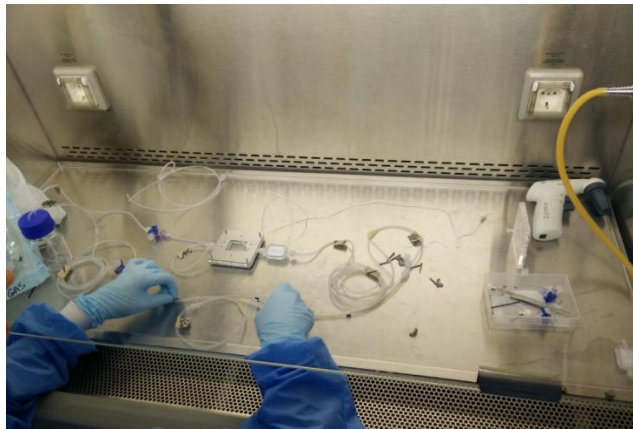


Figura 8.6. Realización del montaje inicial real en la campana.

5. Llenamos un reservorio con medio de cultivo (Figura 8.7), otro con PBS y otro con líquido de preservación.

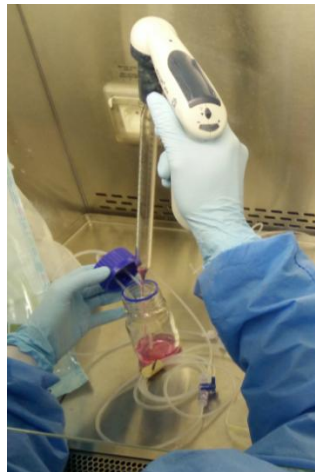


Figura 8.7. Inserción del medio de cultivo en el reservorio.

6. Biorreactor estático en incubadora con medio de cultivo estático.
 - a) Meter el biorreactor en la incubadora durante 1 hora.
7. Perfusión del líquido de preservación.
 - a) Sacamos cámara de la incubadora y ponemos todo el montaje en la campana exceptuando la bomba peristáltica.
 - b) Ponemos el líquido de preservación en un reservorio.
 - c) Ponemos el líquido de preservación conectado a la puerta B de la válvula 1.
 - d) Cerramos puerta C de la válvula 1.
 - e) Cerramos puerta A de la válvula 2.

f) Una vez ha llegado el líquido de preservación por toda la cámara apagamos la bomba y ponemos tapones a la entrada del filtro antiburbujas y otro a la salida de la cámara.

8. Sistema en el refrigerador (isquemia).

a) Metemos el sistema en el refrigerador a 5°C durante 1 h (Figura 8.8).



Figura 8.8. Cámaras en el refrigerador.

9. Lavado del líquido de preservación con solución PBS a 37°C.

a) Sacamos el sistema del refrigerador y lo dejamos en la campana.

b) Conectamos el Biorreactor al sistema de tubos como en el montaje inicial.

c) Ponemos el PBS conectado a la puerta B de la válvula 1.

d) Cerramos la puerta C de la válvula 1.

e) Cerramos la puerta A de la válvula 2.

f) Volvemos a encender la bomba a la misma velocidad hasta que el PBS haya sacado todo el líquido de preservación.

10. Biorreactor 1: Cortamos paso de PBS para la perfusión del medio de cultivo, para simular la reperfusión.

- Apagamos la bomba.

- Cerramos la puerta B de la válvula 1.

- Cerramos la puerta B de la válvula 2.

- Metemos el sistema en la incubadora.

- Encendemos la bomba a la misma velocidad que en los pasos previos.

- Dejamos el sistema en la incubadora con la perfusión del medio de cultivo durante 2 h.

Biorreactor 2: Cortamos el paso de PBS, para la perfusión del medio de cultivo hasta limpiar el PBS y se deja en estático.

a) Apagamos la bomba.

b) Cerramos la puerta B de la válvula 1.

c) Cerramos la puerta B de la válvula 2.

- Encendemos la bomba a la misma velocidad hasta que no quede PBS dentro de la cámara.

- Apagamos la bomba.

- Ponemos un tapón en la entrada de la cámara y un tapón en la salida de la cámara.
- Metemos el sistema en la incubadora.
- Dejamos el sistema en la incubadora con el medio de cultivo estático durante 2 h (Figura 8.9).

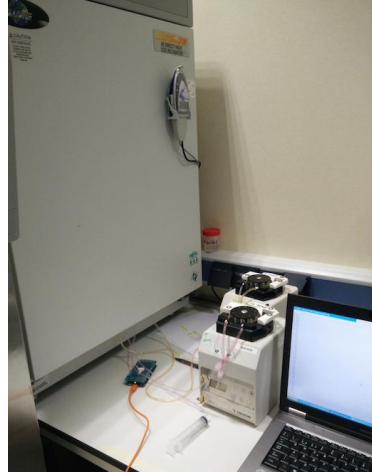


Figura 8.9. *Las dos bombas peristálticas, la incubadora y el sistema de monitorización de temperatura.*

11. Se desmonta la cámara en la campana y se analizan las células de la membrana y de la parte inferior de la cámara por separado (Figura 8.10).

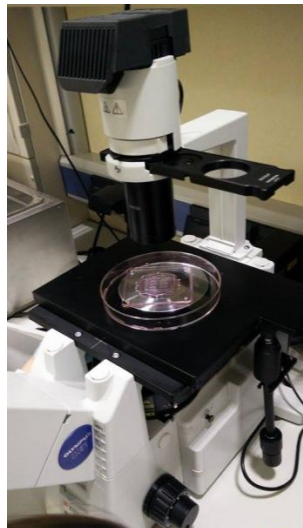


Figura 8.10. *Parte inferior de la cámara en el microscopio.*

8.1.1. Experimento 1

Durante la realización de este primer experimento no estaba finalizada la interfaz gráfica de Matlab pero sí la integración del sensor, y el montaje de Hardware por lo que los datos se obtuvieron por la consola de Arduino con el programa diseñado y luego se graficaron con Excel. El objetivo de este primer experimento fue validar la integración del sensor y la programación y hardware de Arduino.

Este experimento ha sido desarrollado con dos biorreactores, cada uno sometido a condiciones distintas pero con los mismos cultivos. Respecto a la temperatura, los pasos seguidos fueron los mismos en los dos biorreactores, por este motivo sólo se adquirieron los datos de temperatura de uno de ellos.

En las figuras 8.11a y 8.11b podemos observar dos diagramas de bloques donde se representan los 5 pasos a los que se sometieron cada uno de los biorreactores. Como se puede observar, el Biorreactor 1 se sometió a todos los pasos de los que consta un procedimiento de trasplante hepático estándar; desde el momento que es extraído del donante hasta que es implantado en el receptor. Por tanto, en este caso se deben observar los daños por isquemia-reperfundición producidos en la cámara.

Sin embargo, en el segundo Biorreactor no se le aplicó flujo después de someterlo a las bajas temperaturas, de este modo podremos diferir entre los daños que se producen en la fase de isquemia (Biorreactor 2, Figura 8.11b) respecto a los daños que se producen por la isquemia i la reperfundición (Biorreactor 1, Figura 8.11a).

