

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Diseño y desarrollo de un biorreactor para tejido cardíaco

Tesis que presenta

Miguel Ángel Arroyo Ornelas

Para obtener el grado

Maestro en ingeniería biomédica

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González

Dra. Atlántida Margarita Raya Rivera

Jurado Calificador:

Presidente: Dr. Roberto Olayo González

Secretario: Dr. Gerardo Muñoz Hernández

Vocal: M en C. Raúl Martínez Memije

Ciudad de México, Abril, 2018

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**Diseño y desarrollo de un biorreactor para
tejido cardiaco**

Tesis que presenta

Miguel Ángel Arroyo Ornelas

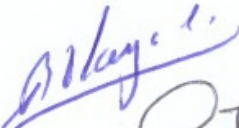

Para obtener el grado

Maestro en ingeniería biomédica

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González

Dra. Atlántida Margarita Raya Rivera

Jurado Calificador:

Presidente: Dr. Roberto Olayo González

Secretario: Dr. Gerardo Muñoz Hernández

Vocal: M en C. Raúl Martínez Memije




Ciudad de México, Abril, 2018



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00134

Matricula: 2153804463

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN
BIORREACTOR PARA TEJIDO
CARDIACO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 6 del mes de abril del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ
M. EN C. RAUL MARTINEZ MEMIJE
DR. GERARDO MUÑOZ HERNANDEZ



MIGUEL ANGEL ARROYO ORNELAS
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: MIGUEL ANGEL ARROYO ORNELAS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ

VOCAL

M. EN C. RAUL MARTINEZ MEMIJE

SECRETARIO

DR. GERARDO MUÑOZ HERNANDEZ

Resumen

En el presente trabajo se muestra el proceso de diseño de un biorreactor enfocado a mantener viable tejido cardiaco para su posterior tratamiento y reparación. Se implemento el diseño de componentes electrónicos y mecánicos, la parte estructural y el sistema de control. Se realizaron pruebas de los diferentes parámetros de salida del sistema para validar su posterior uso en tejido vivo.

Dedicado a mi mamá Alicia Ornelas Valadez por su ejemplo de esfuerzo constante y apoyo incondicional.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), por la formación que me brindó y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Roberto Olayo González del departamento de Física en la UAM-I, por haberme brindado la confianza para realizar el proyecto, por su constante apoyo, paciencia y dirección en la realización de esta tesis.

A la Dra. Atlántida Margarita Raya Rivera jefa del departamento de Ingeniería de Tejidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez por sus comentarios y colaboración para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Muñoz Hernández y el M en C. Raúl Martínez Memije, por haber contribuido con su exhaustiva revisión a la mejora del presente trabajo.

Al Dr. José Rafael Godínez Fernández, por sus consejos y comentarios durante el desarrollo del proyecto.

índice

índice	iv
1 Introducción	1
1.1 Problema: Trasplante de órganos	1
1.2 Algunas soluciones	4
1.2.1 Bioimpresión en 3D	4
1.2.2 Modificación genética de animales	5
1.2.3 Descelularización y Rescelularización	6
1.3 Nuevas soluciones propuestas	7
1.3.1 Reemplazo gradual celular	8
1.3.2 Reparación de órganos por reemplazo celular	9
1.4 Propuesta de biorreactor	9
2 Planteamiento del problema y pregunta de investigación	11
2.1 Planteamiento del problema	11
2.2 Pregunta de investigación	11
3 Justificación, Hipótesis y Objetivos	12
3.1 Justificación	12
3.2 Hipótesis	13
3.3 Objetivo general	13
3.4 Objetivos específicos	13
4 Metodología	14
4.1 Revisión	14
4.2 Diseño	14
4.3 Implementación	15
4.4 Pruebas	15
5 Revisión de biorreactores	17
5.1 Biorreactores para tejido	17

5.2	Biorreactores para órganos completos	19
5.3	Sistemas comerciales de transporte	21
5.4	Compilación de características	23
6	Diseño del biorreactor	25
6.1	Diseño básico	25
6.2	Selección de componentes	26
6.2.1	Control y comunicación	27
6.2.2	Alimentación eléctrica	27
6.2.3	Temperatura	27
6.2.4	Control de flujo	28
6.2.5	Control de gases	28
6.3	Diseño de módulos	28
6.4	Diseño de estructura	31
6.4.1	Contenedores biorreactor	31
6.4.2	Caja de componentes electrónicos	31
6.5	Diseño de control electrónico	33
6.5.1	Arquitectura ReBot	34
6.5.2	Arquitectura general	36
6.6	Diseño del sistema de control	37
6.6.1	Control de temperatura	39
6.6.2	Control de CO2	39
6.6.3	Control de flujo	39
6.7	Diseño de interfase	40
7	Implementación	42
7.1	Caracterización de sensores	42
7.2	Caracterización de actuadores	44
7.3	Pruebas de comunicación	45
7.4	Modelo base de datos	46
7.5	API del biorreactor	48
7.6	Interfase de control	49
7.7	Impresión 3D de las piezas	49
7.8	Ensamble de módulos	50
7.9	Montaje del sistema	51
8	Pruebas del biorreactor	56
8.1	Pruebas estáticas	56
8.2	Pruebas 48 Horas	59
8.3	Pruebas perturbación	59
9	Conclusiones	65
	Bibliografía	67

Introducción

1.1 Problema: Trasplante de órganos

Cuando un órgano se lesiona gravemente ya sea por defectos genéticos, trauma o enfermedades crónicas, es necesario realizar un trasplante del órgano para lograr mantener con vida al paciente.

Actualmente se realizan trasplantes rutinarios de hígado, riñón, páncreas, pulmones, hueso, corazón, intestino y tejido vascular. En general el proceso de trasplante involucra remover el órgano sano de un donador, este puede ser un donador vivo cuando se dona un riñón, un lóbulo del hígado, un segmento o lóbulo del pulmón o una porción de intestino.

También se pueden obtener de un donador que ha perdido la vida, dependiendo de la circunstancia de muerte se pueden donar ciertos órganos, por ejemplo en el caso de que el donador fallezca de paro cardiaco se pueden donar corneas, hueso y algunas porciones de tejido. Para el caso de muerte encefálica, se pueden donar prácticamente todos los órganos anteriormente listados.

En general el proceso de trasplante en México es el siguiente [1]:

- **Diagnostico** El primer paso es que un médico especializado debe emitir un diagnóstico que indique que un órgano del paciente requiere ser trasplantado.
- **Evaluación** El paciente se somete a una serie de pruebas físicas y psicológicas de protocolo para determinar si es un candidato viable para recibir un trasplante.
- **Comité Interno** Si el equipo médico determina que el trasplante es la única alternativa, el caso pasa a un comité interno de trasplantes en el hospital el cual establece un acta que avala la decisión de realizar el procedimiento.

1.1. Problema: Trasplante de órganos

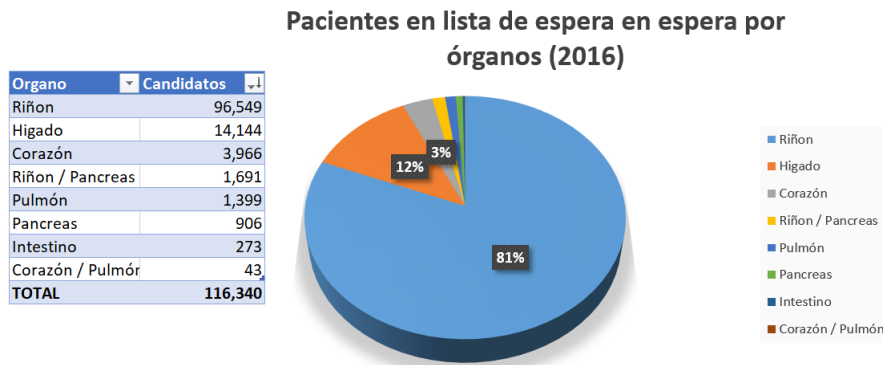


Figura 1.1:

Número de pacientes en la lista de espera por órgano en Estados Unidos al año 2016 (United Network For Organ Sharing -UNOS - 2016) [3]

- **Ingreso al Registro Nacional de Trasplantes** En este punto el hospital introduce los datos de paciente en el registro nacional, el cual es un padrón de todos los pacientes que están esperando un trasplante.

La posición de un paciente en la lista de espera de trasplantes está determinada por la antigüedad y el tiempo de espera de la persona, otros factores que se toman en cuenta son la probabilidad de que el paciente pierda la vida, la compatibilidad con el donador de órgano, también se toma en cuenta si existe un donador voluntario que sea compatible con el paciente. Los órganos con mayor demanda son el riñón y la cornea, estos tienen un promedio de espera de 24 a 30 meses, para el caso de otros órganos como hígado o corazón el tiempo de espera puede ser mucho mayor [2].

Ante este panorama y la dificultad para conseguir donadores de órganos, la lista de pacientes en espera crece año con año, tan solo al 2016 en Estados Unidos había más de 116 mil pacientes en la lista. En la figura 1.2, se puede observar que la mayor demanda por mucho es para riñón (81%) seguida de hígado (12 %) y corazón (3 %).

Para el caso de México, se pueden observar los datos en la figura 1.2, el mayor porcentaje es para riñón con cerca del (54%), seguido de cornea con el (29 %) y corazón con el (16 %).

En la tabla 1.3 muestra el número de trasplantes por cada órgano que se realizaron en Estados Unidos al 2016. En comparativa con la cantidad de pacientes en lista de espera es claro que existe un enorme déficit de órganos.

La figura 1.4, contrasta el déficit que existe cada año entre los donadores de un órgano y los pacientes en lista de espera, como se observa los últimos 15 años el número de pacientes se va incrementando cada año, lo que aumenta el tiempo de espera en la lista y por consiguiente el número de muertes, en

1.1. Problema: Trasplante de órganos

Pacientes en lista de espera en México espera por órganos (2016)

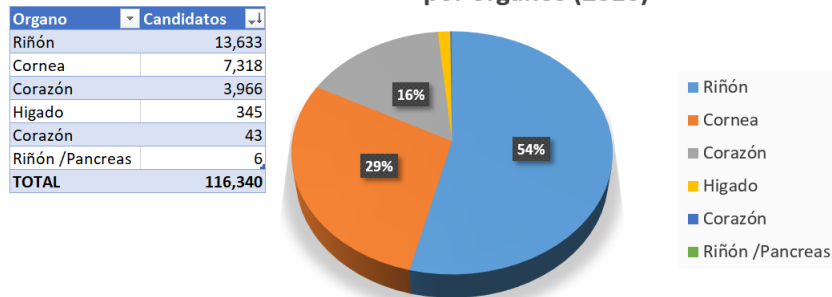


Figura 1.2:

Número de pacientes en la lista de espera por órgano en México al año 2017 (Centro Nacional de Trasplantes 2017) [4]

Transplante por órgano en (2016)

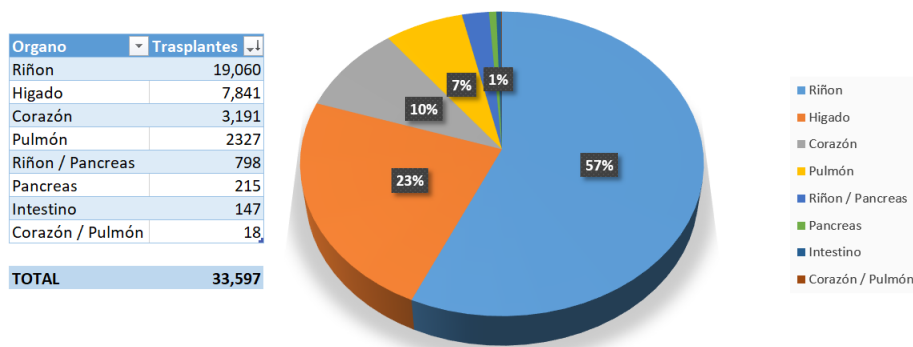


Figura 1.3:

Número de órganos trasplantados en Estados Unidos al año 2016 (UNOS 2016) [3]

Estados Unidos se estima que mueren más de 7000 pacientes que están en lista de espera cada año [5].

En el mejor de los casos, las personas que logran obtener un órgano para trasplante, ven reducida significativamente su calidad y expectativa de vida, esto principalmente debido a los medicamentos inmunosupresores que deben tomar o a la respuesta de rechazo del órgano, ya que estos suprimen el sistema inmune y vuelve al paciente propenso a infecciones oportunistas, además que aumenta la probabilidad de generar tumores cancerígenos [6].

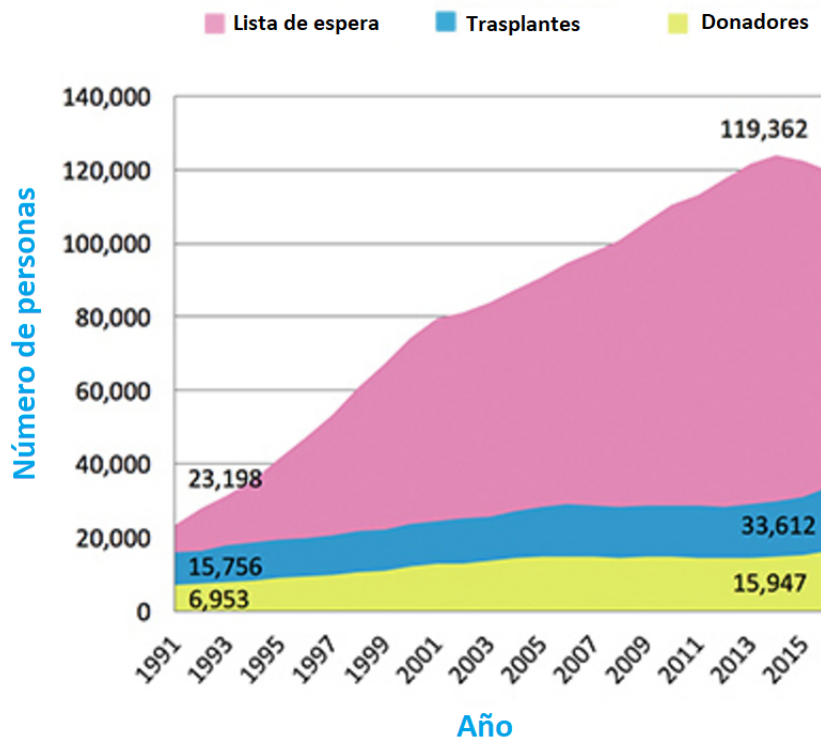


Figura 1.4:

Gráfica comparativa por año entre pacientes en lista de espera, órganos trasplantados y donadores (vivos y muertos) (Organ Donor US) [5]

1.2 Algunas soluciones

Ante los problemas que representa el proceso de trasplante, se han generado diversas alternativas para generar órganos bajo demanda, que sean histocompatibles con el paciente receptor.

Los esfuerzos en la última década se han concentrado en tres líneas principales para resolver el problema:

1.2.1 Bioimpresión en 3D

Con el auge de los sistemas de impresión 3D en la última década, se ha explorado una rama de esta técnica enfocada al uso de materiales biológicos. El proceso consiste en inyectar a través de sistemas microfluidicos combinaciones de hidrogeles y células obtenidas del propio paciente, estos fluidos se van depositando en diferentes capas de manera secuencial, el objetivo es generar una estructura tridimensional sólida con la suma de todas las capas, la idea es que con la tecnología adecuada, se podría imprimir vasos



Figura 1.5:

Ejemplo de una oreja impresa en 3D usando un hidrogel como material de sacrificio para el soporte de células (Wakeforest Institute) [8]

sanguíneos, estructuras de soporte, microestructuras funcionales y en general todas las partes que componen un órgano de forma que al final del proceso se obtenga un órgano nuevo y funcional compatible con el paciente receptor. [7]

La impresión en 3D es una de las técnicas más versátiles, ya que permite generar estructuras a voluntad y en base a biomateriales generados sintéticamente, por lo que sería posible generar una cantidad casi ilimitada de órganos con parámetros específicos, ante esta promesa, se han generado diversos intentos en tejido como piel y vasos sanguíneos e incluso algunos intentos de modelos de órganos simples [9]; sin embargo, la técnica aún enfrenta diversos problemas, como la necesidad de encontrar mezclas adecuadas para depositar las células, mejorar la resolución para generar estructuras complejas, y por último, una vez que la estructura del órgano este preparada, aun no se tiene una estrategia clara para darle funcionalidad adecuada [10] [11].

1.2.2 Modificación genética de animales

Hasta hace unos años la modificación genética de animales parecía tener pocas oportunidades para generar órganos aptos para trasplante en humanos, sin embargo ha resurgido gracias a los avances en medicamentos inmunosupresores y principalmente la generación de nuevas técnicas de manipulación genética, principalmente en técnicas como CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) [12] que ha simplificado el proceso de manipulación genética, lo ha hecho este proceso accesible a una cantidad mayor de laboratorios. La idea de esta técnica es modificar los genes de animales, principalmente de cerdo ya que

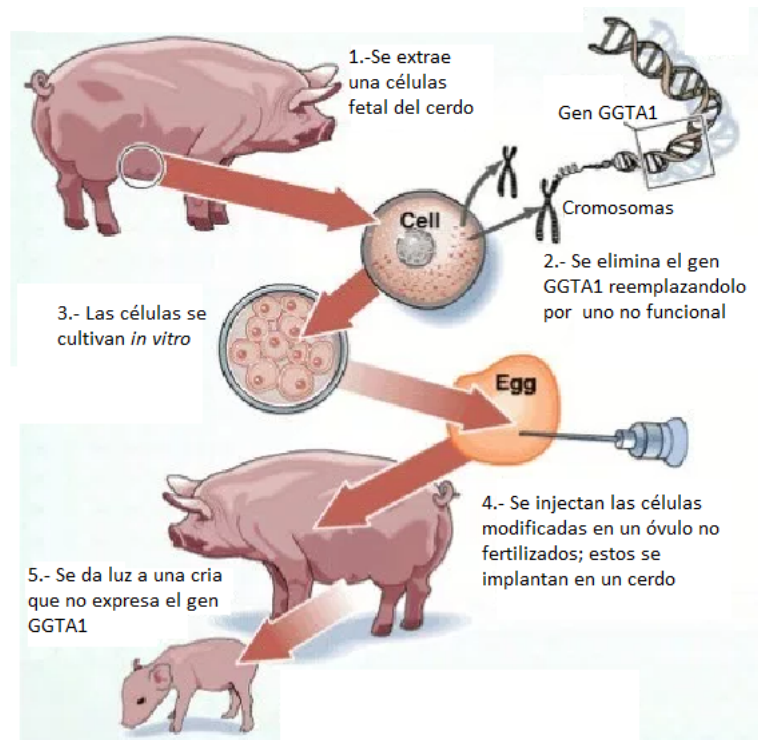


Figura 1.6:

Proceso de eliminación de genes productores de antígenos en cerdos para producir órganos más adecuados para humanos.

se ha observado que sus órganos son los más parecidos estructuralmente a los de los humanos, para eliminar los antígenos que causan rechazo en el trasplante entre especies [13]. La figura 1.6 muestra un esquema del proceso de eliminación de los genes, a partir de una célula fetal de un cerdo se eliminan los genes productores de antígenos, estas células se cultivan *in vitro* y posteriormente se implantan en un óvulo fertilizado, de forma que las crías del cerdo no exprese este gen.

Esta técnica es muy prometedora, a largo plazo se podrían generar un suministro prácticamente ilimitado de órganos, pero todavía se tienen problemas inherentes al uso de xenotrasplantes, además de las complicaciones técnicas ya que se requieren procesos muy complicados. El camino para hacer los órganos viables para trasplante humano sin efectos secundarios graves por esta técnica aún es muy largo.

1.2.3 Descelularización y Rescelularización

Una de las técnicas que más expectativas ha generado en los últimos años para crear órganos adecuados para la implantación en humanos es la de-

scelularización de órganos para su posterior recelularización. La técnica consiste en eliminar las células en el órgano, este se puede obtener por donación cadavérica o por extracción de un animal, una vez que se extrae el órgano, se coloca en un biorreactor que ajusta las condiciones adecuadas para evitar que se degrade. Cuando se tiene el órgano estabilizado se comienza el proceso de descelularización, en este paso se retiran todas las células con el fin de dejar solo la matriz extra celular, el proceso se puede hacer de varias formas por medios físicos, como shock térmico o generando una presión de flujo dentro del órgano, también se puede realizar por métodos enzimáticos por ejemplo con tripsina, pero principalmente se realiza por perfusión usando ciertos detergentes iónicos que eliminan las células eliminando su membrana [14].