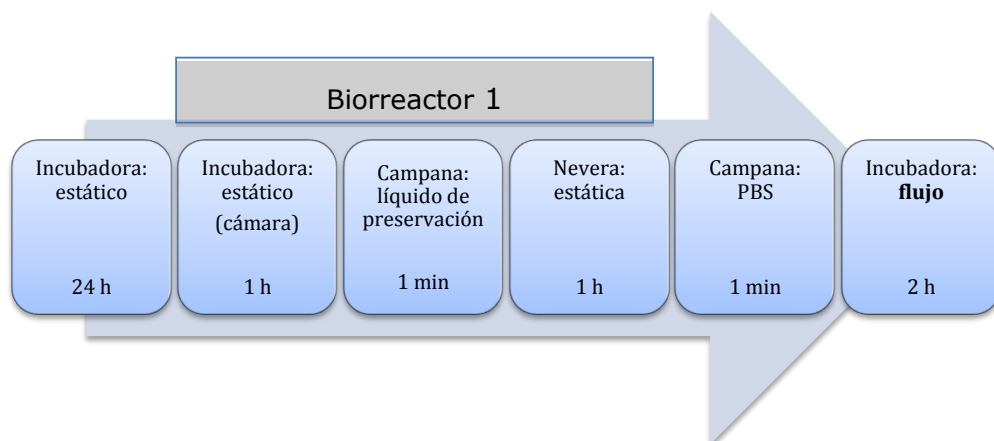


Figura 8.11a. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 1. Experimento 1.

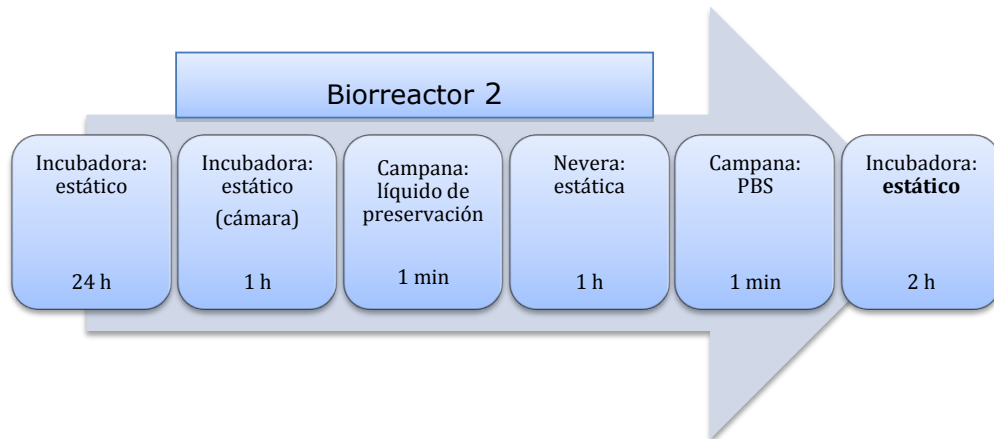


Figura 8.11b. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 2. Experimento 1.

Por otro lado, se realizaron distintos controles a parte del experimento. A continuación vemos una lista de los distintos controles realizados:

- Células HUVEC en una placa P6 que fueron sometidas a las mismas temperaturas que las cámaras.
- Células HUVEC que estuvieron durante todo el experimento a 37°C en la incubadora.
- Hepatocitos en una placa P6 que fueron sometidos a las mismas temperaturas que las cámaras.

Resultados

En este primer experimento con células se pudo validar el montaje de Hardware y la adquisición de datos, se obtuvieron todos los datos a partir de Arduino correctamente. Estos se graficaron en Excel obteniendo la siguiente gráfica:

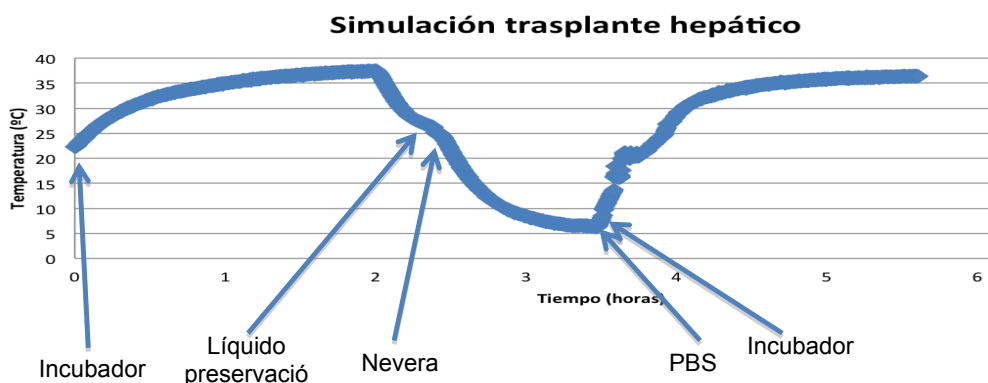


Figura 8.12. Gráfico temperaturas. Experimento 1.

Para el análisis celular del primer experimento se optó por realizar una prueba de viabilidad, ya que con la observación de las células con el microscopio no obteníamos suficiente información.

La técnica usada fue *Dual-Fluorescence Viability*. La acridina naranja (AO) y el yoduro de propidio (PI) son tintes de tinción nuclear celular. El AO es permeable tanto en las células vivas como en las muertas y genera fluorescencia verde. El PI entra en las células con membranas dañadas y en células muertas para generar fluorescencia roja. Las células teñidas tanto con AO como PI muestran fluorescencia verde mientras que las células muertas muestran fluorescencia roja.

A continuación vemos los resultados que se observaron tras realizar la prueba de viabilidad:

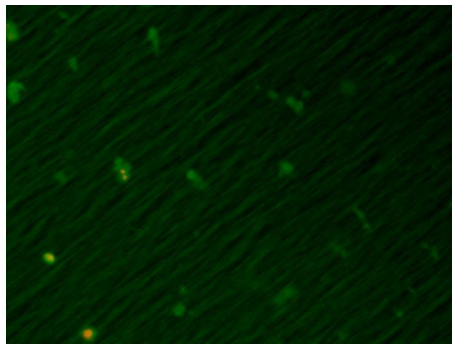


Figura 8.13 a. HUVEC con flujo final.

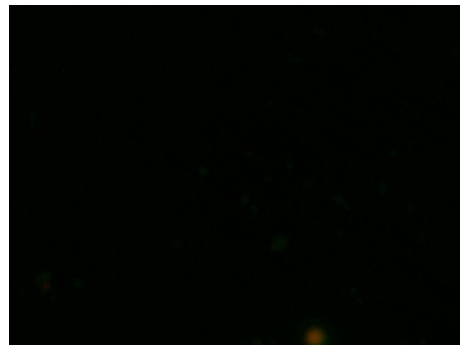


Figura 8.13b. HUVEC sin flujo final.

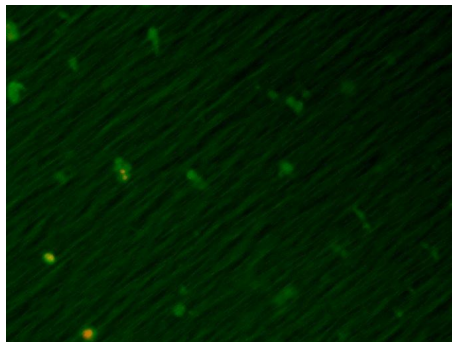


Figura 8.13c. Hepatocitos con flujo final.