Al final del proceso de descelularización se obtiene tiene la matriz extracelular libre, se realiza el sembrado de células también por perfusión, estas células se obtienen del paciente receptor para generar un órgano nuevo compatible [15]. En esta fase se puede ocupar un biorreactor diferente para darle soporte vital al órgano que se generado. En la figura 1.7, se muestra el corazón de un conejo que ha sido sometido a los diferentes pasos de descelularización hasta dejar la matriz extracelular libre (imagen central) y posteriormente se vuelve a celularizar, como se puede ver en las últimas dos imágenes, a pesar de que se obtiene una estructura similar, la densidad de esta es mucho menor por lo que se ve traslucida.

A pesar de que esta es una de las técnicas mas prometedoras, aún se enfrenta a numerosos obstáculos, entre ellos que al eliminar las células si se usa demasiado detergente es probable que se dañe la matriz extracelular, por otro lado si no se usa el suficiente es posible que queden restos de antígenos que generen una respuesta inmune adversa. Por otra parte, en el proceso de recelularización se tienen problemas durante la adhesión de células, y al ir creciendo estructuras más complejas, estas se vuelven trombogénicas, y se desencadenan procesos de inflamación crónica, lo cual produce el rápido deterioro del órgano. En general, las estructuras que se obtienen no conservan completamente la estructura original y aún no se logra replicar la funcionalidad del órgano para que sea adecuado para el trasplante [16].

1.3 Nuevas soluciones propuestas

Partiendo de la técnica de descelularización-rescelularización, se han propuesto dos métodos que podrían disminuir los problemas asociados a esta y que podrían utilizarse



Figura 1.7:

Diferentes pasos durante el proceso de descelularización y recelularización. (Matthessen 2008)

1.3.1 Reemplazo gradual celular

La propuesta en este método es no realizar la descelularización del órgano de forma completa, si no realizarla de forma gradual a la par que se van sembrando las nuevas células, lo que se espera, es que el órgano conserve su vascularización, estructura y función a lo largo de todo el proceso. Los pasos que se proponen para este método son los siguientes:

- Extraer el órgano de un donador, el cual puede ser un paciente con daño cerebral o podría ser a partir de un cerdo. Al extirparse se le debe dar el mismo tratamiento como si fuera a trasplantarse de inmediato para mantener su integridad y funcionalidad.
- El órgano debe mantenerse en un biorreactor que le de las condiciones adecuadas para mantener funcional el órgano a lo largo del proceso.
- Se comienzan a remover las células del donador de forma gradual, esto se puede hacer por medios enzimáticos, con detergentes suaves o por medio de agentes apoptóticos.
- Conforme se van removiendo las células originales del órgano, se le van sembrando nuevas células del paciente receptor ya sea por inyección o perfusión. Siempre manteniendo un equilibrio adecuado entre eliminación y sembrado de forma que el órgano se mantenga integro.
- Durante el proceso se podrían agregar macrófagos al sistema circulatorio del órgano con el objetivo de modular la respuesta inflamatoria y eliminar los residuos celulares que pudieran quedar.
- El intercambio celular se sigue realizando hasta que todas las células originales sean eliminadas y solo queden células del paciente receptor. Este órgano dentro del biorreactor eventualmente ira sustituyendo su matriz extracelular de forma que no queden residuos antigénicos. Al

final se espera obtener un órgano funcional que sea compatible con el receptor.

1.3.2 Reparación de órganos por reemplazo celular

Otro posible método, sería reparar el órgano dañado de un paciente reemplazando la parte del tejido dañado con nuevas células para que logre recobrar su funcionalidad, los pasos para este proceso serían los siguientes:

- El órgano disfuncional del paciente se remueve y se sustituye por un sistema artificial temporal para mantener con vida al paciente.
- El órgano se conecta en un biorreactor que brinde las condiciones adecuadas para conservar su integridad.
- Se extraen células madre del paciente y se diferencian a las líneas celulares adecuadas que se requieran para reemplazar las porciones dañadas del órgano.
- A través de perfusión o por inyecciones en las zonas específicamente dañadas, se van sembrando las nuevas células hasta que el órgano recupere su funcionalidad total o parcial.
- El órgano regenerado con las propias células del paciente se trasplanta de nuevo. Al final se espera tener un órgano con la funcionalidad suficiente para mantener con vida al paciente, evitando todas las complicaciones por compatibilidad.

1.4 Propuesta de biorreactor

Como se puede observar en ambas propuestas para la producción de órganos es necesario mantener la funcionalidad y estructura de estos, para lograrlo es necesario conectarlos a un biorreactor que brinde el soporte vital necesario.

En el presente trabajo se expone el proceso de diseño, desarrollo e implementación de un biorreactor que tenga las funciones adecuadas para poder realizar los procesos expuestos en las secciones anteriores. Es decir brindar soporte vital al órgano a fin de mantenerlo vivo el tiempo suficiente para realizar el reemplazo o reparación celular. Para este proyecto como una primera aproximación se eligió enfocar el biorreactor para su uso en tejido cardíaco, ya que el corazón es uno de los órganos más estudiados para el proceso de descelularización, además que no presenta microestructuras complejas como en el caso de los pulmones o riñones y además es relativamente sencillo medir su funcionalidad por sensores eléctricos, mecánicos y de flujo.

Dentro del alcance de este proyecto se implementó un biorreactor que provee los requerimientos mínimos para mantener un órgano estable:

- Circulación de fluidos y nutrientes. Se obtuvo un sistema de control de flujo por medios peristálticos a fin de mantener constantemente la circulación a través del sistema vascular y poder mantener nutridas a las células.
- Oxigenación y control de gases. Se espera brindar una atmósfera adecuada de oxígeno y CO₂ en el aire que circule en el biorreactor, además de inyectar oxígeno a la solución que nutre al órgano.
- Temperatura y humedad. Se generó un sistema para el control de temperatura tanto de la solución que circula como del ambiente del biorreactor, además que se monitorea el ambiente constantemente para mantener la humedad y el órgano hidratado.

A lo largo de los siguientes capítulos se expone el proceso para la creación de este biorreactor, desde la revisión de sistemas similares, la planeación de la metodología para medir los parámetros iniciales del biorreactor, el diseño de los diferentes sistemas que lo componen, la implementación de dichos sistemas y finalmente las pruebas pertinentes para medir la funcionalidad del biorreactor.

Planteamiento del problema y pregunta de investigación

2.1 Planteamiento del problema

Como se mostró en la introducción, existe en el mundo una gran escasez de órganos para los paciente que se encuentran en lista de espera de trasplantes, un número importante de estas personas fallecen a falta de un donador.

Ante esta perspectiva se han explorado diferentes métodos para lograr producir órganos artificiales nuevos o reparar el órgano o los tejidos existentes. Estos métodos requieren brindar al tejido u órgano condiciones óptimas para mantenerlos vivos durante el proceso de regeneración.

Para brindar las condiciones óptimas a los tejidos, es necesario generar biorreactores especializados para tejido que permitan aportar los nutrientes necesarios, la temperatura adecuada y un flujo de gases que distribuya el oxígeno al órgano, la construcción de estos sistemas de ser flexible para permitir agregar nuevos elementos para mejorar las condiciones o los métodos de medición. Es por esto que en el presente trabajo se explora la construcción de un prototipo de biorreactor que brinde las condiciones básicas para mantener el tejido en buenas condiciones, y además tenga un diseño modular para agregar nuevos módulos conforme sea necesario.

2.2 Pregunta de investigación

¿Es posible construir un biorreactor modular con el control de las condiciones, adecuadas, para el cultivo de órganos el tiempo necesario?

Justificación, Hipótesis y Objetivos

3.1 Justificación

Para realizar experimentos e investigación en el campo de ingeniería de tejidos, específicamente para los procesos de descelularización y recelularización de tejidos y órganos, es necesario contar con un biorreactor que brinde las condiciones ambientales y de nutrientes adecuadas para realizar el proceso.

Del presente trabajo se espera obtener un prototipo funcional de un biorreactor, que contenga un sistema de circulación de fluidos adecuado para el flujo de solución con nutrientes o soluciones para el proceso de descelularización, además de un sistema para controlar el flujo de gases, la temperatura y humedad el interior del sistema. Para generar este dispositivo se espera obtener un sistema de control electrónico e informático, este debe ser expandible para poder agregar nuevos módulos, de forma que conforme se avance en la investigación se puedan agregar nuevos sensores o actuadores que permitan hacer las pruebas pertinentes en cada fase.

Al construir el dispositivo se obtendrá un biorreactor para poder realizar procesos simples de decelularización y recelularización, pero principalmente se espera generar una plataforma novedosa de desarrollo, es decir un modelo base de comunicación y control electrónico para este tipo de dispositivos, que además habilite la expansión del sistema a través de módulos adicionales, sin necesidad de rediseñar o hacer modificaciones importantes al sistema actual, esto es importante ya que al ser la regeneración de tejidos investigación de frontera, será necesario contar con equipos adaptables y flexible que permitan afrontar los posibles problemas técnicos en el proceso de incubación.

3.2 Hipótesis

Es posible construir un biorreactor que ofrezca las condiciones necesarias para mantener un órgano viable el tiempo necesario para realizar el proceso de reemplazo celular en una porción de tejido cardíaco.

3.3 Objetivo general

Diseñar y construir un biorreactor, y mostrar que tiene la capacidad para controlar las condiciones ambientales necesarias para el cultivo de tejido cardíaco.

3.4 Objetivos específicos

- Diseño general del sistema
- Diseño e implementación del sistema de control electrónico
- Diseño e implementación del sistema de flujo
- Diseño e implementación estructura de soporte
- Diseño e implementación del sistema de control ambiental
- Diseño e implementación del sistema de control de gases y oxígeno
- Pruebas de control con perturbaciones

Metodología

El proceso a seguir para la construcción e implementación del biorreactor se ilustra en la imagen 4.1, los detalles sobre cada etapa se describen a continuación:

4.1 Revisión

- **Revisión del estado del arte:** Realizar búsqueda entre los diferentes modelos de biorreactores y sistemas de transporte de órganos.
- **Compilación Características:** Realizar una compilación de las posibles características y funciones que puede tener el biorreactor, para determinar cuales se integrarán.

4.2 Diseño

- **Diseño general:** Determinar las características y funciones que tendrá el biorreactor y realizar un esquema general de componentes.
- **Diseño del sistema de control electrónico:** Determinación de herramientas informáticas y plataformas de desarrollo a utilizar para implementar el control de los componentes electrónicos.
- **Selección de componentes:** Elegir los componentes específicos que se utilizarán para las partes electrónicas y mecánicas.
- **Diseño de estructura de componentes electrónicos:** Estructura sobre la que se montan los componentes electrónicos y se realiza las interconexiones.

- **Diseño de estructura de biorreactor:** Estructura donde se montarán los sensores y actuadores, y los recipientes que contendrán el tejido cardíaco.
- **Diseño del sistema de control:** Diseño del sistema de control del biorreactor.
- **Diseño de interfase:** Diseño de la interfase de control informático con el biorreactor.

4.3 Implementación

- **Caracterización de sensores:** Hacer la implementación básica y posterior caracterización de los sensores que se integran en el sistema.
- **Caracterización de actuadores:** Hacer la implementación básica y posterior caracterización de los actuadores que se integran en el sistema.
- **Programación sistema de control:** Implementación del sistema de control y comunicación electrónico.
- **Programación interfase:** Programar el sistema de interfase e interconectarlo con el sistema de control.
- **Validación de control electrónico:** Realizas pruebas de comunicación y control entre el sistema informático y los elementos electrónicos.
- **Impresión de piezas y montaje del sistema:** Imprimir las diferentes piezas que componen la estructura, ensamblar y montar los componentes en los diferentes módulos.
- **Interconexión de componentes:** Realizar la conexión final de todos los componentes en su conjunto e implementar el control de sistema sobre los componentes.

4.4 Pruebas

- **Pruebas de control del sistema estático:** Realizar las pruebas del biorreactor bajo variables estáticas para la medición de: flujo de solución en el sistema, concentración de CO₂ y temperatura ambiental y en los recipientes.
- **Pruebas de control del sistema bajo perturbaciones:** Realizar pruebas de las diferentes variable, en los sistemas de control bajo la aplicación de perturbaciones.

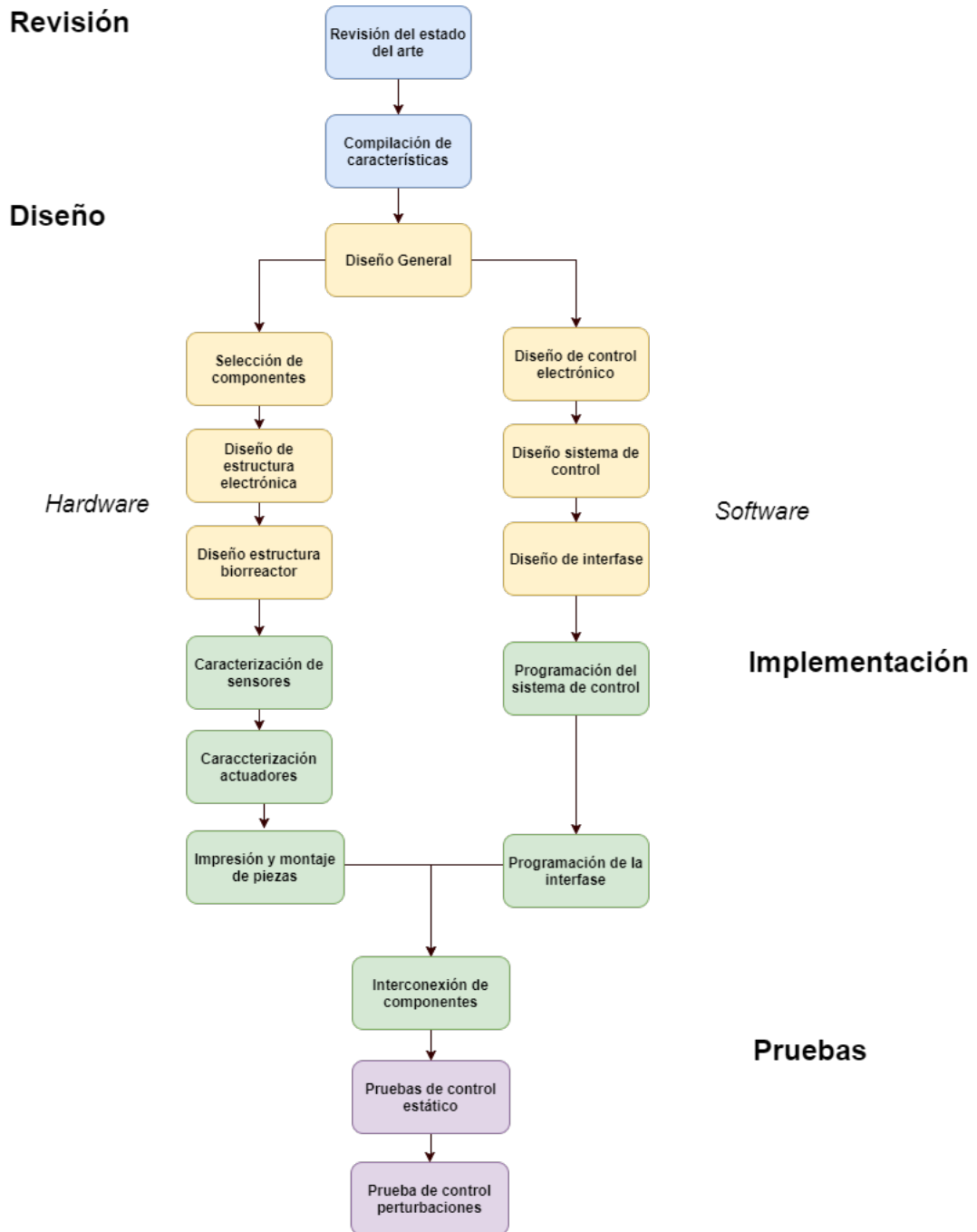


Figura 4.1: Esquema general de la metodología a seguir para la construcción e implementación de un biorreactor. [17]

Revisión de biorreactores

Desde que se comenzó a usar las técnicas de decelularización y recelularización de órganos se han creado sistemas que puedan servir como soporte para realizar la perfusión durante la remoción de células y posteriormente dar soporte vital al nuevo tejido que crece. A continuación se muestra una revisión de algunos de estos sistemas desarrollados tanto para tejidos como para órganos completos.

5.1 Biorreactores para tejido

Los primeros biorreactores que se desarrollaron son para manejar porciones de tejido, para mantenerlas vivas y crecer tejido, principalmente sobre andamios poliméricos y matriz extracelular.

Por ejemplo se ha desarrollado [18] un biorreactor para la generación de tejido tridimensional. Para este se diseccionaron venas y arterias que sirvieron como base para el crecimiento de vasos sanguíneos, estos se recubrieron con células endoteliales y se demostró que manteniendo el sistema con perfusión constante se adhieren bien las células además que se formaban nuevos vasos

En la siguiente figura 5.1 se puede ver la estructura del sistema que utilizaron , este consiste en un sistema de flujo a través de una bomba peristáltica y un reservorio de medio el cual está conectado a un sistema de mezcla de gases que ayudan a mantener el pH del sistema. El tejido se encuentra en una cámara y se conecta al sistema de perfusión a través de la arteria con salida en la vena.

También se ha desarrollado un sistema específico para tejido cardíaco [19], este fue diseñado para mimetizar los estímulos eléctricos y mecánicos naturales del corazón, se probó con un andamio en base a un elastómero de poliglicerol que fue cultivado con células neonatales de rata. En sus resultados encontraron que la aplicación de estímulos, en conjunto con la perfusión

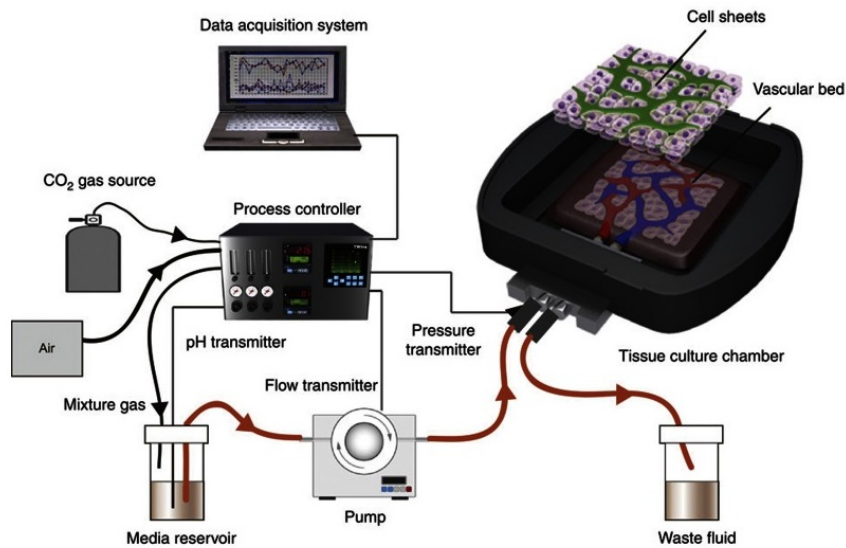


Figura 5.1:
Esquema de biorreactor para tejido vascular. [18]

continua se obtiene un tejido con mayor densidad celular comparado con los andamios a los que solo se les aplico perfusión.

Otro ejemplo es un un biorreactor enfocado al cultivo de válvulas cardiacas [20], en particular su diseño se enfoca en manejar las condiciones de flujo necesarias para replicar los parámetros mecánicos a las que una válvula funciona bajo condiciones fisiológicas. Además de la bomba peristáltica, se agregó un actuador lineal que genera un estímulo mecánico sobre el tejido. El reactor fue probado con una válvula construida en base a un biopolímero y sembrada con células madre derivadas de médula espinal. Como resultado encontraron que las variaciones de frecuencia en el flujo estaba relacionada con la cantidad de colágeno que generaban las células sobre la matriz polimérica.

Otro biorreactor similar se construyo para la producción de parches cardiacos [21], similar al anterior, usa células madre de rata cultivadas sobre un elastómero, el sistema tiene flujo por perfusión y se aplica un estímulo por medio de un actuador lineal durante el proceso, particularmente en este modelo, encontraron que la estimulación mecánica contribuía con la diferenciación de las células a cardiomiocitos.

Uno de los principales problemas a resolver, es el transporte de tejido al sitio de implantación sin que se degrade. Se ha desarrollado un biorreactor portátil para tejido cardiaco [22], este funciona con una micro bomba de per-

fusión basada en actuadores piezoeléctricos que proporciona los nutrientes necesarios con una solución oxigenada, además de esto utiliza micro electrodos de carbono con los cuales puede generar estímulos eléctricos sobre el tejido.

Otra variación de un biorreactor es agregando un sistema de perfusión pulsátil. La idea sobre este tipo de sistema, es imitar el tipo de flujo que se produce con los latidos del corazón. De este tipo se ha construido un sistema que utiliza un actuador solenoide sobre la manguera de flujo para generar pulsos [23], este se probó cultivando tejido con cardiomiocitos, las células cultivadas bajo flujo pulsátil mostraron una mayor elongación comparadas con las células sometidas de flujo constantes.

Otro posible diseño es el de vasija rotatoria, como se ve en la imagen 5.2 (A), consiste en un contenedor cilíndrico colocado de forma horizontal que va unido a un sistema de rotación, el movimiento provoca que las células se distribuyan de forma más uniforme a lo largo de todo el andamio, el cual está colocado sobre una barra cilíndrica en el centro.

Finalmente, se encuentra una novedosa variación del diseño rotatorio usando un contenedor esférico a través de 3 actuadores rotatorios [24] figura 5.2(B), este se utilizó para el cultivo y crecimiento de válvulas cardiacas sembradas con miofibroblastos, y se observó que tenían adherencia sobre diversas capas sobre el andamio principal de forma muy uniforme.

5.2 Biorreactores para órganos completos

El cultivo de válvulas y otros tejidos aislados, se ha probado incluso en fases clínicas, sin embargo las partes de órgano u órganos más complejos aun no se han explorado a profundidad.

Tal vez el principal reto que se presenta al pasar de tejidos a órganos completos, es lograr alimentar el sistema vascular completo para hacer llegar nutrientes a todas las capas celulares. Se han comenzado a construir biorreactores diseñados para alimentar órganos altamente vascularizados [25], principalmente se han enfocado en generar sistemas de perfusión con un control de flujo para poder manejar el proceso de descelularización y el proceso de recelularización con el mismo equipo.

Uno de los laboratorios más avanzados en el desarrollo de la técnica de descelularización es el equipo de Ott de Harvard, en esta institución se han realizado pruebas con corazones humanos haciendo el proceso de descelularización y recelularización. Con sus métodos, han obtenido, un tejido grueso y parcialmente vascularizado, con contracciones visibles, el sistema para el octavo día del experimento lograba producir funciones de bomba con la ayuda de estimulación eléctrica [26]. Aunque no se reportan los de-

5.2. Biorreactores para órganos completos

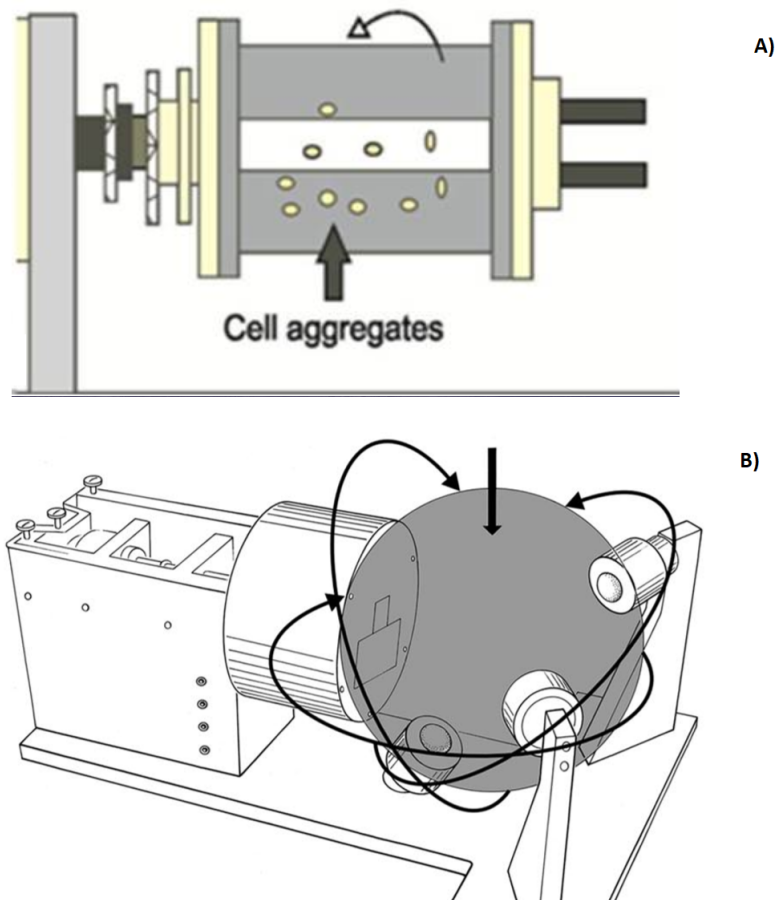


Figura 5.2:

Esquema de biorreactor rotatorio, en este sistema las células se van agregando hacia el centro. [24]

talles específicos del funcionamiento de su reactor, se menciona que tienen sistemas de perfusión por bombas peristálticas, sistemas de control de temperatura y gases, además de sistemas para estimulación eléctrica.

Los detalles de un biorreactor desarrollado por el laboratorio Hulsmann fue publicado, este fue diseñado para dar soporte a órganos completos, como corazón [27]. En este diseño se tiene una perfusión continua controlada, y un sistema para estimulación mecánica de los ventrículos por medio de un globo de polímero unido a una cánula que genera presión sobre las paredes del órgano, como se puede observar en la figura 5.3 (A), en este diseño también se incluye un sistema de control de gases.

Un punto recalcar del diseño de Hulsmann es que esta planeado para que el equipo sea modular, de forma que se puedan agregar distintos módulos en

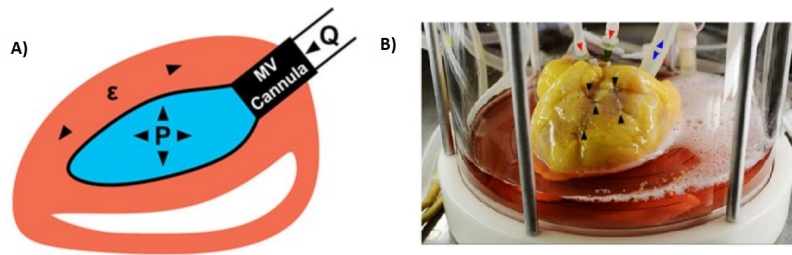


Figura 5.3:

A) Esquema de globo unido a cánula que genera presión sobre las paredes del corazón generando un estiramiento de las mismas. B) Cámara de biorreactor con el corazón conectado a las bombas de perfusión y cánula para estímulo mecánico. [27]

un futuro, por ejemplo para medir señales electrofisiológicas u otro tipo de estímulos. Utilizaron LabVIEW® como sistema de control de los diversos módulos.

Otro ejemplo de biorreactor es el desarrollado por el equipo de Uzarski [28], este fue diseñado para dar soporte vital a hígado y riñón, y puede realizar muestreo de marcadores bioquímicos. Un componente novedoso en su configuración es el uso de un transductor de presión que permite medir con exactitud la presión de flujo. En sus experimentos usaron una matriz extracelular de rata que poblaron con células xenogénicas humanas, además de que obtuvieron una buena densidad celular, se mostró que fue posible medir el flujo de biomarcadores de forma no invasiva usando una cámara de muestreo.

5.3 Sistemas comerciales de transporte

Además de los sistemas para cultivo de tejido, descelularización y recelularización de órganos, otro tipo de sistemas que cumple con objetivos similares de dar las condiciones adecuadas para órganos, son los sistemas de cuidado de órganos, estos están diseñados principalmente para realizar el transporte de órganos de donadores hacia los hospitales donde se le implantara al receptor, su principal propósito es aumentar el tiempo que puede permanecer fuera del cuerpo y evitar que se degraden o contaminen durante el proceso, además que dan un tiempo extra a los médicos para evaluar con mayor cuidado si el órgano es adecuado para su uso.

La empresa Organ Recovery Systems (ORS), ha desarrollado dos contenedores para estos propósitos, uno para hígado y otro para riñón [17]. Sus sistema consiste en una cámara estéril aislada herméticamente, la cual perfunde el órgano con una solución fría de nutrientes para mantener más

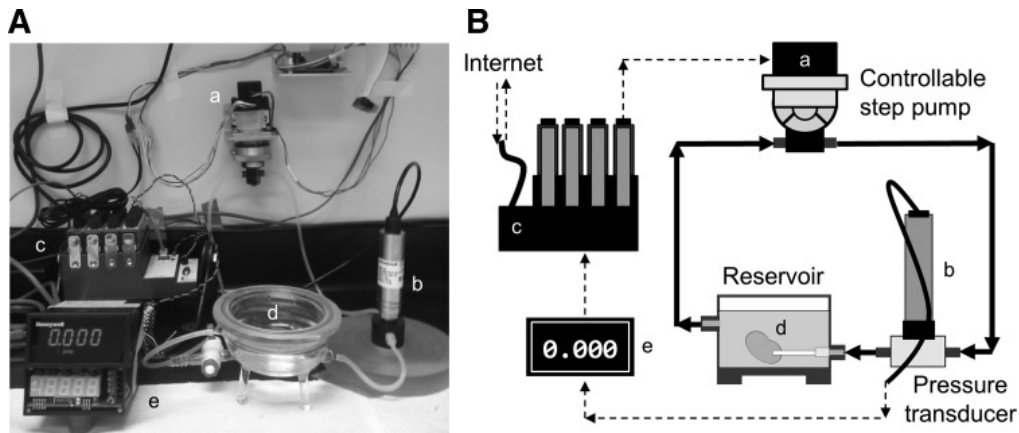


Figura 5.4:

Esquema de biorreactor para hígado y riñón. a) Sistema de perfusión pro una bomba con motor de pasos, b) Transductor de presión del flujo, c) Sistema de adquisición de datos del sensor, e)Reservorio hermético de cristal, e) Modulo de acondicionamiento de señal . [28]

tiempo viable el órgano. De acuerdo a sus investigaciones [29], se encontró que además de mantener el órgano en estado de hipotermia como se hace usualmente, al agregar un sistema de perfusión, la vida de estos se extiende evitando el deterioro del tejido, además en un seguimiento a los pacientes trasplantados se encontró una ligera mejoría de 1.08% en el índice de supervivencia de tejido [30].

En la imagen 5.5, se puede observar los transportadores para riñón e hígado respectivamente, estos tienen un tamaño compacto y pueden funcionar con baterías, además incluyen un panel de datos donde se puede observar algunos parámetros de control del sistema como temperatura, tasa de flujo y presión vascular.

Otra empresa que ha diseñado este tipo de sistemas es Transmedic [31], en su caso tienen un sistema comercial para transportar corazones y uno para pulmones. En general sus sistema contiene un control de temperatura, y al mismo tiempo tienen un sistema de perfusión que inyecta constantemente una solución tibia oxigenada y rica en nutrientes, todo el sistema esta montado sobre un carrito portátil que incluye baterías y puede mantener un tiempo de autonomía hasta de 48 horas, el conjunto también incluye una pantalla que despliega los signos vitales y ayuda a monitorear los diversos parámetros que pueden afectar al órgano. Además de los dos sistemas que ya comercializan, en sus sitio web mencionan que se encuentran en fase clínica para un sistema de transporte de riñón. Cabe destacar que a diferencia del sistema que propone ORS, los sistemas de Transmedic trabajan en estado normotérmico.

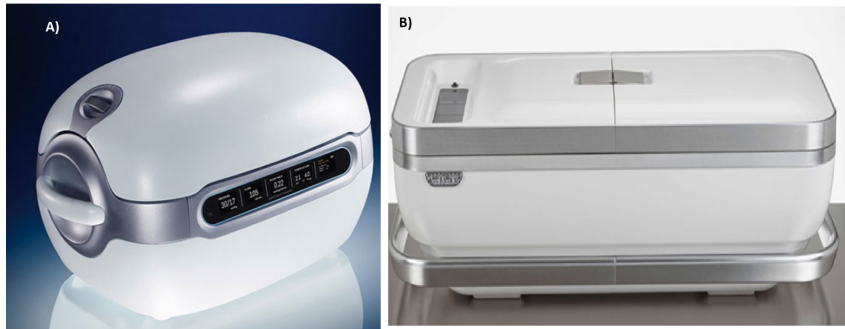


Figura 5.5:

A) Sistema de transporte para riñón B) sistema de transporte para hígado.
[17]

Previo a la comercialización, Transmedic realizó diversos estudios clínicos [32] [33], por ejemplo se reporta un caso donde el corazón se mantuvo viable durante 10 horas en contraste con las 3-4 horas que puede permanecer en hielo, además se trasplanta exitosamente [34]. Por otro lado se realizó un estudio donde se demostró que el uso de estos sistemas aumentó el número de órganos que podían ser usados después de la extirpación del donador [35].

En la figura 5.6, se puede observar el sistema de transporte para corazón (A) y el sistema para pulmón (B), en ambos casos los órganos viajan dentro de una bolsa estéril que ayuda a mantener constantes las condiciones de humedad y temperatura, además es posible adaptar monitores de signos vitales para asegurar el estado de los órganos.

5.4 Compilación de características

Tomando en cuenta la revisión anterior, las características que se han encontrado en general en los biorreactores y sistemas de transporte son las siguientes:

- **Flujo:** Todos los sistemas tienen un elemento de control de flujo en base a bombas peristálticas.
- **Temperatura:** Casi todos los sistemas tienen un sistema de control de temperatura, este puede ser normotérmico o hipotérmico.
- **Sistema de muestreo:** solo en pocos casos se tiene un sistema de muestreo para monitorear los análisis de las soluciones.
- **Portabilidad:** Algunos mostraron casos de portabilidad donde se puede mover el órgano o tejido para mantenerlo en condiciones hasta el momento de ser trasplantado.

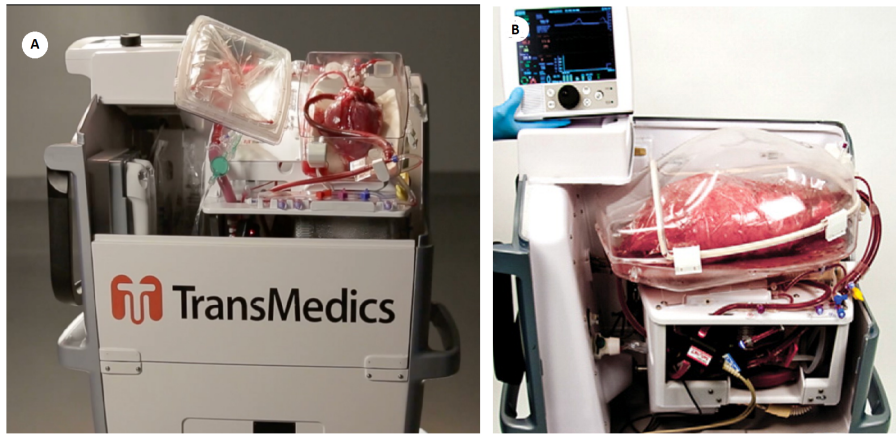


Figura 5.6:

Sistemas de transporte de órganos Transmedic. A) Sistema de transporte para corazón B) sistema de transporte para pulmones. [17]

- **Sistema de flujo pulsátil:** Algunos modelos proponen un sistema pulsátil, sobre todo en corazón y vasos para mimetizar las condiciones de flujo biológicas.
- **Estimulación eléctrica:** Algunos incluyeron electrodos de carbono para poder realizar estimulación eléctrica en tejido cardiaco.
- **Estimulación mecánica:** Se utilizaron actuadores lineales y globos para dar un estímulo mecánico a vasos, ventrículos y válvulas cardiacas.
- **Rotación:** Se proponen sistemas de rotación para mantener una distribución celular homogénea, principalmente al cultivar tejido.
- **Control de humedad:** Se utiliza para mantener el órgano bien hidratado y evitar que se desecue.
- **Medición de presión:** Se utiliza un transductor de presión sobre el flujo, o un sistema para medir la presión sobre los vasos.
- **Modular:** En un caso se propone un sistema de control modular el cual puede expandirse para agregar nuevos sensores o actuadores.
- **Sistema de control de gases:** Se monitorea y se inyectan las proporciones adecuadas de CO₂ y oxígeno.
- **Monitor de pH:** En un sistema se integro un electrodo para monitorear el pH de la solución de perfusión.

Diseño del biorreactor

6.1 Diseño básico

En base a las revisiones hechas para el prototipo del presente trabajo se decidió diseñar el biorreactor a una escala pequeña enfocado a trabajar con órganos o tejido cardiaco de conejo, la idea es, a corto plazo, realizar pruebas en un inicio sobre el ventrículo izquierdo de un corazón y eventualmente sobre el órgano completo. Se eligieron las siguientes características para una primera versión del biorreactor:

- **Sistema de gases:** Sistema para inyectar CO₂ y Oxígeno a la solución.
- **Control de temperatura:** Sistema de control de temperatura normotérmico.
- **Control de flujo:** Sistema para el control de la circulación de solución de alimentación en el órgano.
- **Monitoreo de humedad:** Sensor para revisar la humedad al interior del biorreactor.
- **Diseño modular:** Arquitectura que permite quitar o agregar módulos.

En la imagen 6.1, se puede observar un esquema general del funcionamiento del biorreactor.

El sistema se compone de un reservorio de control en el cual se puede intercambiar solución de alimentación fresca y se espera en un futuro se pueda realizar manualmente el monitoreo de pH y algunos análisis. El reservorio tiene un control de temperatura normotérmico y se puede medir el nivel de llenado por un sensor de masa, además contiene un sistema para inyección de aire y CO₂, y sensores para medir la concentración de CO₂.

El contenedor de reservorio esta conectado a dos bombas peristálticas, las cuales sirven para poder vaciar y rellenar la solución de alimentación, esto

6.2. Selección de componentes

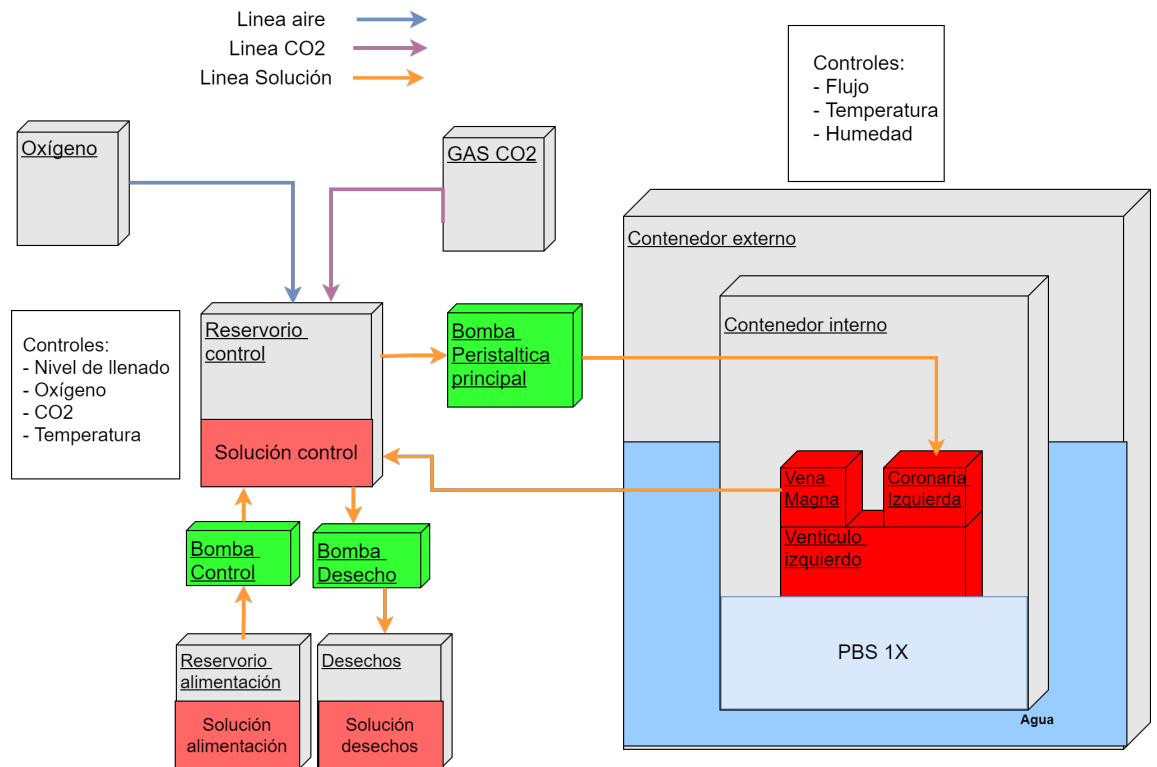


Figura 6.1:
Esquema básicos general del biorreactor

evita que haya que destaparlos, lo que ayuda a mantener la humedad, temperatura y el ambiente estéril al interior.