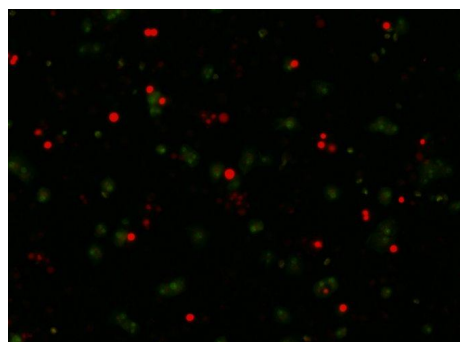


Figura 8.13d. Hepatocitos sin flujo final.

Como se puede observar en las figuras 8.13a, 8.13b, 8.13c y 8.13d vemos que las células han sobrevivido mucho mejor en las condiciones que se ha sometido al Biorreactor 1 (con flujo, Figura 8.13a y 8.13b) que las del Biorreactor 2 (en estático, Figura 8.13b y 8.13d).

A continuación podemos observar los resultados de los controles:

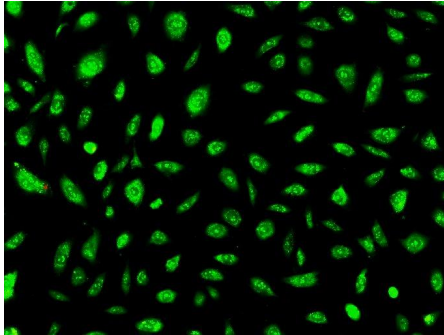


Figura 8.14a. Placa P6. HUVEC que han estado sometidos a frío.

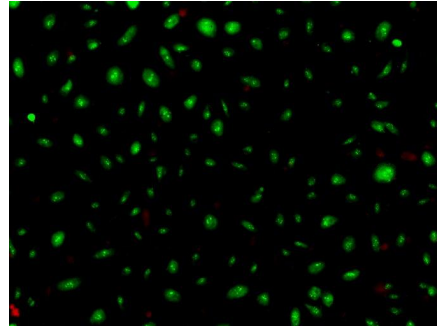


Figura 8.14b. Placa P6. HUVEC que no han estado sometidos a frío.

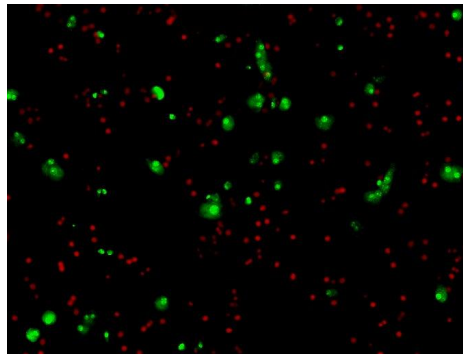


Figura 8.14c. Placa P6. Hepatocitos que no han estado sometidos a frío.

Podemos observar como presentaban plena viabilidad tanto los HUVEC que han estado sometidos a la hora de frío (Figura 6.14a) como las que no (Figura 6.14b). En cambio, de los hepatocitos que estuvieron en todo momento en la incubadora hay algunos muertos (Figura 6.14c).

8.1.2. Experimento 2

Durante la realización de este segundo ya estaba finalizada la interfaz gráfica de Matlab por lo que se pudo validar el sistema de monitorización de temperatura completo. Este experimento ha sido desarrollado con dos biorreactores, de la misma forma que en el experimento 1. La diferencia fue que en este caso se aplicó flujo en los dos biorreactores antes del tiempo de nevera.

En las figuras 8.15a y 8.15b podemos observar un esquema de los 5 pasos a los que se sometieron cada uno de los biorreactores.

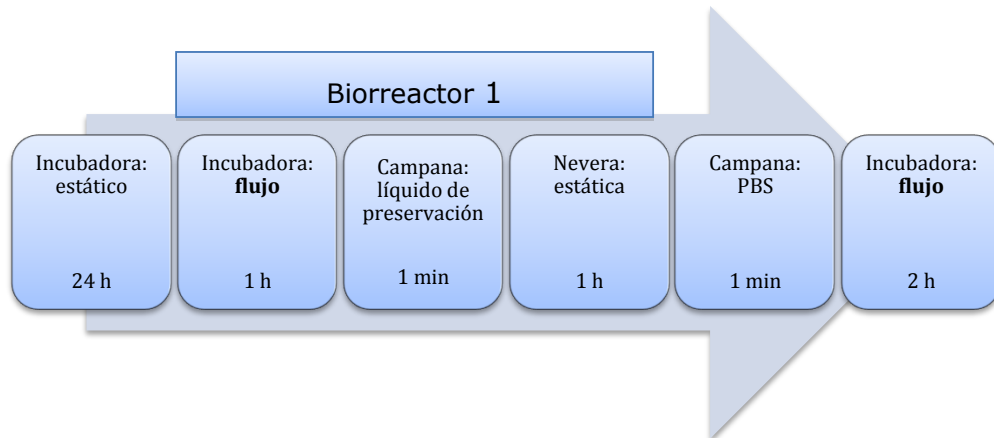


Figura 8.15 a. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 1. Experimento 2.

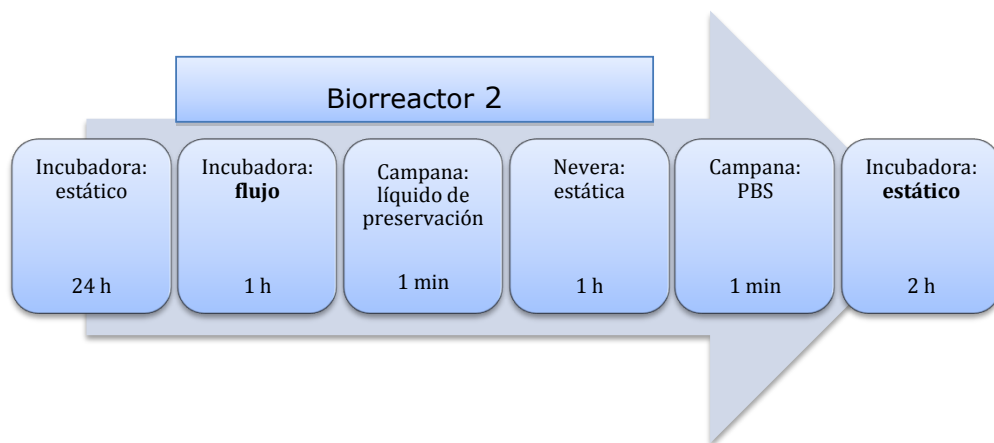


Figura 8.15b. Diagrama de bloques de los pasos sometidos al Biorreactor 2. Experimento 2.

Se han realizado distintos controles a parte del experimento:

- Placa P6 con hepatocitos que han sido sometidos a 1 hora de frío.
- Placa P6 con hepatocitos que no han sido sometidos a frío.
- Se realizó un tercer control con una cámara que se dejó estática todo el tiempo, sometida a las mismas condiciones de temperatura que la placa P6 que se sometió a una hora de frío.

Resultados

Con el segundo experimento se pudieron obtener los resultados con el sistema de monitorización de temperatura completo por lo que quedó validado el sistema (Figura 8.16).