Por otra parte hay una cámara térmica que contendrá el tejido u órgano en su interior, esta se compone de un contenedor externo relleno de agua que servirá como aislante térmico y a su vez ayudará a mantener elevada la humedad dentro dentro de la cámara, al interior del contenedor externo se encuentra un contenedor interno donde estará el órgano, este se llenará con PBS 1X (buffer de fosfato salino) para mantener la humectación.

Entre el reservorio y la cámara del órgano, se encuentra un sistema de control de flujo basado en una bomba peristáltica, esta sirve para hacer recircular la solución desde el reservorio de control hacia la vena magna y una salida por la coronaria izquierda del ventrículo.

6.2 Selección de componentes

La figura 6.2, muestra el detalle de los componentes elegidos para el biorreactor y como se realizará el esquema de conexiones entre los diferentes

componentes.

6.2.1 Control y comunicación

Como plataforma principal de control y comunicación de los componentes electrónicos se eligió el sistema de arduino, el cual es una plataforma de desarrollo basado en microcontroladores ATmega que sirven para realizar el control digital, se eligió esta plataforma por que es asequible, está disponible en prácticamente todo el mundo, es de código abierto y tiene una comunidad de soporte muy grande, por lo que hay una cantidad inmensa de librerías de interconexión en prácticamente cualquier lenguaje.

Los arduinos son controlados a través de una computadora, y se conectan a través de un HUB USB, cada arduino controla un conjunto de sensores o actuadores a la vez; este esquema permite agregar nuevo módulos hasta un total de 127 arduinos.

6.2.2 Alimentación eléctrica

Todo el sistema está alimentado por una fuente de poder que se alimenta de 120V y da como salida una tensión de 24V, y hasta 15A de corriente, en general todo el sistema funciona a partir de 3 voltajes, 24V, 12V y 5V, para brindar el voltaje necesario a cada uno de los componentes se eligió utilizar el regulador en circuito integrado CN6009 ajustado a los respectivos voltajes necesarios. Todos los componentes se eligieron en base a este voltaje para que el biorreactor tenga la capacidad de funcionar opcionalmente con baterías, lo cual permitirá, eventualmente, hacerlo portátil.

6.2.3 Temperatura

Para medir la temperatura de las diferentes soluciones se eligió el sensor DS18B20, el cual es un termistor con un circuito integrado que transduce y acondiciona la señal de temperatura con una salida digital. La temperatura y humedad ambiental dentro de la cámara del órgano, se registraron con el sensor digital DHT22. Adicionalmente se eligió un tercer sensor infrarrojo de temperatura el cual puede realizar las mediciones sin entrar en contacto directo con el objeto, en este caso se utilizaría para medir directamente la temperatura del ventrículo.

Para brindar una temperatura de aproximadamente 37°C, se usaron resistencias cerámicas que funcionan a 12V, estas pueden ser reguladas a través del circuito L298N el cual es un driver para control de voltaje DC que se puede conectar a alguna de las salidas análogas del arduino. Se usaron 2 resistencias para la cámara principal y una para la cámara del reservorio de control.

6.2.4 Control de flujo

El control de flujo se realizará en base a 3 bombas peristálticas, se eligieron 3 bombas DC con una capacidad de bombeo de aproximadamente 200 ml/min, éstas pueden ser controladas por el driver L298N que se conecta a una salida analógica del arduino. Para las pruebas iniciales se planea utilizar mangueras de silicon de grado alimenticio, aunque las bombas soportan de igual forma manguera BPT Pharmed, un elastómero biocompatible de grado clínico.

Para el sistema de flujo entre el reservorio y el órgano, se utilizo una bomba de doble cabeza a 12V, esta permite tener un mejor control del flujo y puede programarse para cambiar el ritmo de flujo, o hacerlo de forma pulsada. Para la bomba de relleno y desecho se usaron bombas peristálticas simples de 12V.

En el sistema de resistencias para temperatura y el de potencia de las bombas, se requirió un sistema de disipación con dos ventiladores de 12V para evitar sobrecalentamiento por el alto de consumo de energía de estos elementos.

6.2.5 Control de gases

El sistema de control de gases consiste en un sensor de CO₂ modelo KG033 con un rango de 0 a 100,000 ppm, este tiene embebido un sensor de temperatura y humedad para realizar una compensación interna, este sensor se planea implementar para mantener la concentración de CO₂ a aproximadamente un 5%.

Para el suministro de gases se tiene una bomba de aire con un filtro para partículas, además se maneja un tanque de CO₂ de 9kg, en ambos casos el flujo de salida es controlado a través de válvulas solenoides de 12V que pueden ser controladas con la salida digital de los arduino.

6.3 Diseño de módulos

Como se mencionó anteriormente, se le ha dado una gran importancia para hacer que el biorreactor sea un sistema modular, donde se puedan agregar y quitar módulos, de forma que en un futuro pueda adaptarse ante cualquier elemento que sea necesario incluir.

Dentro del biorreactor consideraremos como módulo a cada arduino con el conjunto de sensores o actuadores, en la figura 6.3, se muestra el esquema un módulo general. Cada módulo estará contenido en su propia caja, la caja por la parte posterior tiene una conexión USB para conectar el arduino hacia

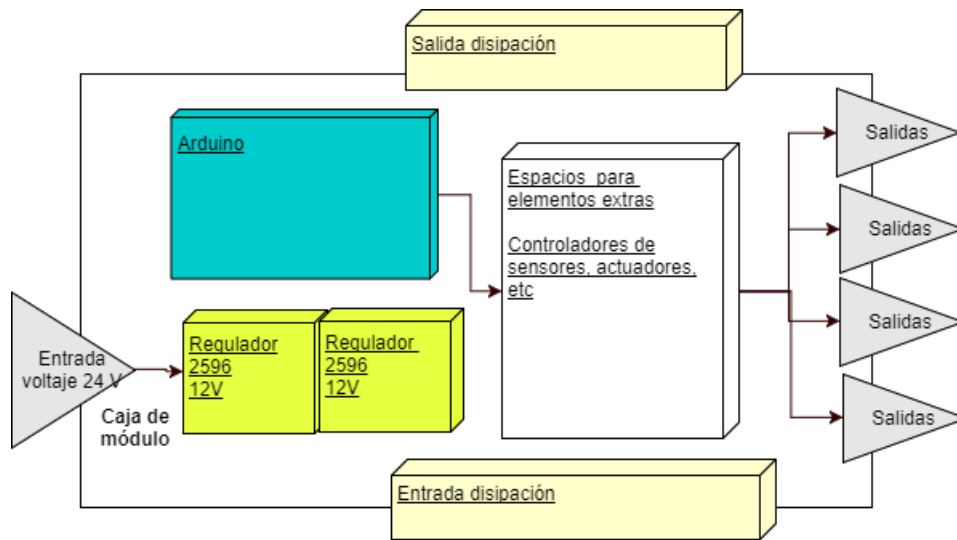


Figura 6.3:

Esquema de componentes que incluye cada módulo.

el concentrador USB que va a la computadora, además tiene una entrada de voltaje para para alimentar los elementos internos que sean necesarios.

En la parte interior tenemos al arduino, y se tiene espacio para colocar hasta dos reguladores de voltaje, lo que permite suministrar hasta 3 voltajes diferentes a los diferentes componentes, la mitad de la derecha es un espacio que esta reservado para colocar otros componentes adicionales, como pueden ser drivers para sensores y actuadores, o sistemas de acondicionamiento y/o transducción de señales.

En los costados de la caja, a la altura de los componentes se incluyen ranuras para disipación, sobre las que se puede montar un ventilador para poder evitar el sobrecalentamiento en el interior. En la parte frontal de las cajas se incluyen ranuras para conectar las salidas hacia actuadores y las entradas de sensores, la idea es que los sensores y actuadores que van conectados en la recámara del órgano y el reservorio se pueden desmontar de forma que el sistema sea fácil de transportar o almacenar cuando no esta en uso.

Se han considerado los siguientes 6 módulos para contener los componentes elegidos en la sección anterior:

- **Módulo de bombas:** Como componentes incluye 3 driver L298N, un ventilador para disipación y una fuente de voltaje para poder suministrar 12V a las bombas.
- **Módulo de resistencias:** Este contiene 3 drivers L298N que alimenta a las 3 resistencias necesarias para controlar la temperatura, además incluye un ventilador que disipa el calor y un regulador ajustado a 12V.

- **Módulo de sensores de temperatura en líquido:** Este incluye las entradas para los 3 sensores DS18B20 que se requieren para medir la temperatura en el líquido del contenedor del órgano y del reservorio de control.
- **Módulo de temperatura y humedad:** Incluye entrada para el sensor DHT22 que monitorea la temperatura y humedad ambiental dentro del contenedor del órgano. También se incluye el sensor IR para monitorear la temperatura del órgano.
- **Módulo sensor CO2:** Este incluye la entrada para el sensor de CO2 y una regulador de voltaje ajustado a 12V.
- **Módulo para interruptores de gases:** Contiene 2 relevadores para controlar las válvulas solenoides para abrir el paso de gas CO2 y de aire.

6.4 Diseño de estructura

6.4.1 Contenedores biorreactor

La figura 6.4, muestra un esquema de los contenedores del biorreactor para el órgano y para el reservorio de control. Ambos consisten en un contenedor de vidrio cerrado herméticamente, a su vez dentro de este contenedor se encuentra uno segundo, más pequeño, donde se coloca el órgano y la solución de alimentación. Los contenedores más pequeños están cubiertos de agua hasta una altura aproximada del 40% y dentro del agua se encuentran dos resistencias cerámicas de calentamiento y dos sensores de temperatura.

Para el caso del contenedor del órgano al interior se encuentra el sensor de temperatura y humedad DHT22 suspendido dentro del contenedor mayor. Al interior del contenedor menor se encuentra el órgano cubierto en solución de PBS 1X, suspendido, sobre este, se encuentra el sensor infrarrojo de temperatura, este se colocará suspendido a una distancia de 4 cm del órgano sin entrar contacto directo.

En el contenedor del reservorio, se encuentra el sensor de CO2 K33, suspendido sobre el contenedor grande, el frasco más pequeño contiene la solución de alimentación, sobre este se conectan la bomba de aire y la línea de flujo de CO2, estas se sumergen en el contenedor líquido de forma que no llegue el gas directamente al contenedor y se encuentre con una distribución más uniforme.

6.4.2 Caja de componentes electrónicos

Con el propósito de obtener cajas compactas, que se adaptaran a la medida de los componentes que se eligieron, se llevo a cabo el diseño una caja para contener cada conjunto de componentes que forman los módulos, en

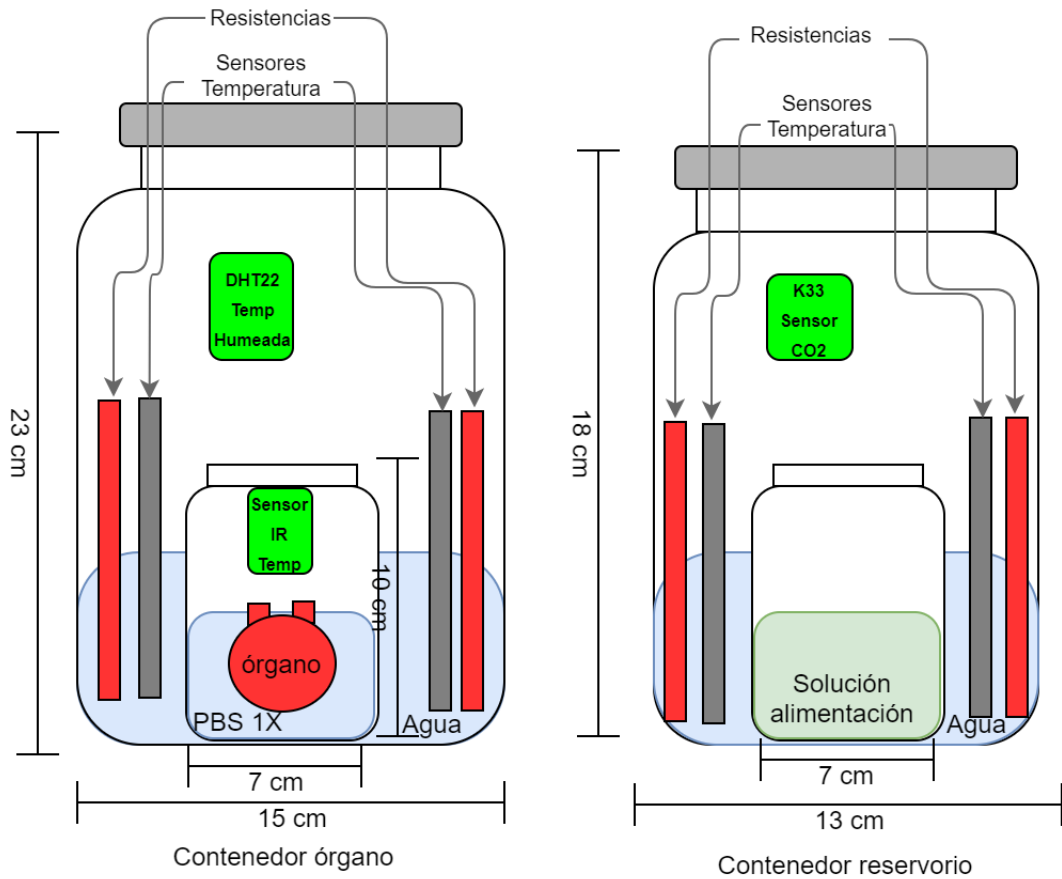


Figura 6.4:
Diagrama de contenedores para el órgano y reservorio de control.

la figura 6.5, se puede ver el esquema. Estas miden 35mm de alto x 120mm de ancho y 160mm de largo.

En la parte posterior se presentan dos ranuras, una sirve para la salida de la conexión USB del arduino y la segunda para la entrada de voltaje de 24V que sirve principalmente para alimentar los reguladores de cada módulo. Al frente de la caja se observa 3 ranuras donde salen los cables para realizar la conexión con los componentes externos como sensores y actuadores. Por la parte lateral se tienen dos espacios que sirven para montar un ventilador y generar un túnel de aire que disipa el calor de los componentes que más energía utilizan.

En las parte frontal y posterior de la caja se incluye un diente de sujeción con las medidas adecuadas para fijarse en la ranura de la caja de arriba, es decir las cajas de los componentes son apilables, por lo que se pueden almacenar

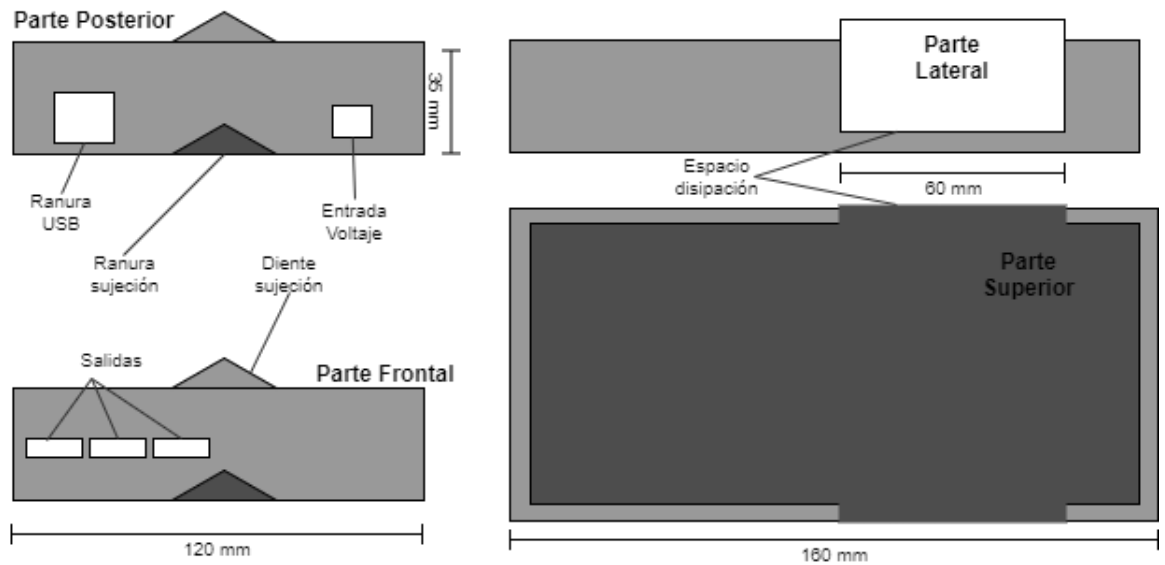


Figura 6.5:

Diagrama de la caja para almacenamiento de módulos electrónicos.

y transportar de forma más sencilla.

6.5 Diseño de control electrónico

El sistema de control electrónico es el encargado de realizar la interfase entre el sistema de control en la computadora y los componentes que se encuentran en el biorreactor como son sensores y actuadores. El desarrollo de este sistema se realizó en NodeJS [36], se eligió este entorno debido a que es uno de los entornos con menos barreras de entrada para aprender, tienen un buen soporte de la comunidad y principalmente por que tiene una programación nativa asíncrona que es ideal para programar los componentes basados en eventos.

Por otro lado para la interfase con los componentes electrónicos se eligió la plataforma Arduino [37], esta es entorno de control de microcontroladores más extendido en el mundo, es de código abierto y tiene un precio asequible, por otra parte cuenta con las características técnicas adecuadas para poder manejar todos los sensores y actuadores de forma adecuada y con poco o ningún acondicionamiento extra.

Dentro de NodeJS se implementó una librería para el control de comunicación entre Computadora-Arduino-Componentes, este sistema se nombro ReBot, y tiene las siguientes características:

- **Asíncrono:** Funciona de forma asíncrona de forma que si un proceso llega

a bloquearse o tener un error, los demás pueden continuar y realizar rutinas de emergencia o reparación.

- **Componentes independientes:** Cada componente tiene una programación independiente y se ajusta de acuerdo a los estados centrales del sistema, es decir el conjunto se comporta como una máquina de estados.
- **Webservice integrado:** Se tiene integrado un API REST (interfaz de programación de aplicaciones) por lo que la interacción con los componentes se puede realizar a través de cualquier interfaz que maneje este protocolo a través de internet.
- **Flujo de datos reactivos:** Tiene un flujo de datos reactivo, por lo que los datos se propagan a través de todos los componentes conforme se van generando.

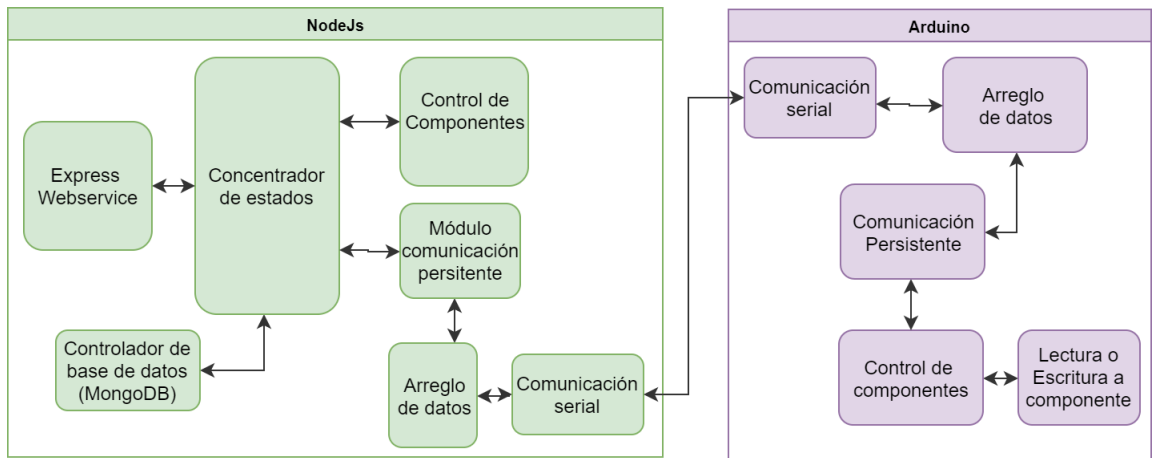
6.5.1 Arquitectura ReBot

En la imagen 6.6, se observa un esquema de la arquitectura y funcionamiento del sistema ReBot. Este consiste en dos partes principales, el sistema de control de estados programado en NodeJS que se ejecuta dentro de la computadora y el sistema de control de componentes que se encuentra en cada uno de los arduinos.

En el centro del sistema de control de estados se encuentra un concentrador de estados, este es el encargado de almacenar, recibir y distribuir el estado de cada uno de los componentes a todos los elementos del sistema. Toda la información se va almacenando en la base de datos, para esta se eligió MongoDB, ya que tiene un driver directo con NodeJS y existen varias implementaciones conjuntas entre el back-end y front-end para la comunicación reactiva.

Los cambios en los estados de los componentes provienen de tres fuentes, la primera es el sistema de control de componentes, que es el módulo donde se programa el control general del biorreactor y las respuestas que este debe tener, por ejemplo si el control recibe el dato que la temperatura y esta es mas baja de lo deseado, el controlador mandara la instrucción para hacer el cambio e incrementarla. La segunda fuente de cambios son los sensores, conforme las condiciones ambientales puedan cambiar o haber alteraciones, la información de los datos se actualizara y se mandara al concentrador central para redistribuirla.

La tercera fuente de cambios son los servicios web a través del API REST, desde este se pueden dar instrucciones específicas al biorreactor a través de una interfaz visual o desde algún otro sistema; por ejemplo al hacer el biorreactor portable el sistema de control puede requerir que el procesamiento se haga por una computadora más potente, en este caso este con-

**Figura 6.6:**

Esquema de funcionamiento del sistema ReBot.

El control se puede hacer a distancia desde un servidor externo y dar las instrucciones adecuadas a través del API. De igual forma si se requiere hacer un apagado o reinicio de emergencia, este puede realizarse a distancia. Para los 6 módulos que se tienen ahora se requiere una computadora con mínimo 4 GB de memoria RAM, 1 procesador de 1.2 GHz, y un espacio en disco de 16 GB.

La comunicación entre NodeJS y el arduino se realiza por el puerto USB, a través de comunicación serial, los estados que se generan en la computadora y a través del API, se propagan en formato JSON, por lo que no hay que realizar acondicionamiento de datos adicionales y lo que hace que el mantenimiento del código sea más sencillo. Cada vez que se recibe o se envía un dato este pasa por un acondicionamiento o arreglo para traducirlo ya sea de la PC al Arduino o viceversa. Cabe destacar que en los dos extremos se tiene un módulo de comunicación constante, que transmite los datos de ambos extremos cada determinado tiempo.

Dentro de cada uno de los arduinos existe un sistema para controlar sus componentes designados ya sea sensores o actuadores, estos se programan independientemente para cada elemento, por ejemplo existe un control para bombas, otro para resistencias, etc. Cada controlador funciona de forma independiente al sistema, y su respuesta solo depende del estado que se le transmita en cada momento, esto le da mucho mayor rendimiento al sistema, permite programar y predecir mejor el comportamiento del sistema, además como funciona de forma autónoma se pueden generar rutinas de emergencia en caso de que falle la comunicación con el sistema central.

Como se mencionó anteriormente el sistema funciona de forma reactiva, es decir que cada uno de los estados se va propagando a cada uno de los el-

elementos del sistema y a su vez se van almacenando dentro de la base de datos los estados momentáneos a través del tiempo. Otro aspecto relevante dentro de la comunicación es que esta se hace de forma constante, en particular entre cada arduino y la computadora se pueden actualizar los estados cada 20 ms, es decir se puede leer datos de los sensores o enviar estados a los actuadores hasta 50 veces por segundo. Una de las principales ventajas de que los datos se propaguen de esta forma, es que a pesar de que, por alguna razón, exista pérdida de comunicación o paquetes, estos se vuelven a enviar al siguiente ciclo, por lo que se genera un sistema muy robusto ante la pérdida de datos.

El estado de los componentes únicamente depende del dato actual que recibe y del estado anterior, es decir que mientras los datos no cambien el componente continua en su mismo estado, y deja seguir pasando los datos hasta que se reciba un cambio. Por otra parte todo este conjunto de datos se almacena cada 500 ms en la base de datos, este tiempo de almacenamiento es configurable.

En la figura 6.7, se observa el esquema de de propagación de datos, todos los estados de cada uno de los componentes del sistema, se van transmitiendo en un paquete JSON, en este viene el estado actual que tiene el sistema con respecto a una variable y el estado deseado, así por ejemplo si el control de resistencias tiene un estado de temperatura de 25 grados, el control puede actualizar y propagar un nuevo estado que sea la temperatura deseada, por ejemplo 37 grados, al llegar el nuevo estado al componente, ejecutara la rutina adecuada en el caso de las resistencias es encenderse a una potencia máxima para alcanzar la temperatura deseada.

6.5.2 Arquitectura general

La imagen 6.8, muestra a detalle la arquitectura de todo el sistema de control electrónico en su conjunto. En la parte central se tiene una computadora PC que contiene el controlador ReBot, cabe destacar que el sistema es muy flexible, ya que está programado sobre NodeJs, el cual genera una máquina virtual (VM V8JS) en el dispositivo donde se instala, sobre la cual se corre el controlador que está en lenguaje JavaScript, por lo que puede adaptarse a cualquier hardware compatible con ARM, X86 o X64, una vez instalado el firmware ReBot en el arduino, la comunicación se hace de forma serial a través de la librería que proporciona NodeJs, por lo que el sistema puede correr desde una PC de escritorio, laptop, hasta una Raspberry Pi, el sistema se puede adaptar dependiendo del rendimiento y portabilidad que se requiere.

Al iniciar el sistema, se activa un servidor que expone una serie de servicios web que son accesibles a través del estándar API REST, por lo que los esta-

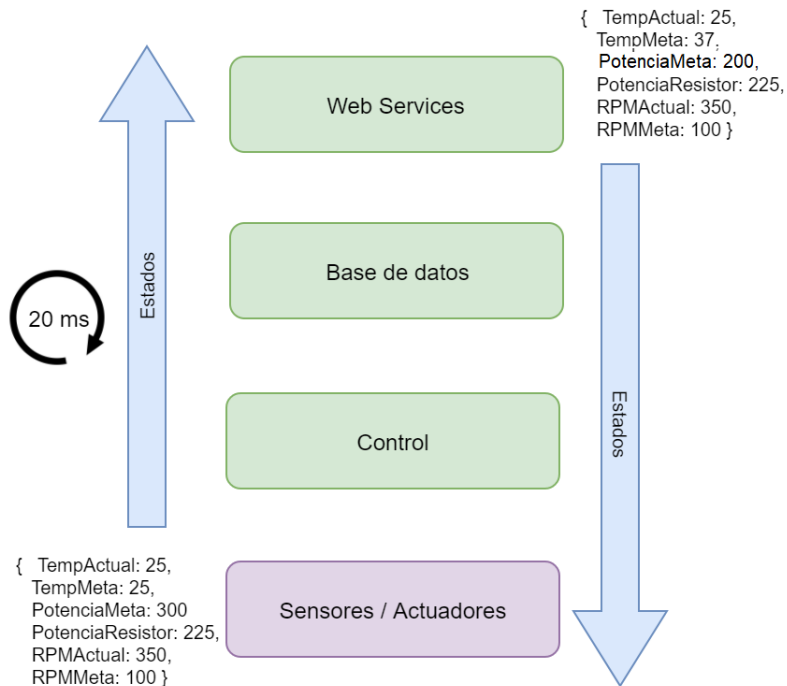


Figura 6.7:

Esquema de flujo de información de forma reactiva.

dos del sistema pueden ser leídos o modificados por una interfase local o igualmente de forma remota a través de internet.

La computadora se conecta hacia un HUB USB, lo que hace expandible el sistema, ya que de requerir quitar o agregar componentes estos solo se deben conectar o desconectar, y si se supera el número límite actual, basta con agregar otro HUB para extender el número de puertos hasta un total de 127 componentes. Cada Arduino dentro del sistema representa un módulo que puede controlar uno o varios componentes, para optimizar el control de los módulos, por ahora este grupo de componentes pueden ser solo sensores o actuadores, es decir que cada módulo actúa como un sistema para enviar o recibir estados, pero no ambos.

6.6 Diseño del sistema de control

En el biorreactor es necesario controlar 3 variables para brindar las condiciones mínimas necesarias para extender la vida del órgano o tejido que se coloque al interior del sistema, a continuación se describe de forma general el funcionamiento de los sistemas de control.

6.6. Diseño del sistema de control

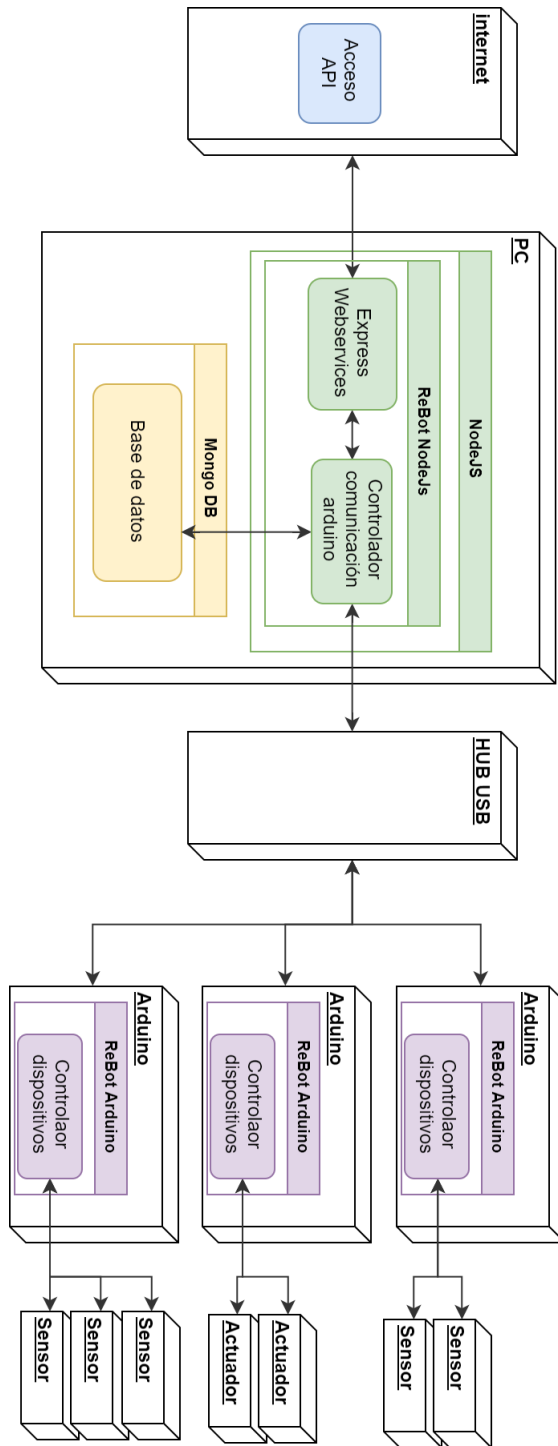


Figura 6.8:

Diagrama general del sistema de control electrónico.

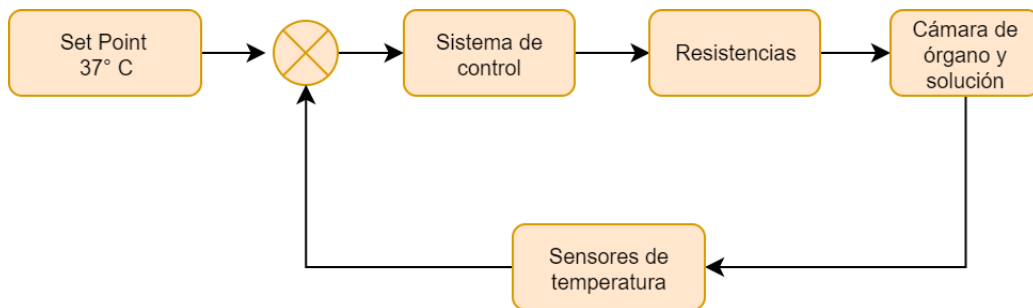


Figura 6.9:

Diagrama del control de temperatura en lazo cerrado.

6.6.1 Control de temperatura

El sistema de temperatura conserva un ambiente normotérmico en todo el sistema, por un lado mantiene tibia la solución de alimentación en el reservorio de control, y también mantiene la temperatura en la cámara del órgano donde se monitorea la temperatura ambiente y la temperatura directa sobre el órgano o tejido.

Dentro del control para temperatura 6.9, se considera un set point de 37°, a partir de este punto los estados se propagan al sistema de control que maneja las resistencias, estas tienen un control de nivel que puede ajustar su potencia de 1 a 100%. La temperatura se mide a través de los sensores, lo que da la retroalimentación para hacer el ajuste de potencia con cada ciclo.

6.6.2 Control de CO₂

El sistema de control de CO₂ es el que proporciona la cantidad adecuada de este gas al reservorio de control. El objetivo del CO₂ en el sistema es actuar como buffer de pH sobre la solución de alimentación, además de realizar funciones en el metabolismo de las células.

La figura 6.10 muestra el esquema del control de CO₂, para este se considera un set point de 50,000 ppm (concentración de 5%). El sistema de control regula la válvula de CO₂ que permite controlar el flujo hacia la cámara del reservorio, en esta se encuentra un sensor del gas con un rango de funcionamiento de 0 a 100,000 ppm, esta lectura retro alimenta el sistema que hace la corrección adecuada para mantener el flujo correcto.

6.6.3 Control de flujo

El control de flujo, es el encargado de hacer circular la solución de alimentación a través de los vasos sanguíneos del órgano o tejido, esto es

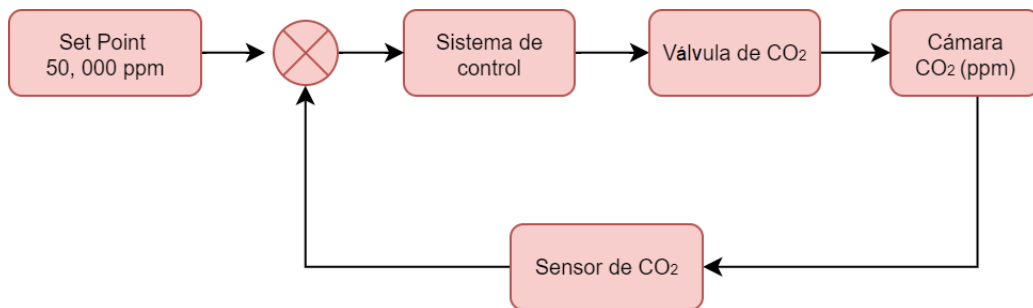


Figura 6.10:
Diagrama del control de CO₂ en lazo cerrado.

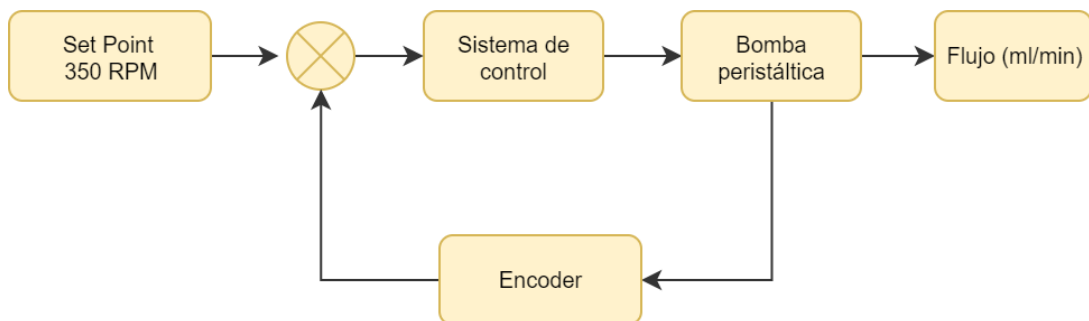


Figura 6.11:
Diagrama del control de flujo en lazo cerrado.

fundamental para mantener a las células nutridas y eliminar desechos de metabolismo.

El esquema 6.11, muestra el diagrama de control para el flujo, en este caso se tienen una medición indirecta del mismo ya que no se cuenta con sensores con la suficiente precisión para medir flujos tan pequeños constantemente, por esto el control se hace en base a las RPM de la bomba, para este se usó un set point de 350 RPM que fue obtenido al caracterizar la bomba, y equivale a 100 ml/min. El sistema de control transmite la señal en forma de intensidad de voltaje a la bomba peristáltica, que puede aumentar o disminuir el flujo, la retroalimentación se realiza a través de un encoder integrado que da el número de RPM.

6.7 Diseño de interfase

En el biorreactor se implementa una interfaz gráfica con algunos controles básicos. Esta fue diseñada para obtener los datos a través del API de ReBot. En la imagen 6.12 se observa el bosquejo de la interfase web. A la izquierda se encuentran los controles básicos, botones de encendido y apagado del

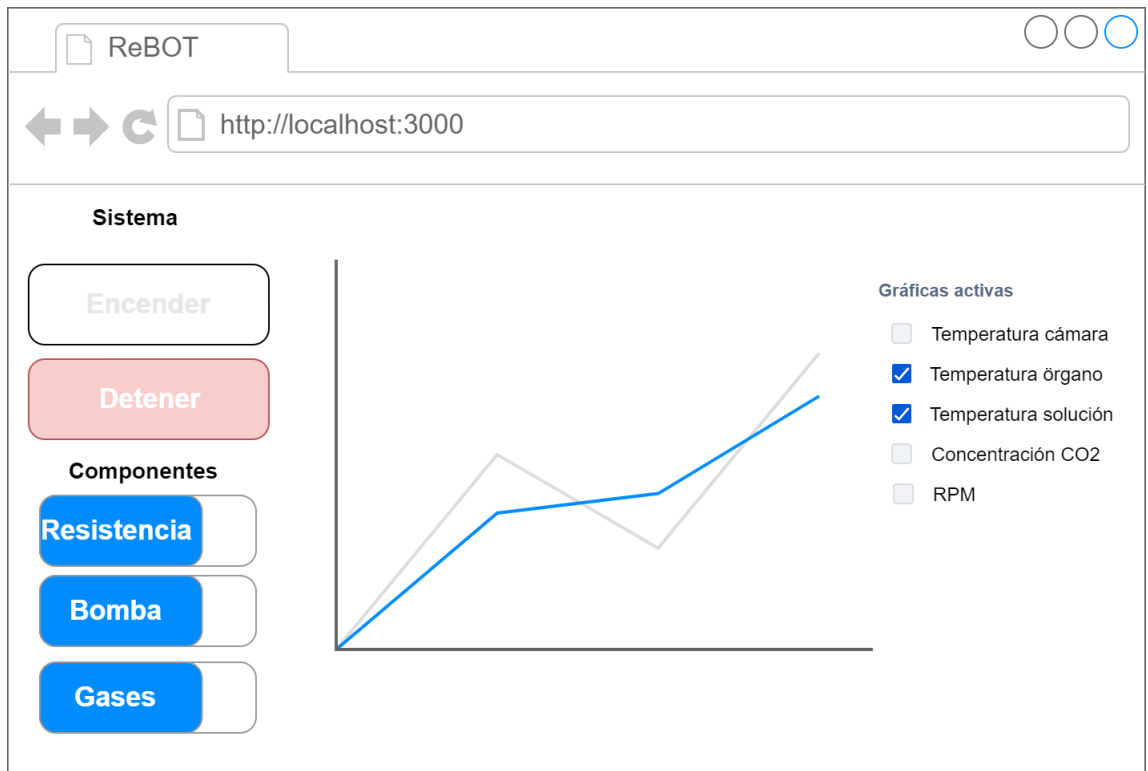


Figura 6.12:
Esquema de la interfase de control web para el biorreactor.

sistema que iniciaran o detendrán todo el conjunto de componentes. En la parte de abajo se encuentran interruptores específicos para encender o apagar elementos individuales del sistema.