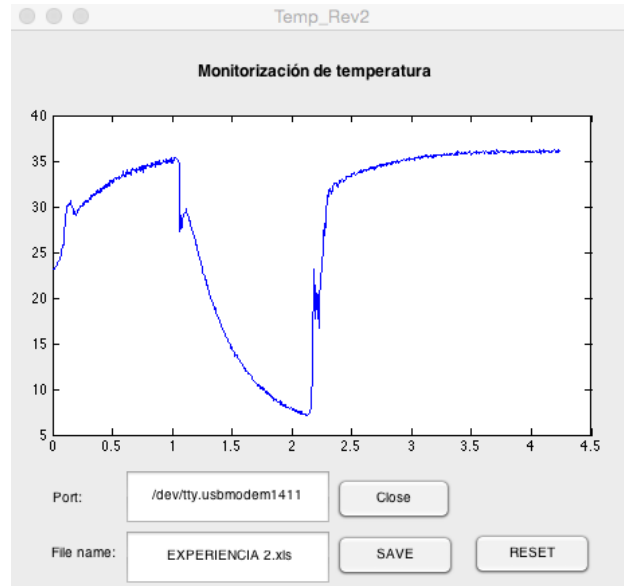


Figura 8.16. Monitorización de la temperatura durante el experimento 2.

En el caso del segundo experimento los resultados aún fueros más distintos entre la cámara con flujo y la cámara sin flujo. En este caso no se realizó la prueba de *Dual-Fluorescence Viability* ya que observando las células en el microscópico ya se podía observar por su morfología que la mayoría de las células que habían tenido flujo estaban vivas (Figura 8.17a) y las que estuvieron estáticas todo el tiempo estaban muertas (Figura 8.17b).

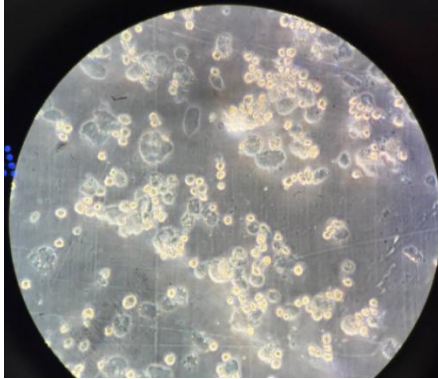


Figura 8.17a. *Cámara sometida a flujo al final.*

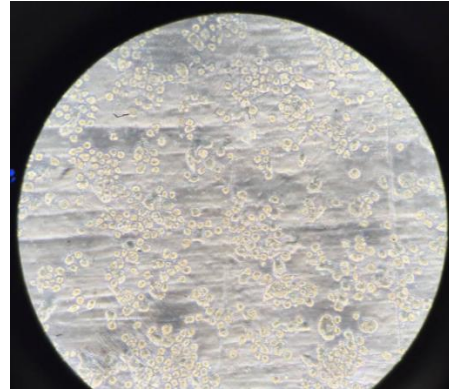


Figura 8.17b. *Cámara no sometida a flujo al final.*

Los hepatocitos de la cámara estática presentan una morfología mucho mas redondeada, lo que nos indica que están muertos (Figura 8.17b). En el caso de la cámara que ha estado sometida al flujo después de la nevera los hepatocitos presentan una morfología normal (Figura 8.17a), están vivos.

Paralelamente se realizaron las mismas pruebas en una placa P6. Se aplicó las mismas condiciones que la cámara (temperatura, líquido de preservación, PBS) en una y la otra se dejó todo el tiempo en la incubadora.

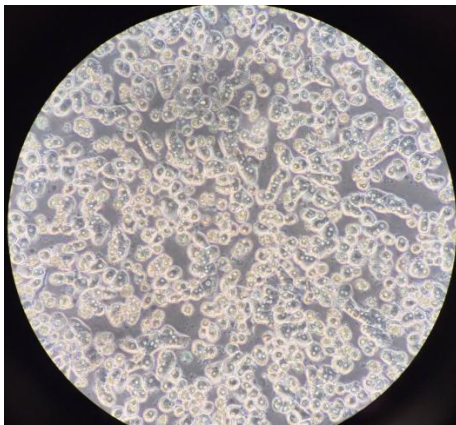


Figura 8.18 a. *Placa P6 que ha estado sometida a frío.*

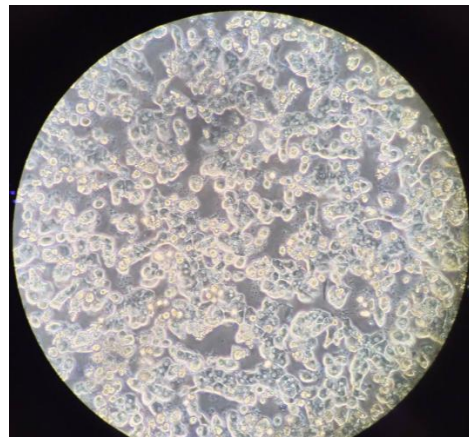


Figura 8.18b. *Placa P6 que no ha estado sometida a frío.*

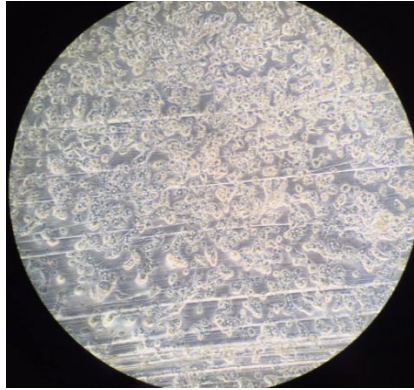


Figura 8.18c. *Cámara estática todo el tiempo.*

Vemos por la morfología que presentan los Hepatocitos están vivos la gran mayoría en los 3 controles (Figura 8.18a, 8.18b y 8.18c).

8.1.3. Experimento 3

El objetivo del tercer experimento ha sido el mismo; aplicar la isquemia reperusión en los hepatocitos. Se ha reproducido nuevamente el experimento 2. Con una diferencia; en este caso se ha dejado la cámara abierta cuando estaba estática para que pudiesen haber intercambio de gases con el exterior para comprobar que los hepatocitos la causa de muerte de los hepatocitos no fuese por el cierre hermético de la cámara.

A parte de los 2 dos biorreactores se realizaron los siguientes controles:

- Placa P6 con hepatocitos que ha estado sometida a 1 h de frío.
- Placa P6 con hepatocitos que han estado todo el tiempo en incubadora.

Resultados

Se pudo volver a validar el sistema de monitorización completo por segunda vez (Figura 8.19).