A la derecha se encontrará una gráfica que muestre los en tiempo real de los diferentes estados del biorreactor, teniendo una opción de activar o desactivar las diferentes gráficas.

Implementación

7.1 Caracterización de sensores

Debido a la construcción y montaje los diferentes sensores de temperatura, estos pueden tener un comportamiento ligeramente diferente al esperado para la medición, por esto se realizó una comparación con termómetro patrón para ajustar lo mejor posible los sensores y tener medidas estandarizadas entre ellos.

La caracterización se realizó usando como referencia un termómetro de precisión Omega HH501, se utilizó un recipiente con agua destilada que se fue calentando gradualmente de forma lineal y se tomaron simultáneamente los datos del termómetro junto con el sensor.

En el caso los sensores para líquido se obtuvo el resultado en la figura 7.1, se observa que la temperatura en ambos sensores es prácticamente la misma por lo que no fue necesario realizar ningún acondicionamiento sobre los módulos DS18B20.

Para sensor DHT22 (figura 7.2) se observa que la línea de temperatura tiene una pendiente prácticamente igual al termómetro, sin embargo la temperatura es registrada ligeramente más baja, por lo que se hizo el ajuste proporcional que fue de $+0.96\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el sensor.

En el sensor de temperatura infrarrojo IRGY906 (figura 7.3), se muestra una mayor variación durante el registro de temperatura, como este sensor será principalmente usado para el registro y control a temperatura normotérmica, se hizo un ajuste lineal a partir de la temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, se incrementó en $1.87\text{ }^{\circ}\text{C}$.

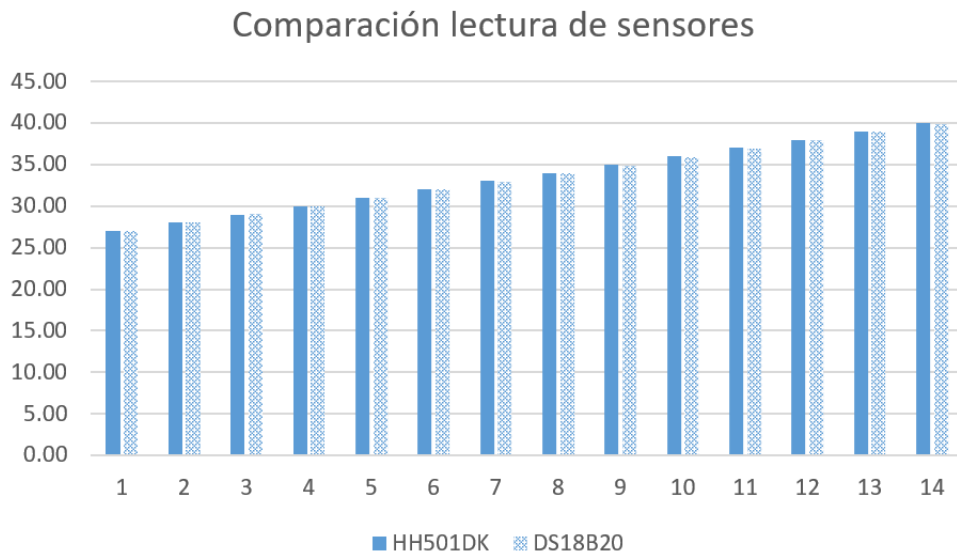


Figura 7.1:
Comparación de sensor de temperatura DS18B20 con el termómetro Omega HH501Dk.

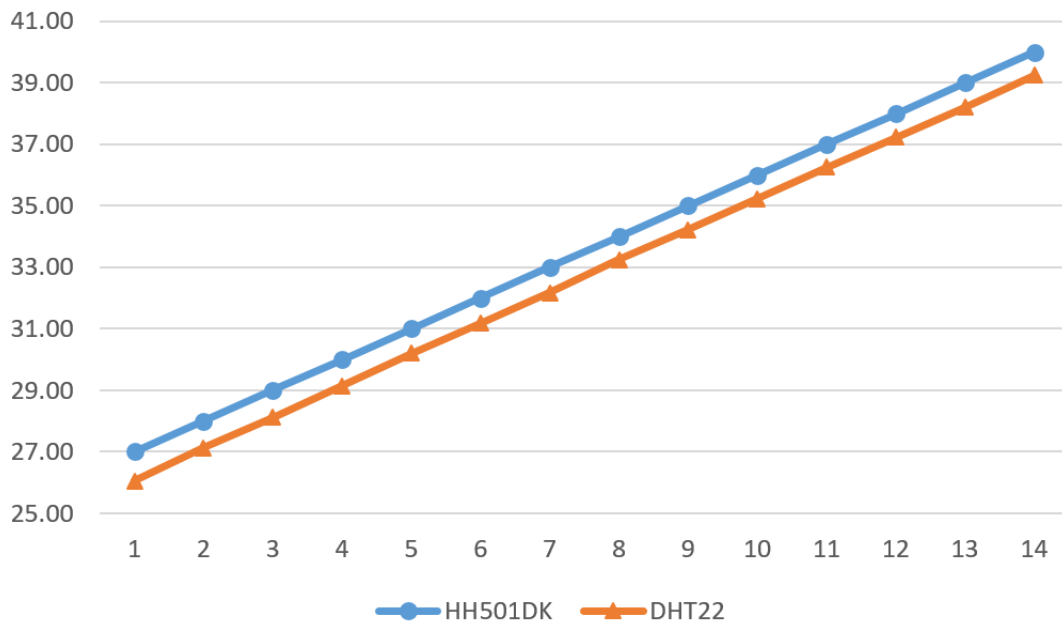


Figura 7.2:
Comparación de sensor de temperatura DHT22 con el termómetro Omega HH501Dk. En este se muestra un error sistemático que fue compensado en la programación.

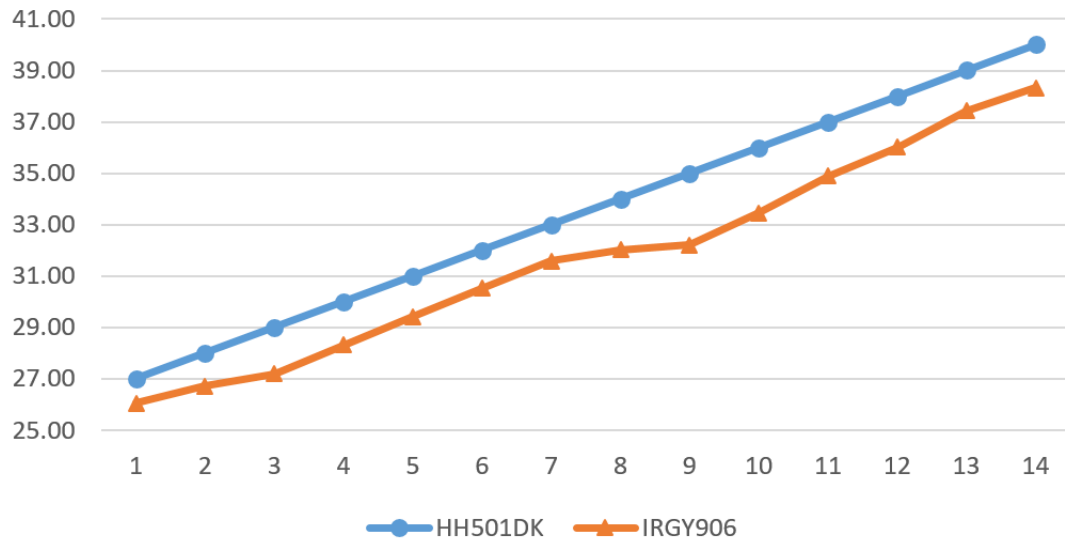


Figura 7.3:

Comparación de sensor de temperatura IR GY906 con el termómetro Omega HH501Dk. En la zona de 35 a 37 grados, el comportamiento es aproximadamente lineal, por lo que se realizó una compensación en el programa.

7.2 Caracterización de actuadores

El flujo que se tiene para este sistema, está pensando en que en un principio será relativamente bajo, por lo que es difícil de detectar con sensores que no tienen contacto con la solución, por otra parte colocar sensores de flujo de contacto aumenta el riesgo de contaminación al estar expuesto directamente a la solución de alimentación, es por estas razones que se decidió no agregar un sensor de flujo, y realizar la medición de este de forma indirecta a través de las RPM de la bomba.

El control en el sistema de flujo, se hizo a partir de un control del motor de la bomba peristáltica para mantener la corriente necesaria que mantiene a su vez un número de RPM determinado, estas son proporcionales al flujo, por lo que se realizó la caracterización de las bombas para medir esta relación. En la gráfica 7.4 se observa el comportamiento de la bomba principal, se estima que para tejido cardíaco de conejo se requiere un flujo menor a los 100 ml/min, ya que es una tercera parte del gasto cardíaco de un conejo macho adulto [38], por lo que la bomba se programó en el modo normal que funciona a 350 RPM, esta velocidad puede ser ajustada posteriormente e incluso pueden crearse rutinas para hacer un flujo pulsátil.

En el caso de las bombas secundarias se observa una menor capacidad en el

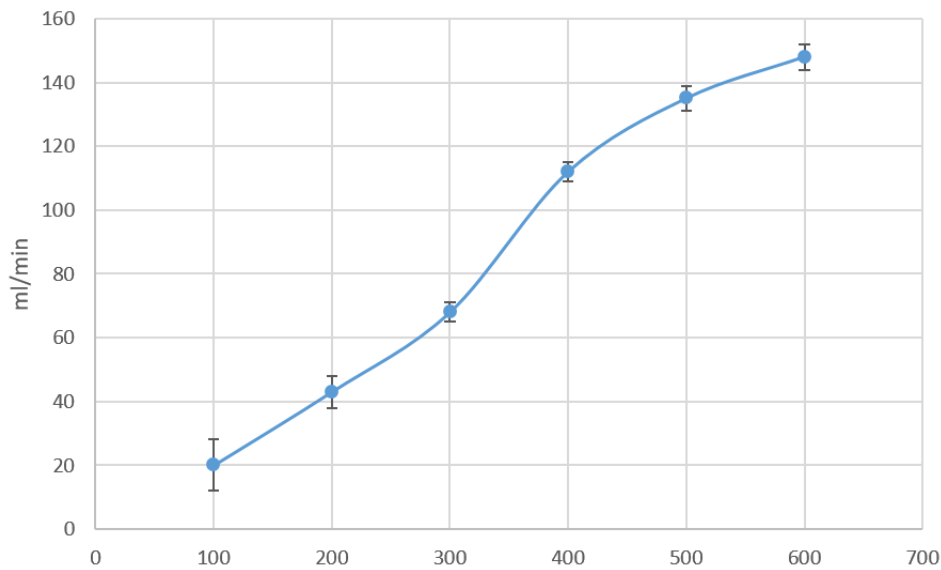


Figura 7.4:

Caracterización de la equivalencia de RPM a flujo ml/min en bomba peristáltica principal (3 pruebas de flujo).

flujo (figura 7.4), estas se utilizarán para rellenar y eliminar desechos por lo que no se requiere una alta capacidad de control, solo es necesario tener un buen control de flujo para alcanzar los niveles adecuados de llenado cuando se haga un cambio de solución. Considerando que se requiere aproximadamente 100 ml de solución y se tienen dos bombas, el recambio se puede hacer en aproximadamente 30 segundos.

7.3 Pruebas de comunicación

Para realizar la comunicación entre la PC y los arduinos fue necesario establecer la tasa de baudios óptima, aunque el sistema reactivo mantiene la información actualizada constantemente y hace el sistema robusto contra la pérdida de datos, se estableció la velocidad adecuada para transmitir la mayor cantidad de datos sin que hubiera una pérdida significativa.

En la imagen 7.6 se observa el análisis que se realizó sobre el sistema de comunicación, para este se hicieron 100 mil lecturas y se promedió el número de pérdidas con respecto a la tasa de baudios utilizada. En este caso se optó por elegir una tasa de 57600 baudios, ya que se puede transmitir una cantidad aceptable de datos por cada ciclo y solo tiene 2 pérdidas de datos por cada 1000 lecturas. Se eligió esta tasa más elevada con pocos errores, debido a que aunque no se requiere una tasa de muestreo en extremo elevada (aproximadamente una lectura cada 200 ms), al aumentar la tasa de baudios

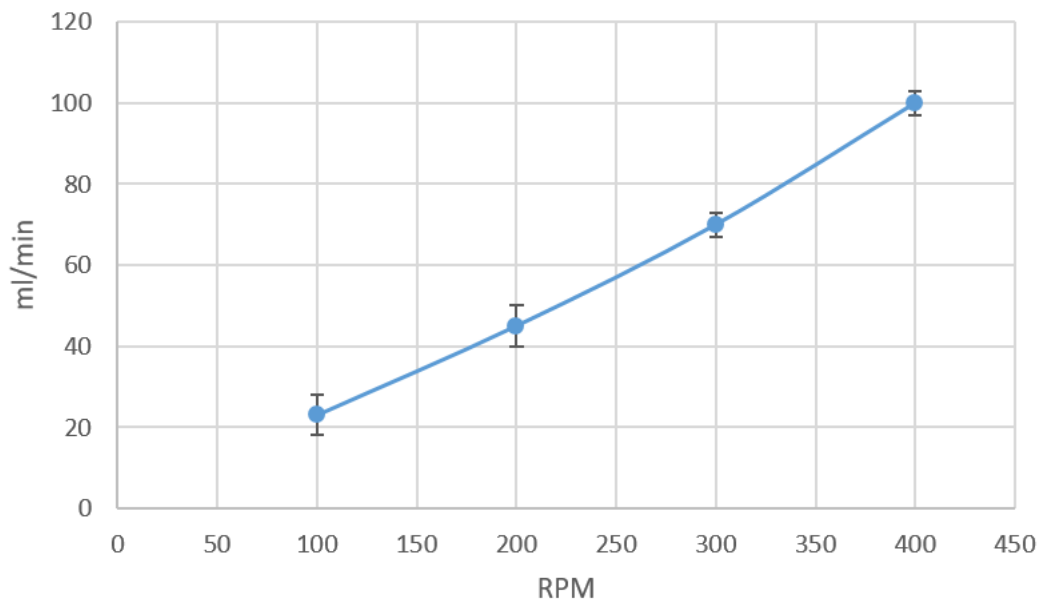


Figura 7.5:

Caracterización de la equivalencia de RPM a flujo ml/min en bomba peristáltica secundaria (3 pruebas de flujo).

se pueden enviar paquetes mas grandes de información en menor tiempo, lo que permite la comunicación reactiva, con esta tasa se enviaron paquetes de 64 bytes, a una tasa de 20 paquetes por segundo, es decir que se puede registrar cambio cada 50 ms, lo que nos da un amplio margen de fallo.

7.4 Modelo base de datos

La base de datos fue implementada en MongoDB, este es un sistema libre de bases no relacionadas, donde cada elemento es representado por un documento, para el sistema del biorreactor se opto por incluir todos los estados del mismo en un solo tipo de documento, de forma que al traer la información estos estados se pueden pasar a los diferentes elementos, tal que cada uno pueda conocer los valores de todos los otros elementos del sistema y de esta forma tomar decisiones de control.

```
{
tempMainContainer: Number,
tempControlContainer: Number,
tempIR: Number,
tempIRObject: Number,
tempMainContainerAir: Number,
```

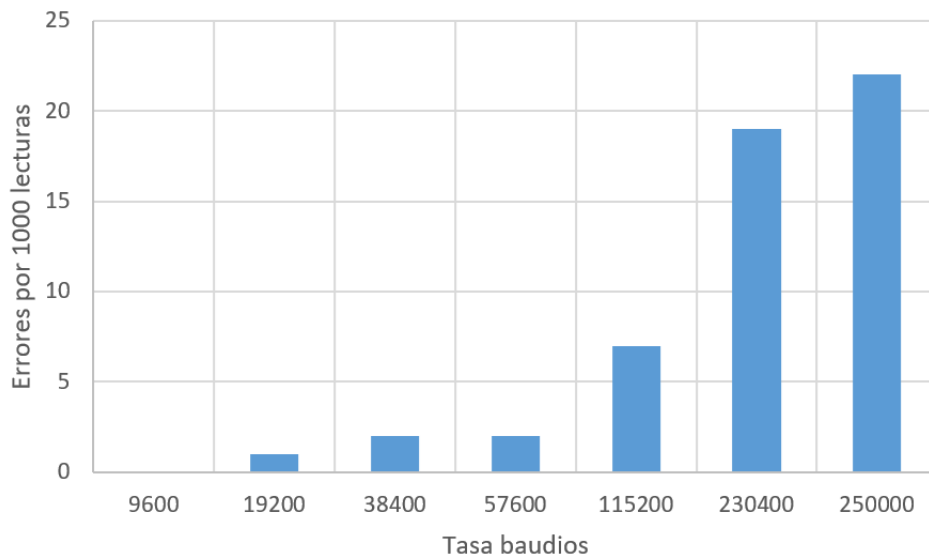


Figura 7.6:

Comparación del número de errores con la tasa de baudios.

```

humidityMainContainer: Number,
co2Level: Number,
co2Humidity: Number,
co2temp: Number,
pumpMainSpeed: Number,
switchCo2: Number,
switchAir: Number,
resistorMain: Number,
resistorControl: Number
}

```

Los datos del documento representan lo siguiente:

- **tempMainContainer:** Temperatura del líquido del contenedor principal.
- **tempControlContainer:** Temperatura del líquido del contenedor de control.
- **tempIR:** Temperatura ambiental detectada por el sensor infrarrojo.
- **tempIRObject:** Temperatura del objeto en la línea del sensor infrarrojo.
- **tempMainContainerAir:** La temperatura ambiental registrada por el sensor DHT22 en el contenedor principal.
- **co2Level:** El nivel de CO2 en ppm dentro del contenedor de control.

- **co2Humidity:** Humedad relativa en el contenedor de control registrada por el sensor de CO2.
- **co2temp:** Temperatura registrada por el sensor de CO2 en el contenedor de control.
- **pumpMainSpeed:** RPM de la bomba principal que controla el flujo entre el contenedor principal hacia el órgano y el contenedor de control.
- **switchCo2:** Estado de apertura de la válvula de CO2.
- **switchAir:** Estado de apertura de la válvula de aire.
- **resistorMain:** Nivel PWM de las resistencias de calentamiento en el contenedor principal.
- **resistorControl:** Nivel PWM de las resistencias de calentamiento en el contenedor de control.

7.5 API del biorreactor

La interfase y en general cualquier dispositivo con el que se quiera operar el biorreactor puede hacerlo a través de un webservice. Se establece un proceso paralelo para operar cada uno de los componentes, si bien ahora el API esta enfocada a controlar los estados de los componentes, la arquitectura permitirá llamar rutinas de control, con lo cual en vez de decirle a la bomba que funcione a 360 RPM, se le puede indicar que ejecute una rutina pulsátil donde se mantenga un flujo de 100 ml/min a un número de 10 pulsos por minuto.

Los puntos de acceso API que se establecieron para esta primera versión son los siguientes:

```
POST /pumpMain/{pwm:Number 1-255, cw:Boolean}}
POST /resistorMain/{level: Number 1-125}}
POST /resistorControl/{level: Number 1-125}}
POST /gasCO2/{state: Boolean}}
POST /gasAir/{state: Boolean}}

GET /controlChamber/
  return {co2Level: Number, temperature: Number, humidity: Number}

GET /mainChamber/
  return {temperature: Number, humidity: number}

GET /waterTemperature/
  return {main: Number, control: Number}
```



Figura 7.7:
Interfase de control del biorreactor.