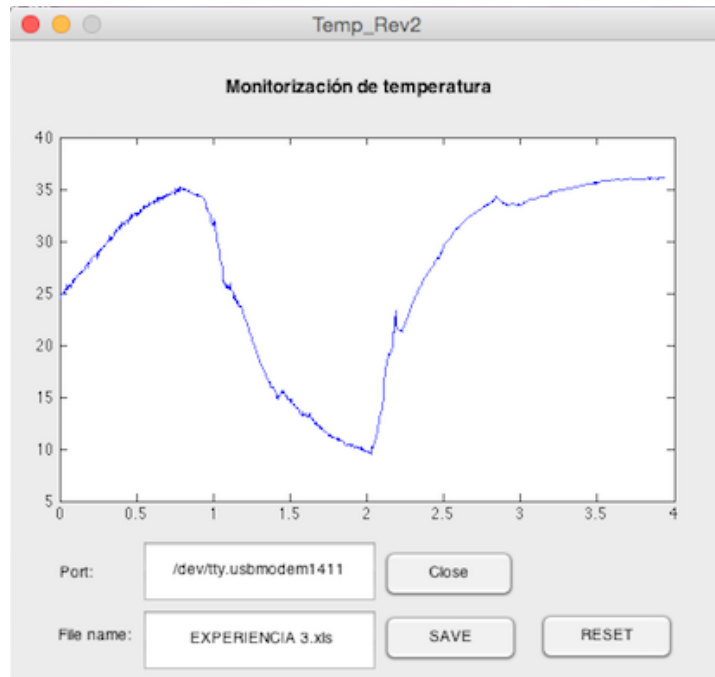


Figura 8.19. Monitorización de la temperatura durante el experimento 2.

A continuación vemos las imágenes obtenidas del microscopio:

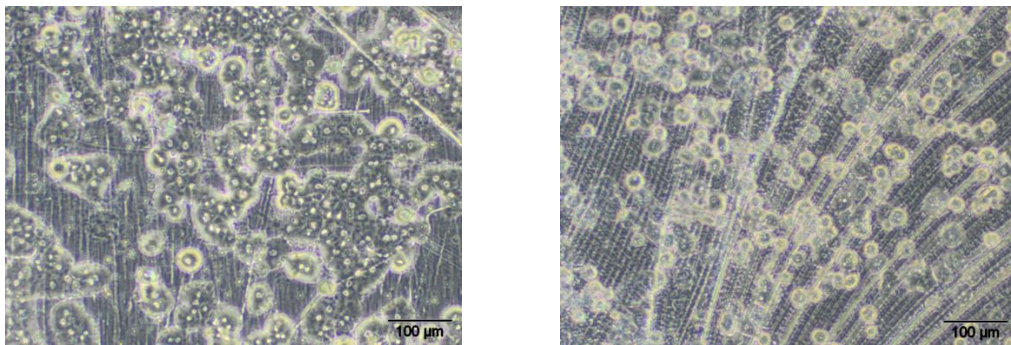


Figura 8.20a. Hepatocitos Biorreactor 1. **Figura 8.20b.** Hepatocitos Biorreactor 2.

Vemos como los hepatocitos del Biorreactor 1 (Figura 8.78a) presentan una morfología mucho mejor que los hepatocitos que no se les ha sometido a flujo después del tiempo de isquemia fría (Figura 8.78b).

Resultados de los controles fueron:

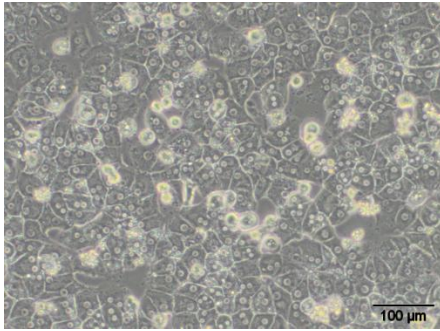


Figura 8.21a. *Placa P6 con Hepatocitos que no han estado sometidos a frío.*

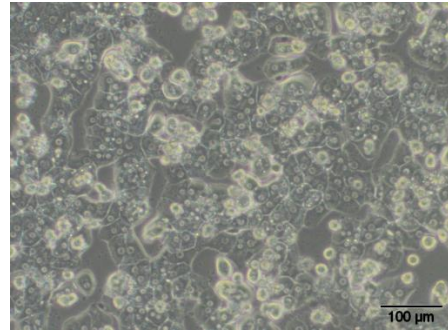


Figura 8.21b. *Placa P6 con Hepatocitos que han estado sometidos a frío.*

Tanto los hepatocitos de la placa P6 que han estado sometidos a frío (Figura 8.21a) como los que no (Figura 8.21b), presentan una morfología normal, lo que nos indica que están vivos.

Vemos como las células que se les ha aplicado flujo al final presentan una viabilidad mucho mas alta que las que no.

CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES

Una vez realizado e implementado el sistema de monitorización de temperatura, y la simulación de las condiciones de un trasplante hepático en una cámara de co-cultivos, se pueden extraer conclusiones del trabajo realizado.

Proyecto multidisciplinar, en el que se ha diseñado tanto un sistema de adquisición de datos como un sistema de fluídica para simular unas condiciones fisiológicas, todo ello con un fin en común, poder investigar acerca del trasplante hepático en un Liver on a Chip, y así prescindir de modelos animales, los cuales se usan actualmente para investigaciones en este campo. De este modo se han adquirido conceptos tanto biológicos como tecnológicos.

Se ha diseñado un sistema de monitorización de temperatura, de acuerdo con las características plateadas, con un margen de error menor o igual a $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente se ha realizado una interfaz gráfica de usuario para facilitar la adquisición de datos al usuario.

Se ha diseñado el sistema de simulación de un procedimiento de trasplante hepático y se un protocolo para su realización. Se ha hecho una búsqueda previa de información para poder simular todas las fases por las que pasa el hígado durante la isquemia-reperfusión, tanto las condiciones de temperatura como los fluidos que deben pasar por el Biorreactor. Se ha realizado un primer experimento en el que se han validado los dos sistemas citados anteriormente, y además se ha visto como las células sometidas a flujo (sometiendo a un *shear stress* a los cultivos) muestran una viabilidad mayor que las que no.

Finalmente se plantean posibles futuras líneas de investigación, para trabajar a partir de los sistemas diseñados e implementados en este proyecto. Todas estas

líneas de investigación (temperatura de preservación, comparativa entre líquidos de preservación, tolerancia del tiempo de isquemia, etc.) podrían ser muy útiles en el campo del trasplante hepático.

Posibles mejoras: El sistema de monitorización cumple con las características planteadas.

- Una posible mejora del sistema sería implementar un sistema de transferencia de datos inalámbrica.
- Mejora en la compatibilidad de los elementos necesarios para la realización de este tipo de procesos.
- Medida de otros parámetros que pueden estar implicados en los procesos planteados.

BIBLIOGRAFÍA

9.1. Referencias bibliográficas

aecc contra el cáncer. 2015. "Anatomía de Hígado." May 30. <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/CANCERDEHIGADO/Paginas/anatomia.aspx>.

Alépée, Natalie, Anthony Bahinski, Mardas Daneshian, Bart De Wever, Ellen Fritsche, Alan Goldberg, Jan Hansmann, et al. 2014. "State-of-the-Art of 3D Cultures (organs-on-a-Chip) in Safety Testing and Pathophysiology." *ALTEX* 31 (4): 441–77. doi:<http://dx.doi.org/10.14573/altex1406111>.

Arduino. 2015a. "Arduino Due."

Asociación de trasplantados de Asturias. 2015. "El Trasplante Hepático." http://donacion.organos.ua.es/submenu3/inf_sanitaria/tx-hepatico/preguntas_1-6.asp.

Blitterswijk, Clemens Van, and Jan De Boer. 2014. *Tissue Engineering*. Academic Press.

Centro Nacional de Microelectrónica. 2014. "Cámara de Cocultivo Endotelio-Vascular Con Microfluídica Y Membrana No Integrada."

Esther Carrasco Chaumel. 2005. "Mecanismos de Protección Del Precondicionamiento Isquémico En El Trasplante Hepático de Injertos Esteatósicos." Universidad de Barcelona.

Huh, Dongeun, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martín Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin, and Donald E. Ingber. 2010. "Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip." *Science* 328 (5986): 1662–68. doi:10.1126/science.1188302.

Ildefonso, José Ángel, and Javier Arias-Díaz. 2010. "Fisiopatología de La Lesión Hepática Por Isquemia-Reperusión." *Cirugía Española* 87 (04): 202–9. doi:10.1016/j.ciresp.2009.11.009.

Illa, Xavi, Sergi Vila, Jose Yeste, Carmen Peralta, Jordi Gracia-Sancho, and Rosa Villa. 2014. "A Novel Modular Bioreactor to In Vitro Study the Hepatic Sinusoid." *PLoS ONE* 9 (11): e111864. doi:10.1371/journal.pone.0111864.

"Instrumentacion Para El Monitorieo de Un Biorreactor." 2015. *Scribd*. Accessed May 31. <https://es.scribd.com/doc/102604032/Instrumentacion-Para-El-Monitorieo-de-Un-Biorreactor>.

Juan Antonio Rubia Mena. 2010. "Nociones Básicas Sobre Adquisición de Señales." <http://www.electrosector.com/wp-content/ftp/descargas/nociones.pdf>.

Khetani, Salman R, Dustin R Berger, Kimberly R Ballinger, Matthew D Davidson, Christine Lin, and Brenton R Ware. 2015. "Microengineered Liver Tissues for Drug Testing." *Journal of Laboratory Automation* 20 (3): 216–50.

MathWorks. 2015. "GUI de MATLAB." <http://es.mathworks.com/discovery/matlab-gui.html?nocookie=true>.

Mummery, Christine, Anja van de Stolpe, Bernard Roelen, and Hans Clevers. 2014. *Stem Cells: Scientific Facts and Fiction*. Academic Press.

Neyra, Ramirez, and Fernando Gabino. 2009. "Sistema de Adquisición de Sensores Analógicos Y Digitales."

Organización Nacional de Trasplantes. 2013. "Registro Español de Trasplante Hepático."

Prieto, M., G. Clemente, F. Casafont, N. Cuende, V. Cuervas-Mons, J. Figueras, L. Grande, et al. 2003. "Documento de consenso de indicaciones de trasplante hepático." *Gastroenterología y Hepatología* 26 (06): 355–75.

segarra e. fisiologia de los aparatos y sistemas. n.d. Universidad de Cuenca.

Seller-Pérez, Gemma, Manuel E. Herrera-Gutiérrez, Miguel Lebrón-Gallardo, José Moreno-Quintana, Esther Banderas-Bravo, and Guillermo Quesada-García. 2008. "Trasplante Hepático: Influencia de Los Factores Dependientes Del Donante." *Medicina Intensiva* 32 (8): 378–84.

Sibulesky, Lena. 2013. "Anatomía Normal Del Hígado." *Clinical Liver Disease* 2 (S4): S61Š – S63Š. doi:10.1002/cld.275.

Tortora, Gerard J., and Bryan H. Derrickson. 2008. *Principles of Anatomy and Physiology*. John Wiley & Sons.

"Transductores de Temperatura Y Humedad." 2015. Accessed May 31. <http://transductores4.blogspot.com.es/2013/07/transductores-de-temperatura-y-humedad.html>.

Villa, Rosa, Constantino Fondevila, Ivan Erill, Anton Guimerà, Ernest Bombuy, Cristina Gómez-Suárez, Juan Carlos Sacristán, and Juan Carlos García-Valdecasas. 2006. "Real-Time Direct Measurement of Human Liver Allograft Temperature from Recovery to Transplantation." *Transplantation* 81 (3). http://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2006/02150/Real_Time_Direct_Measurement_of_Human_Liver.31.aspx.

Wagenknecht, Addie. 2015. "Open Source Hardware Association." *Open Source Hardware Association*. Accessed May 31. <http://www.oshwa.org/>.

9.2. Bibliografía de Consulta

aecc contra el cáncer. 2015. "Anatomía de Hígado." May 30. <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/CANCERDEHIGADO/Paginas/anatomia.aspx>.

Alépée, Natalie, Anthony Bahinski, Mardas Daneshian, Bart De Wever, Ellen Fritsche, Alan Goldberg, Jan Hansmann, et al. 2014. "State-of-the-Art of 3D Cultures (organs-on-a-Chip) in Safety Testing and Pathophysiology." *ALTEX* 31 (4): 441-77. doi:<http://dx.doi.org/10.14573/altex1406111>.

Arduino. 2015a. "Arduino Due."

Asociación de trasplantados de Asturias. 2015. "El Trasplante Hepático." http://donacion.organos.ua.es/submenu3/inf_sanitaria/tx-hepatico/preguntas_1-6.asp.

Blitterswijk, Clemens Van, and Jan De Boer. 2014. *Tissue Engineering*. Academic Press.

Centro Nacional de Microelectrónica. 2014. "Cámara de Cocultivo Endotelio-Vascular Con Microfluídica Y Membrana No Integrada."

Esther Carrasco Chaumel. 2005. "Mecanismos de Protección Del Precondicionamiento Isquémico En El Trasplante Hepático de Injertos Esteatósicos." Universidad de Barcelona.

Huh, Dongeun, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martín Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin, and Donald E. Ingber. 2010. "Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip." *Science* 328 (5986): 1662-68. doi:10.1126/science.1188302.

Ildefonso, José Ángel, and Javier Arias-Díaz. 2010. "Fisiopatología de La Lesión Hepática Por Isquemia-Reperusión." *Cirugía Española* 87 (04): 202-9. doi:10.1016/j.ciresp.2009.11.009.

Illa, Xavi, Sergi Vila, Jose Yeste, Carmen Peralta, Jordi Gracia-Sancho, and Rosa Villa. 2014. "A Novel Modular Bioreactor to In Vitro Study the Hepatic Sinusoid." *PLoS ONE* 9 (11): e111864. doi:10.1371/journal.pone.0111864.

"Instrumentacion Para El Monitorio de Un Biorreactor." 2015. *Scribd*. Accessed May 31. <https://es.scribd.com/doc/102604032/Instrumentacion-Para-El-Monitorio-de-Un-Biorreactor>.

Juan Antonio Rubia Mena. 2010. "Nociones Básicas Sobre Adquisición de Señales." <http://www.electrosector.com/wp-content/ftp/descargas/nociones.pdf>.

Khetani, Salman R, Dustin R Berger, Kimberly R Ballinger, Matthew D Davidson, Christine Lin, and Brenton R Ware. 2015. "Microengineered Liver Tissues for Drug Testing." *Journal of Laboratory Automation* 20 (3): 216-50.

MathWorks. 2015. "GUI de MATLAB." <http://es.mathworks.com/discovery/matlab-gui.html?nocookie=true>.

Mummery, Christine, Anja van de Stolpe, Bernard Roelen, and Hans Clevers. 2014. *Stem Cells: Scientific Facts and Fiction*. Academic Press.

Neyra, Ramirez, and Fernando Gabino. 2009. "Sistema de Adquisición de Sensores Analógicos Y Digitales."