7.6 Interfase de control

La figura 7.7 muestra la interfase que se diseñó para control manual del biorreactor, esta se comunica con el API a través del lenguaje de programación web ReactJS, y se puede montar de forma local o en un servidor remoto. Para esta primera versión se tiene un control para la velocidad de la bomba principal, controles para las resistencias del contenedor principal y el de control, además de interruptores para abrir y cerrar las válvulas de gases.

En la parte de la derecha se incluye una gráfica con la temperatura que arroja cada uno de los sensores, otra gráfica que muestra los niveles de CO₂ y una para los niveles de humedad relativa.

7.7 Impresión 3D de las piezas

Se imprimieron varias piezas en 3D como soporte para la estructura del biorreactor, esta se fabricaron con PLA con una impresora compatible con



Figura 7.8:
Tapa impresa en 3D para recipientes del biorreactor.

el esquema Prusa. Se eligió este método ya que fue posible diseñar piezas a las medidas para cada uno de los diferentes componentes, lo que sigue la estrategia de hacer el biorreactor modular, ya que da la flexibilidad de diseñar e imprimir piezas conforme los módulos lo requieran, además que la técnica tiene un costo asequible comparada con soportes comerciales que no son del todo adaptables. La figura 7.8 muestra la tapa que se fabricó para los contenedores del biorreactor, esta tiene acceso para las entradas de aire y mangueras de líquidos, además de soporte para los diferentes sensores, esta se imprimió a un densidad de 80% con caras de 3 capas al 100% para mantener el interior del frasco aislado, se le colocó un aro de metal para sujetar al frasco y un empaque de silicona para mantener sellado herméticamente el sistema.

En la siguiente imagen 7.9, se muestra una de las cajas para los módulos de control electrónico, se imprimieron 6 en total, cada una con una densidad de 30% y sin caras en la parte superior ni inferior, esto ayuda a tener una mejor disipación del calor durante el funcionamiento. Cada caja incluye una tapa con ranuras para atornillarse y apilar los diferentes módulos.

7.8 Ensamble de módulos

Los 6 módulos se apilaron de forma vertical (figura 7.10), los primeros 3 módulos se incluyeron los actuadores con cajas ranuradas sobre las que se montó un ventilador de 4 pulgadas para generar un túnel de aire que

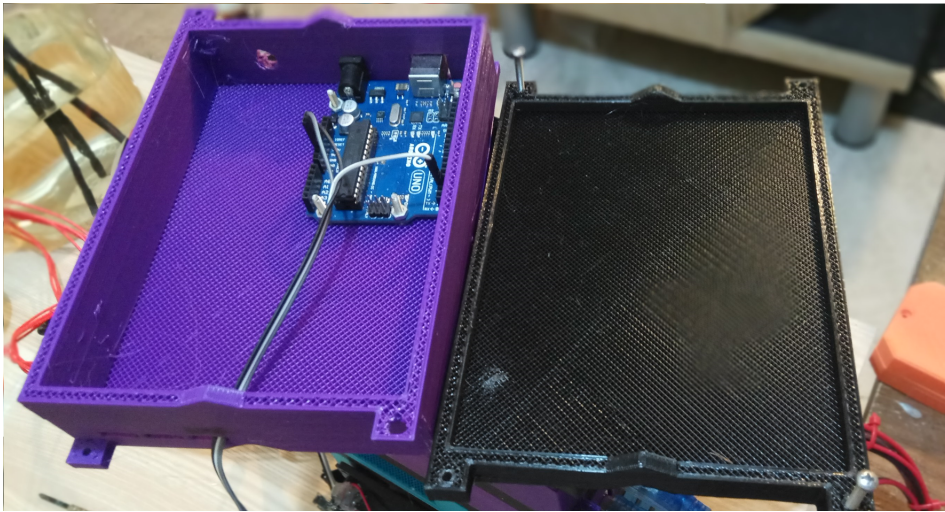


Figura 7.9:

Caja impresa en 3D para módulos de componentes electrónicos.

permite disipar el calor en los módulos que manejan las resistencias y las bombas que son los que consumen mayor energía y por lo tanto disipan mayor cantidad de calor. En la parte de arriba se colocaron los 3 módulos para los diferentes sensores. Los módulos están conectados cada uno por un cable a un puerto USB 2.0, y tienen una alimentación de voltaje de 24V y hasta 10A de corriente.

7.9 Montaje del sistema

En la imagen 7.11 se puede ver el montaje de todo el sistema en conjunto, al frente se observa la computadora conectada por cable USB al HUB, en el fondo se observan la torre que forman los 6 módulos, la altura de esta se aprovecho para montar sobre estos las bombas peristálticas. A la derecha se observan el contenedor principal y el contenedor de control con las diferentes conexiones de aire, líquido, sensores y resistencias. Dada contenedor tiene un frasco interior donde se depositará la solución de control y el tejido u órgano.

En las figuras 7.12 y 7.13, se observa a detalle cada parte de del contenedor del órgano y el contenedor de control respectivamente.

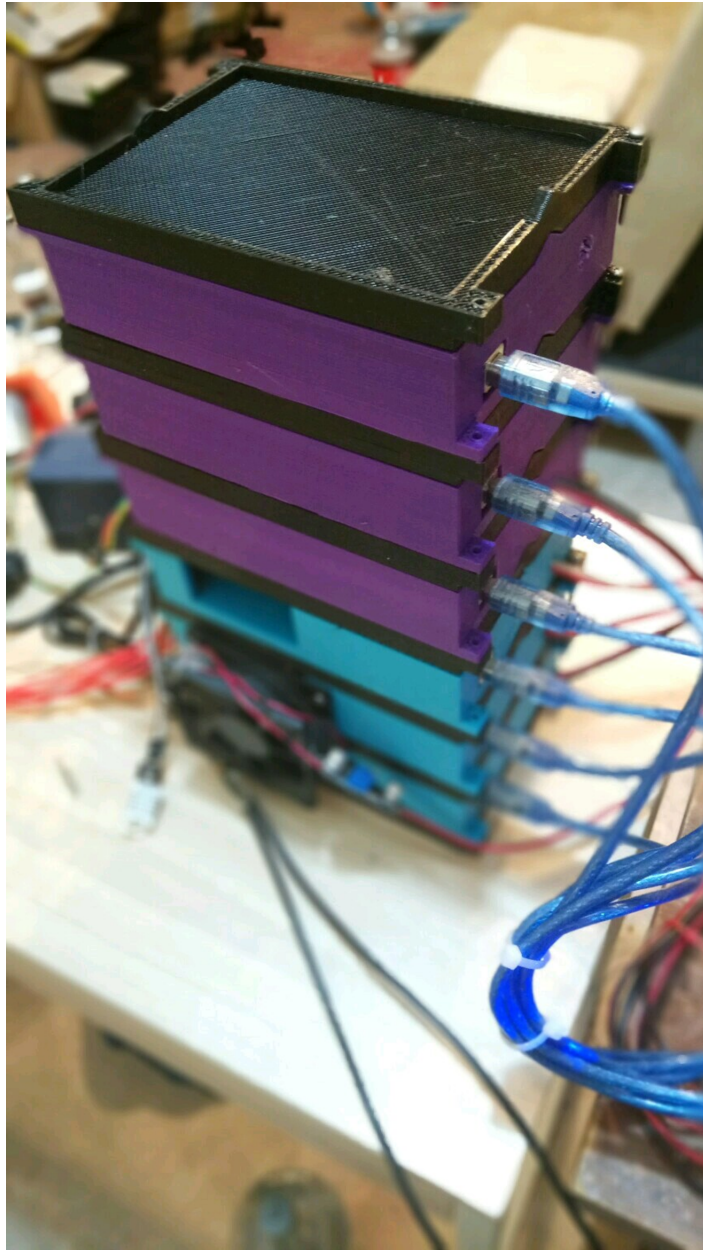


Figura 7.10:
Estructura de módulos de control electrónico apilada y conectadas a USB.

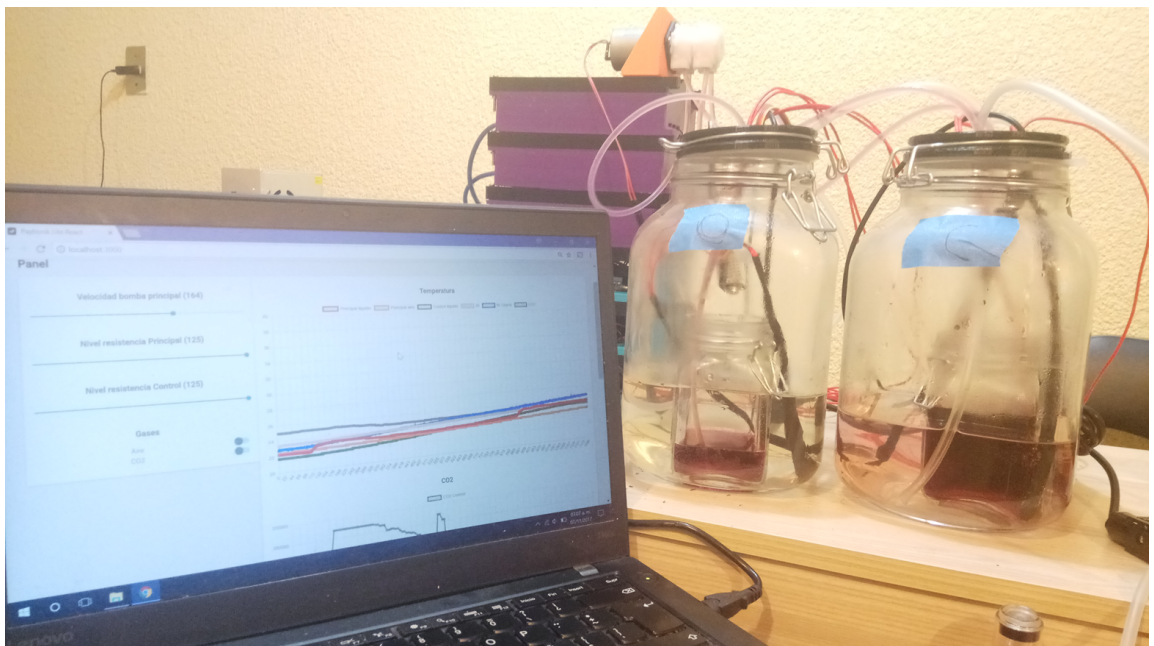


Figura 7.11:
Sistema de módulos de control conectados a la PC, con sensores y actuadores conectados a los recipientes del biorreactor.

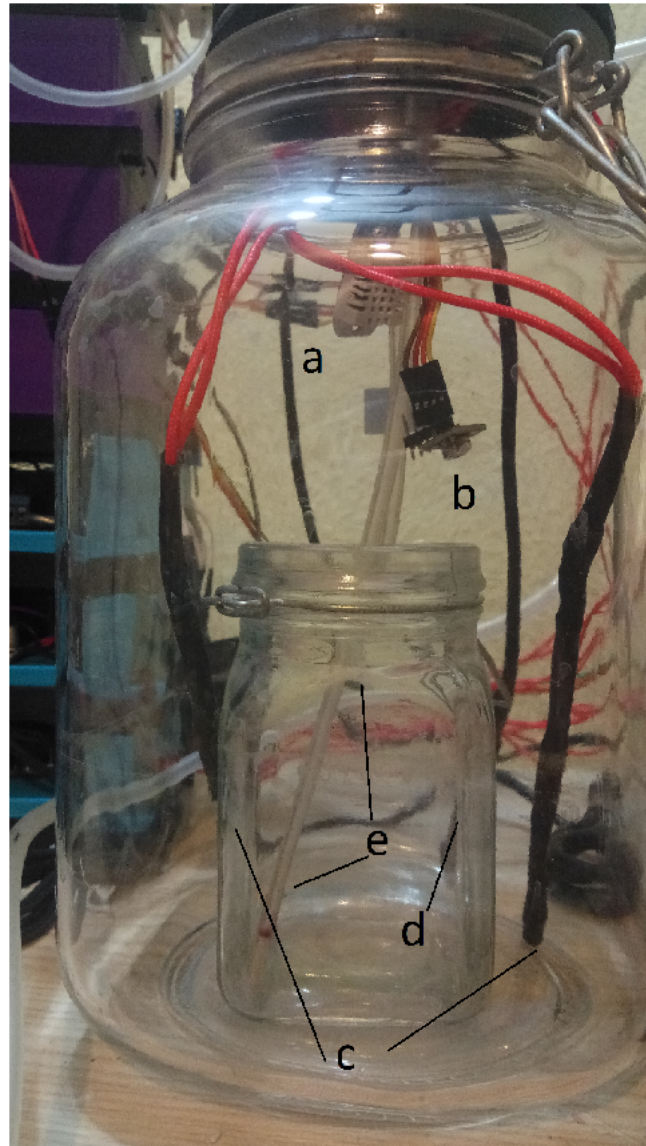


Figura 7.12:

Contenedor de órgano. a) Sensor de temperatura y humedad ambiental. b) sensor de temperatura infrarrojo. c) Resistencia cerámicas para calentamiento. d) Sensor de temperatura en líquido. e) Mangueras conectadas a la bomba peristáltica para flujo de solución.

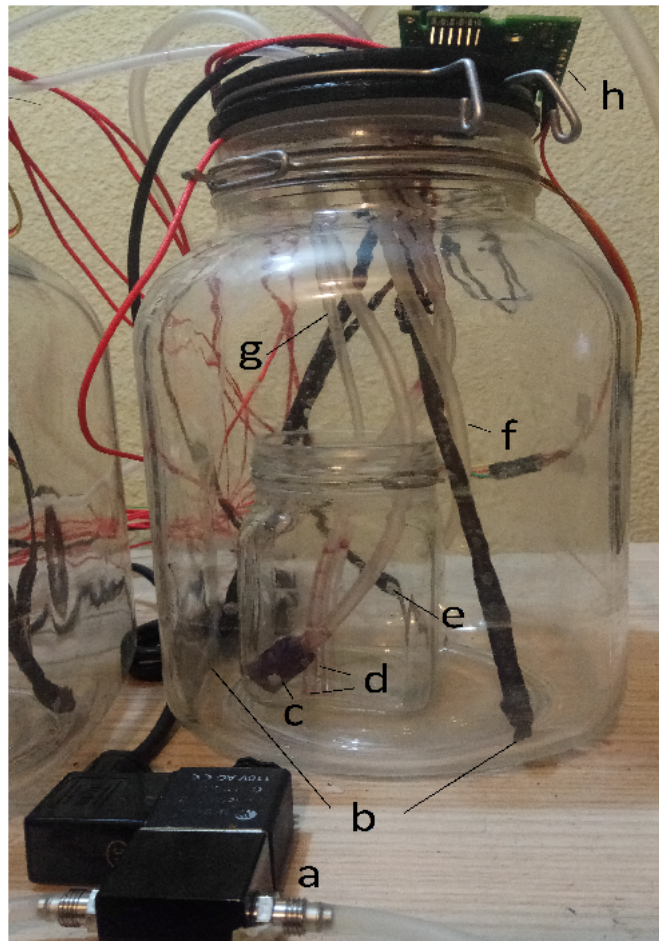


Figura 7.13:

Contenedor de control. a) Válvula de control de gases. b) Resistencias cerámicas para calentamiento. c) Difusor de oxígeno en solución. d) Mangueras conectadas a la bomba peristáltica para flujo de solución. e) Sensor de temperatura de líquido. f) Manguera de inyección de CO₂. g) Manguera para muestreo de aire en el contenedor. h) sensor de CO₂ y temperatura ambiental del contenedor.

Pruebas del biorreactor

Para comprobar el funcionamiento adecuado del biorreactor se hicieron diversas pruebas de funcionamiento sobre los sistemas de control, las primeras en forma estática pensando en un funcionamiento normal del sistema, y posteriormente se efectuaron pruebas de control aplicando algún tipo de perturbación.

8.1 Pruebas estáticas

Las primeras pruebas se hicieron para medir la temperatura sobre en el baño térmico, en el recipiente principal (figura 8.1) y de control (figura 8.2). Para el primero se alcanza la temperatura deseada de 37° en el minuto 38 y para el segundo en el minuto 32. El control muestra una ligera sobre compensación al alcanzar la temperatura deseada por lo que tarda unos minutos mas en estabilizarse. Para ambos casos una vez que se alcanza la temperatura, solo varia ligeramente en menos de una décima, por lo que se considera que, a largo plazo, gracias a esta inercia térmica se espera que todo el sistema mantenga una temperatura estable durante todo el tiempo de funcionamiento, incluso bajo algunas perturbaciones.

Como se menciona anteriormente el sistema de control de flujo, se maneja en torno a las RPM de la bomba. Se hicieron pruebas ajustando la velocidad a 350 RPM (figura 8.3), lo que genera un flujo aproximado de 100 ml/min. Con el controlador del motor se alcanza la velocidad en menos de un segundo, y aunque tiene una ligera sobre compensación a lo largo del tiempo la velocidad se mantiene prácticamente constante.

Para el sistema de CO₂ se desea tener un nivel de 50,000 ppm en condiciones estables en el contenedor de control. La gráfica 8.4 muestra el comportamiento durante la apertura de la válvula de CO₂, el sensor toma muestras cada 5 segundos. Aproximadamente al minuto 18 se alcanza un nivel

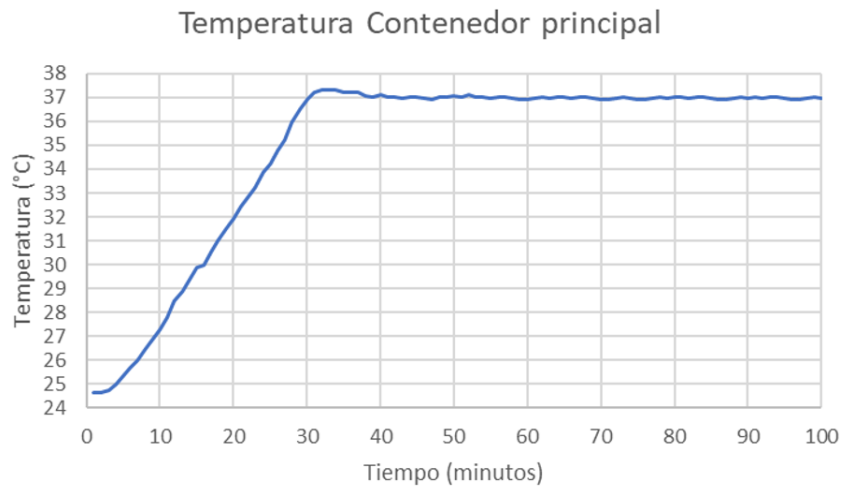


Figura 8.1:
Temperatura del líquido en contenedor principal.

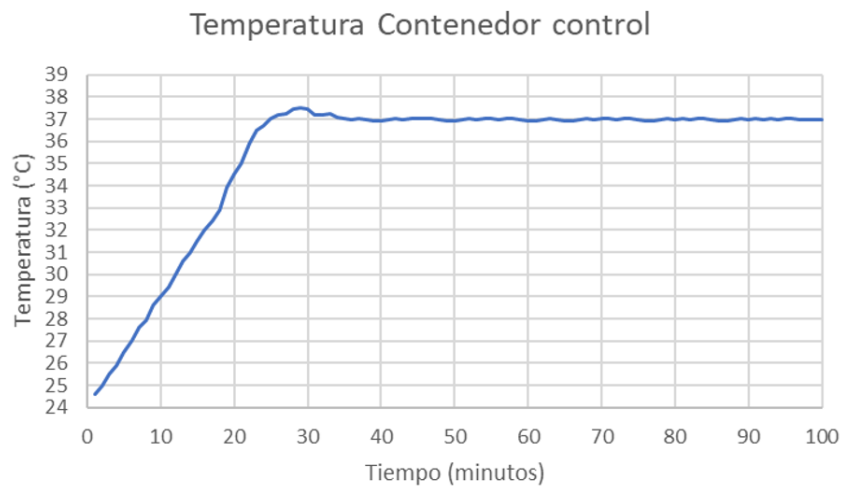


Figura 8.2:
Temperatura líquido contenedor control.