Organización Nacional de Trasplantes. 2013. "Registro Español de Trasplante Hepático."

Prieto, M., G. Clemente, F. Casafont, N. Cuende, V. Cuervas-Mons, J. Figueras, L. Grande, et al. 2003. "Documento de consenso de indicaciones de trasplante hepático." *Gastroenterología y Hepatología* 26 (06): 355-75.

segarra e. fisiología de los aparatos y sistemas. n.d. Universidad de Cuenca.

Seller-Pérez, Gemma, Manuel E. Herrera-Gutiérrez, Miguel Lebrón-Gallardo, José Moreno-Quintana, Esther Banderas-Bravo, and Guillermo Quesada-García. 2008. "Trasplante Hepático: Influencia de Los Factores Dependientes Del Donante." *Medicina Intensiva* 32 (8): 378–84.

Sibulesky, Lena. 2013. "Anatomía Normal Del Hígado." *Clinical Liver Disease* 2 (S4): S61Š – S63Š. doi:10.1002/cld.275.

Tortora, Gerard J., and Bryan H. Derrickson. 2008. *Principles of Anatomy and Physiology*. John Wiley & Sons.

"Transductores de Temperatura Y Humedad." 2015. Accessed May 31. <http://transductores4.blogspot.com.es/2013/07/transductores-de-temperatura-y-humedad.html>.

Villa, Rosa, Constantino Fondevila, Ivan Erill, Anton Guimerà, Ernest Bombuy, Cristina Gómez-Suárez, Juan Carlos Sacristán, and Juan Carlos García-Valdecasas. 2006. "Real-Time Direct Measurement of Human Liver Allograft Temperature from Recovery to Transplantation." *Transplantation* 81 (3). http://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2006/02150/Real_Time_Direct_Measurement_of_Human_Liver.31.aspx.

Wagenknecht, Addie. 2015. "Open Source Hardware Association." *Open Source Hardware Association*. Accessed May 31. <http://www.oshwa.org/>.



Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Presupuesto

"SISTEMA DE MONITORIZACIÓN DE TEMPERATURA PARA UNA CÁMARA DE CO-CULTIVO CELULAR PARA SIMULAR UN PROCEDIMIENTO DE TRASPLANTE HEPÁTICO"

TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA
por **Júlia Vilalba Burrull**

Barcelona, 09 de Junio de 2015

Director: Beatriz Giraldo Giraldo
Departamento de Ingeniería de Sistemas,
Automática e Informática industrial (ESAII)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE PRESUPUESTO

ÍNDICE PRESUPUESTO	106
1. Recursos humanos	107
2. Recursos materiales.....	108
2.1. Sistema de monitorización de temperatura	108
2.2. Sistema de simulación de un procedimiento de trasplante hepático.....	109
3. Coste total.....	110

PRESUPUESTO

Se desglosa el presupuesto del proyecto en varios conceptos. Por un lado la mano de obra. Por otro el coste de los materiales para el sistema de monitorización de temperatura y por último el coste del sistema para simulación de las condiciones de un trasplante hepático.

1. Recursos humanos

Como concepto de recursos humanos o mano de obra se incluyen las horas que se han dedicado al proyecto. Se ha supuesto un contrato en prácticas con remuneración de 8 euros/hora, como estudiante de ingeniería.

Horas de trabajo				
Concepto	Detalle	Horas	€/hora	€
Diseño Sistema temperatura	Análisis de soluciones posibles, cálculo hardware	55	8	440
Diseño sistema de simulación trasplante	Tiempo de búsqueda de información sobre el trasplante hepático y diseño del sistema fluídico que simula el trasplante; tubos, cálculo de caudales,...	55	8	440
Implementación Sistema de monitorización de temperatura	Montaje Hardware, fresado de la cámara, programación Arduino y Matlab GUI.	160	8	1280

Implementación sistema de fluídica	Montaje; tubos, válvulas, boquillas tubos, calibración bomba,	75	8	600
Prueba experimental	Realización de 3 pruebas experimentales completas	50	8	400
				3160

2. Recursos materiales

2.1. Sistema de monitorización de temperatura

Sistema de monitorización de temperatura				
Concepto	Detalle	Unidades	€/ud	€
Software Matlab	Matlab 2014	1	2000	2000
Termistor	Termistor NTC (2123, Genesee BioMedical, Inc.)	1	16,82	16,82
Arduino Due	Arduino Due (Farnell)	1	42,18	42,18
Cable USB	Cable USB mini B (Farnell)	1	16,64	16,64
Caja Arduino	Arduino Enclosure, ABS/PC, BLACKX (Farnell)	1	12,08	12,08
				2087,72

2.2. Sistema de simulación de un procedimiento de trasplante hepático

A continuación se detalla el coste de todos los materiales:

Sistema de simulación de condiciones de trasplante				
Concepto	Detalle	Unidades	€/ud	€
Biorreactor	El biorreactor diseñado en el GAB, no está a la venta actualmente*.	1	*	0
Bomba peristáltica	Gilson, Peristaltic Pump MINIPULS® 3	1	1490,50	1490,5
Filtro 'antiburbujas'	Speedflow, GVS	1	5	5
Reservorios	Frasco de vidrio con rosca DIN, autoclavable	4	3,12	12,48
Tubos de silicona (metros)	Tubos de silicona de 5 mm de diámetro, S/R Tube, Platinum Cured 60sh Translucent 1.6mm ID x 3.2mm OD 25m	6	1,63	9,78
Válvulas	Válvula de 3 vías de plástico	2	0,5	1
Tapones	Tapones para tubos de 5 mm	2	0,2	0,4
				1519,16

3. Coste total

El coste total del trabajo es la suma de los costes parciales presentados anteriormente.

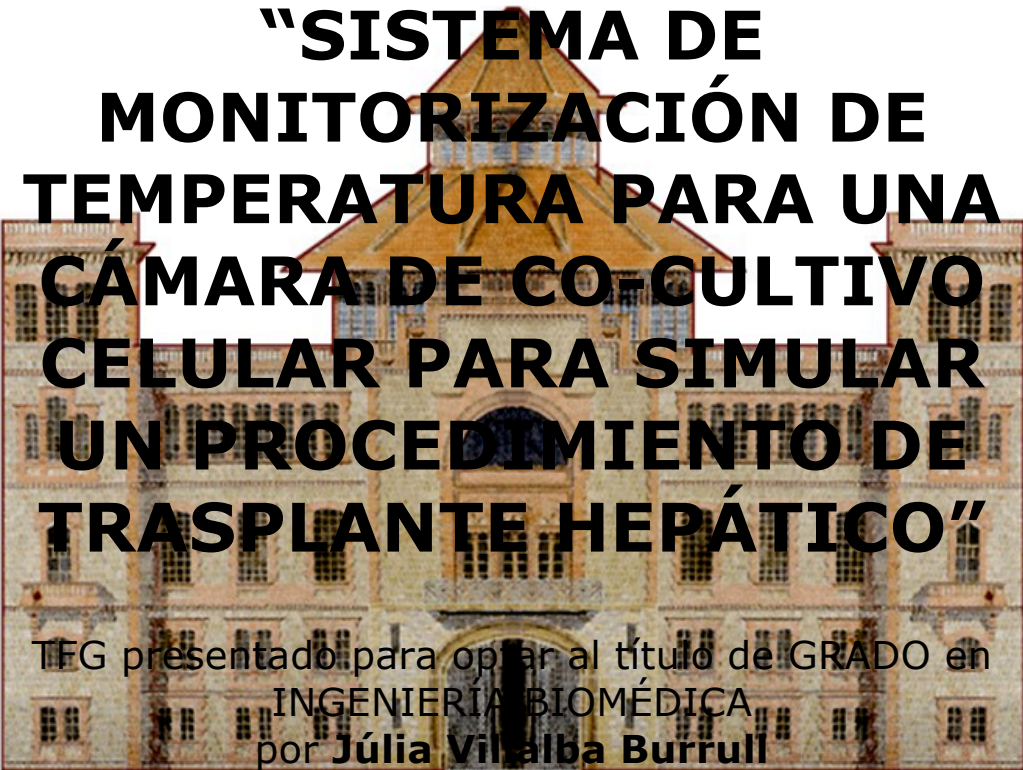
Concepto	€
Recursos humanos	3160
Sistema de monitorización de temperatura	2087,72
Sistema de simulación de las condiciones de un trasplante hepático	1519,16
TOTAL	4006,88



Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Anexo



**“SISTEMA DE
MONITORIZACIÓN DE
TEMPERATURA PARA UNA
CÁMARA DE CO-CULTIVO
CELULAR PARA SIMULAR
UN PROCEDIMIENTO DE
TRASPLANTE HEPÁTICO”**

TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA
por **Júlia Vilalba Burrull**

Barcelona, 09 de Junio de 2015

Director: Beatriz Giraldo Giraldo
Departamento de Ingeniería de Sistemas,
Automática e Informática industrial (ESAII)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE ANEXO

ÍNDICE ANEXO	112
1. Programa Arduino	113
2. Programa Matlab	115

1. Programa Arduino

A continuación podemos encontrar el código diseñado con Arduino para la adquisición de datos de temperatura durante la simulación de las condiciones de un trasplante hepático en el Liver on a Chip a partir de un termistor NTC:

```
// Declaramos las variables y las inicializamos
int sensorPin = A0; // Sensor conectado en A0
int Rpu = 12000; // Valor resistencia pull up
int Cuentas = 0; // Inicializamos valor cuentas
float Temp = 0; // Inicializamos valor voltaje
float Rterm = 0; // Inicializamos valor resistencia
float T = 0; // Inicializamos valor temperatura
float B = 3882; // Valor de la constante B del termistor
int midiendo = 0; // Inicializamos la variable para medir

// Resolución
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  analogReadResolution(12);
}

// Media cada 5 adquisiciones de cuentas
void loop() {
  midiendo = 0;
  Cuentas = 0;
  while (midiendo < 5)
  {
    Cuentas = Cuentas + analogRead(sensorPin);
    midiendo = midiendo + 1;
    delay (250);
  }
  Cuentas = Cuentas / 5;

  // Calculamos el voltaje
  Temp = (float)Cuentas * 3.3 / 4096;

  // Calculamos la resistencia
  Rterm = (float)Temp * Rpu / (3.3 - Temp);
}
```

```
// Calculamos la temperatura
T = (float)((B * 273) / (B + 273 * (log (Rterm / 32740)))) - 273);

// Mandamos el valores de temperatura cada 10 segundos
Serial.printf("%g\n", T);
delay (10000);
}
void serialEvent() {
}
}
```

2. Programa Matlab

A continuación podemos encontrar el código diseñado con Matlab para la visualización de la monitorización de temperatura durante la simulación de las condiciones de un trasplante hepático en el Liver on a Chip:

```
function varargout = Temp_Rev2(varargin)
% TEMP_REV2 MATLAB code for Temp_Rev2.fig

% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',       mfilename, ...
                  'gui_Singleton',  gui_Singleton, ...
                  'gui_OpeningFcn', @Temp_Rev2_OpeningFcn, ...
                  'gui_OutputFcn',  @Temp_Rev2_OutputFcn, ...
                  'gui_LayoutFcn',  [], ...
                  'gui_Callback',   []);

if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargout
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code - DO NOT EDIT

% --- Executes just before Temp_Rev2 is made visible.
function Temp_Rev2_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% Choose default command line output for Temp_Rev2
handles.output = hObject;
```

```
% % Inicialización puerto de comunicación
delete (instrfind({'Port'},{get(handles.edit_com,'string')}));
Comm
serial(get(handles.edit_com,'string'),'BaudRate',9600,'Terminator','CR/LF'
);
handles.Comm = Comm;
handles.Comm.InputBufferSize = 1024;
handles.Comm.BytesAvailableFcn = {@Comm_BytesAvailableFcn,handles};
handles.Comm.BytesAvailableFcnCount = 1;
handles.Comm.BytesAvailableFcnMode = 'byte';
handles.Comm.Terminator = {'CR/LF' 'LF/CR'};
handles.Comm.Timeout = 0.5; %%%%%% caution 10

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

clear all %Creamos las variables globales donde se guardara el valor de
cada temperatura i el tiempo.
global Temp LogTemp LogTime

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = Temp_Rev2_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

% --- Rutina de atención a la recepción de datos a través del puerto
serie.
function Comm_BytesAvailableFcn(hObject, eventdata, handles)
    global Temp LogTemp LogTime
    nB = get (hObject,'BytesAvailable');
    if (nB > 1)
        Temp = fscanff(hObject,'%f');
        LogTemp = [LogTemp Temp];
        LogTime = [LogTime now];
        plot(handles.axes1,(LogTime-LogTime(1))*24,LogTemp);
```

```
end

% Función que se desarrolla al pulsar el botón pushbutton1 (OPEN).
function pushbutton1_Callback(hObject, eventdata, handles)
handles.Comm.Port = get(handles.edit_com,'string');
Cs = get (handles.Comm, 'Status');%%% OPEN or CLOSED.
if (strcmp (Cs,'open'))
    fclose(handles.Comm);
else
    fopen(handles.Comm);
end

Cs = get (handles.Comm, 'Status');%%% OPEN o CLOSED.
if (strcmp (Cs,'open'))
    set (handles.pushbutton1,'string','close');
else
    set (handles.pushbutton1,'string','open');
end

% Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_file_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
%       See ISPC and COMPUTER.
if      ispc      &&      isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

% Función que se desarrolla al pulsar el botón pushbutton_reset (RESET).
function pushbutton_reset_Callback(hObject, eventdata, handles)
    global LogTemp LogTime LogTimeStr
    LogTemp = []; % Vaciamos las variables.
    LogTime = [];
    LogTimeStr = [];
    cla(handles.axes1,'reset') % Dejamos en blanco el gráfico.
```

% Función que se desarrolla al pulsar el botón pushbutton_save (SAVE).

```
function pushbutton_save_Callback(hObject, eventdata, handles)
```

```
    global LogTemp LogTime LogTimeStr
```

```
    LogTimeStr = datestr(LogTime);
```

%Guardar datos en archivo EXCEL

```
Nameexcel = [get(handles.edit_file, 'String')];
```

```
titulo = {'LogTimeStr' 'LogTemp'};
```

```
datos = vertcat(LogTemp , LogTime)';
```

```
xlswrite(Nameexcel, titulo, 'A1');
```

```
xlswrite(Nameexcel, datos, 'A2');
```