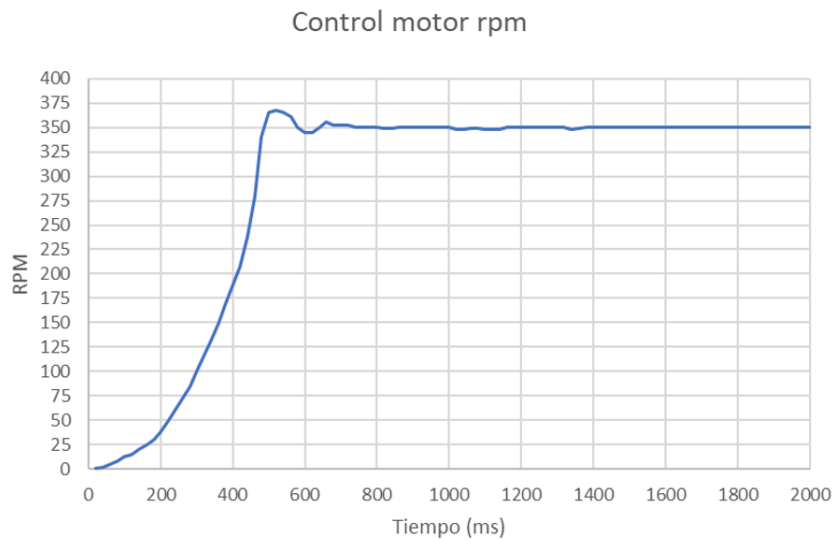


Figura 8.3:
RPM de la bomba peristáltica en los primeros segundos de iniciar.

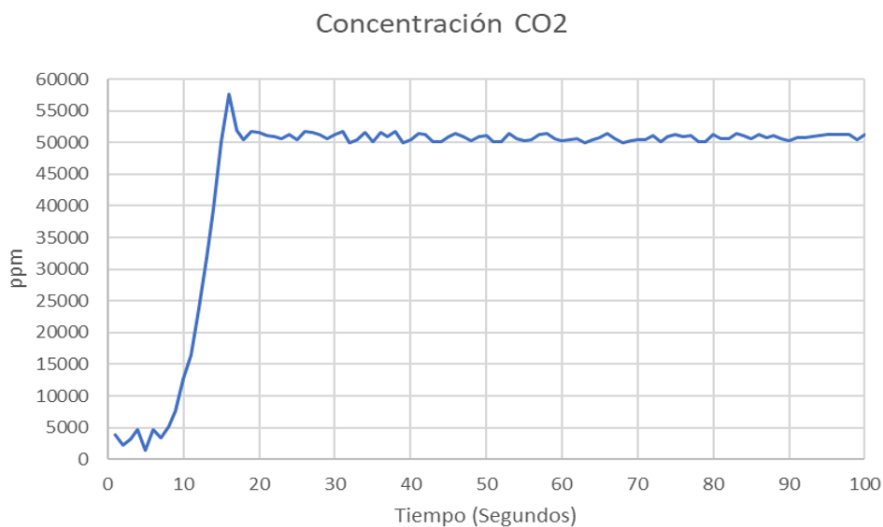


Figura 8.4:
Concentración de CO2 en condiciones normales.

estable, se observan variaciones constantes de los niveles de CO2 con un rango aproximado de 500 ppm, esto se debe a la naturaleza del sensor empleado ya que tiene un margen de error del 0.5% y el flujo de aire causa variaciones naturales, sin embargo estas no son significativas considerando la concentración total en el aire.

Se realizó una prueba para monitorear la temperatura en un modelo de

silicona simulando el órgano conectado, la temperatura de la solución de control y la concentración de CO₂ (figura 8.5). Durante el proceso, se calentó la solución de control hasta alcanzar los 37°, posteriormente se hizo circular la solución en el sistema y se abrió la válvula de CO₂, el modelo alcanzó la temperatura normal a los 18 minutos, y se obtuvieron las condiciones adecuadas de CO₂ esperadas a partir de los 5 minutos. La temperatura de la solución se mantuvo prácticamente constante y la del modelo se mantuvo con variaciones mínimas probablemente ocasionadas por el flujo de líquido y el posible enfriamiento que se genera al inyectar aire sobre la solución, aun así no se obtuvieron variaciones mayores a dos décimas de grado, lo cual se puede considerar como un sistema térmico estable para los propósitos del biorreactor.

8.2 Pruebas 48 Horas

Para probar que el biorreactor puede funcionar continuamente, se hicieron pruebas por 48 horas seguidas, en las condiciones normales (50,000 ppm y 37°C). En la figura 8.6, se observan los resultados de las mediciones, las temperaturas medidas en los diferentes sensores es prácticamente constante durante todo el tiempo, esto es de esperarse ya que el sistema tiene una inercia térmica grande, por lo que no se ve afectado por los cambios externos. En cuanto a la medición de CO₂, este muestra variaciones de hasta 1000ppm, esto lo podemos considerar un rango aceptable, ya que representa una variación de tan solo el 2%.

8.3 Pruebas perturbación

Se realizó una prueba, haciendo el cambio de la solución de control por solución fresca (28°C), se registro el cambio de temperatura sobre el modelo de órgano y sobre el recipiente de la solución (figura 8.7). Por la temperatura que se tiene del sistema, se considera que no hubo un cambio significativo en la temperatura del recipiente, solo disminuyo 0.4 grados, y se recupero la temperatura normal en menos de 10 minutos. Por otro lado para el modelo de órgano se obtuvo una disminución mayor, pero poco significativa, menor a 1 grado centígrado, este se recupero de igual forma en menos de 10 minutos. Estas dos variaciones se pueden considerar estables para el tiempo y la temperatura ideal del órgano, el cambio de solución será probablemente la principal fuente de perturbación del sistema, por lo que se planea mejorar el proceso y el control para mantener una mayor estabilidad.

Otra de las fuentes de perturbación del sistema, es cuando se abre el recipiente para tomar muestras de solución. Para emular esta perturbación se abrió la tapa durante 10 segundos y luego se cerro, la gráfica (figura 8.3) muestra la concentración de CO₂ durante la prueba. Esta se redujo rápidamente

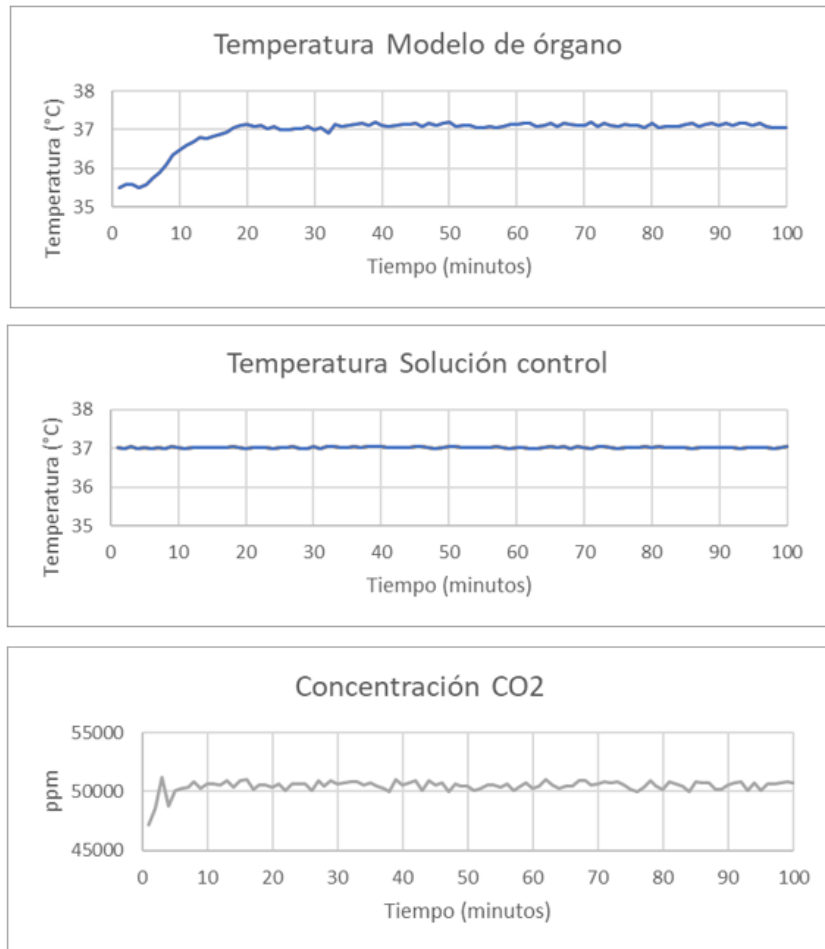


Figura 8.5:
Comparación de la temperatura del modelo de órgano con la temperatura la solución control y concentración CO2.

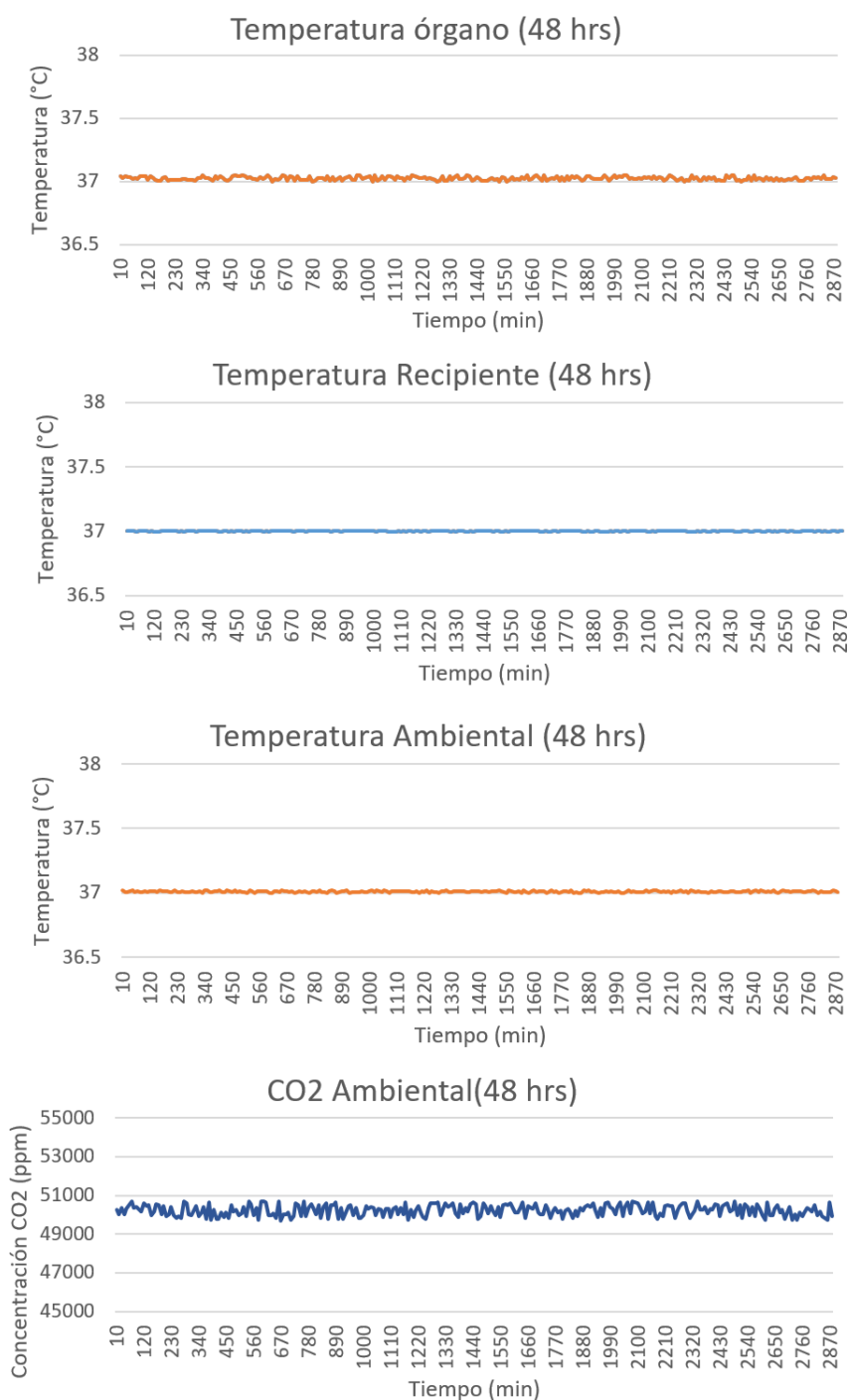


Figura 8.6:
Mediciones del biorreactor en funcionamiento normal por 48 Horas.

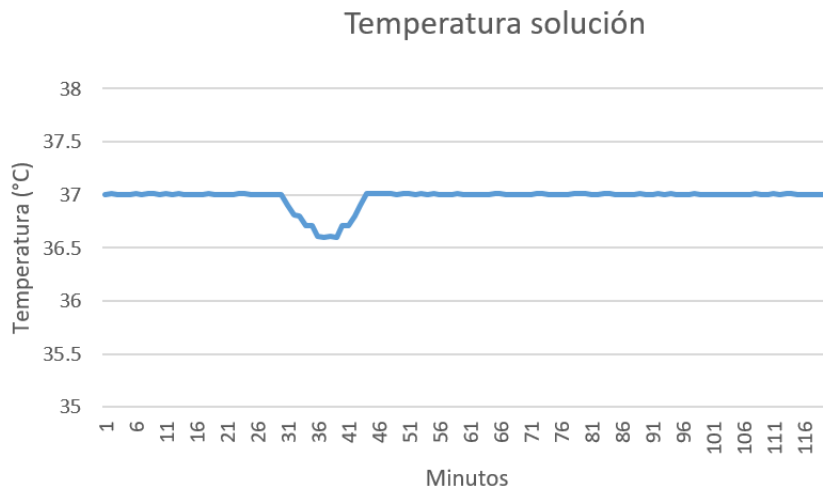
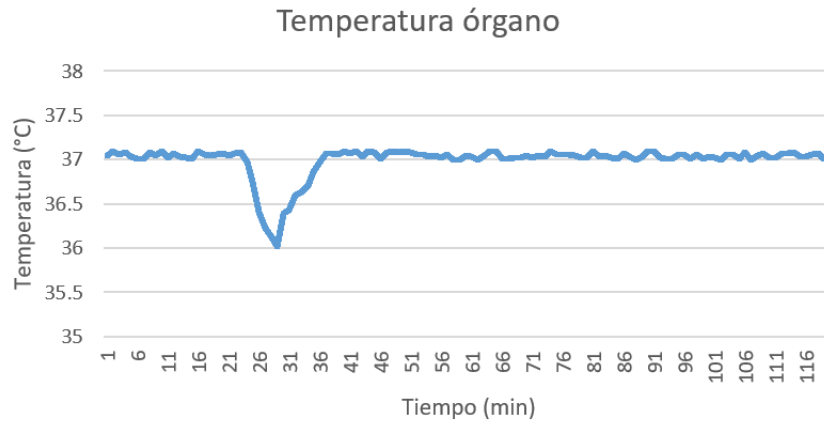
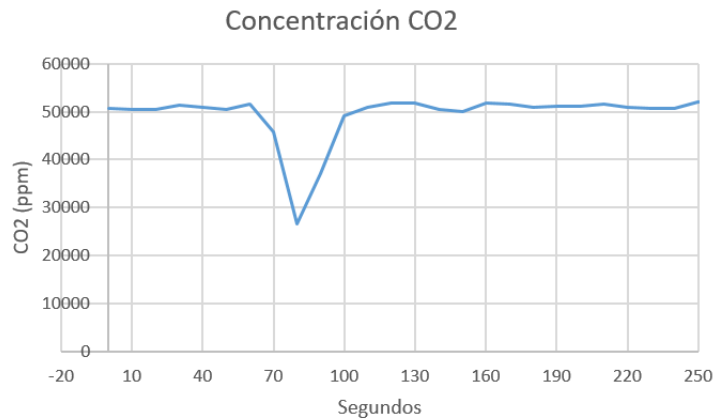


Figura 8.7:
Medición de temperatura sobre el modelo de órgano y recipiente de control durante el cambio de solución de control.

**Figura 8.8:**

Medición de concentración de CO₂ durante apertura de tapa del contenedor de control.

hasta 27,000 ppm, al cerrar la tapa, la concentración se comenzó a recuperar rápidamente y en aproximadamente 35 segundos se recuperó el nivel normal del gas; posteriormente se mantuvieron a los niveles normales esperados.

La última prueba se realizó sobre el motor de la bomba peristáltica, si bien no se esperan perturbaciones significativas en este subsistema, se desea mantener una velocidad constante independientemente del tipo de solución que se vaya a colocar. Para la prueba se hizo funcionar la bomba, a los 10 segundos se ajustó la manguera para aumentar la presión de flujo, en la gráfica 8.9 se puede observar el resultado, la corriente del motor comenzó a aumentar ligeramente, pero las RPM se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de toda la prueba. Esto demuestra que el sistema de flujo puede mantenerse a la tasa deseada independientemente de los cambios de presión que puedan existir en el sistema.

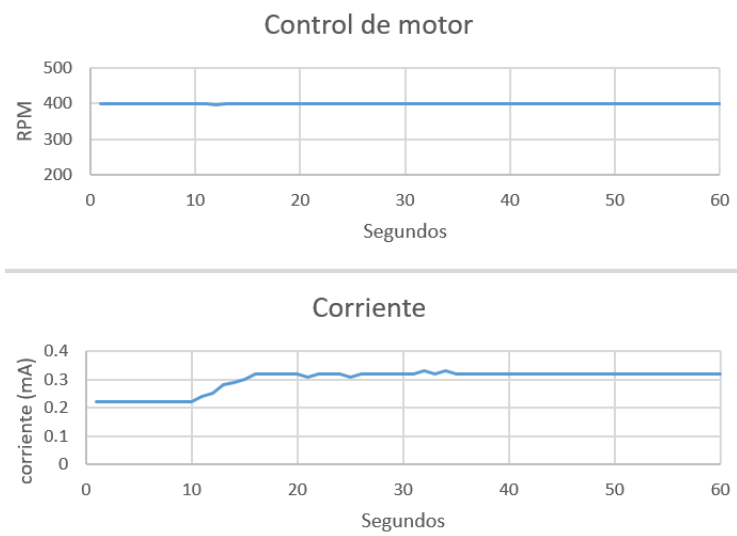


Figura 8.9:
Medición de RPM en la bomba al cambiar la presión de la manguera de solución

Conclusiones

En el presente trabajo se mostró el proceso para el diseño y construcciones de un biorreactor enfocado a estabilizar tejido un órgano cardiaco.

- Se realizó una revisión general de diferentes sistemas y se eligieron como características básicas un control de gases, flujo y temperatura, las cuales son las variables mínimas para mantener viable un órgano. A partir de estas características se hizo un diseño general del sistema y se eligieron los componentes apropiados.
- Se diseñó e implementó un sistema de comunicación para el manejo de los dispositivos electrónicos usando sistemas arduino como plataforma de desarrollo para actuadores y sensores y una comunicación con la computadora; con un sistema de control basado en NodeJS.
- El sistema se hizo modular y flexible, de forma que se pueden agregar nuevos componentes relativamente fácil, agregando arduinos, actuadores y sensores en la programación. Físicamente se pueden almacenar los componentes electrónicos de cada módulo.
- Se diseñó el sistema de contenedores para el órgano y la solución de alimentación en base a recipientes herméticos que funcionan como baños térmicos, en estos se acondicionaron los sensores y las mangueras de flujo para líquido y aire.
- En base a la plataforma construida, se implementaron sistemas para controlar el flujo de gases a partir de válvulas, un sistema de flujo de líquidos entre los contenedores y el órgano basado en bombas peristálticas y un sistema de control térmico de múltiples fuentes midiendo tanto la temperatura del líquido de los recipientes, del órgano y del ambiente. Además que se tiene un sistema de monitoreo de humedad relativa.

-
- Por ahora el sistema está diseñado para tejidos pequeños de no más de 25 cm cúbicos, pero es posible expandirlo agregando nuevos contenedores y bombas peristálticas más potentes para hacer pruebas con órgano o tejidos de mayor tamaño.

Este proyecto fue un primer paso en el largo proceso para la generación de un sistema que permita tratar un órgano para realizar un proceso de reparación o de recelularización. Se espera continuar trabajando en el proyecto en un futuro y realizar las siguientes actividades:

- Se planea mejorar el proceso y sistema de control con los datos que se obtuvieron en las pruebas actuales para tener un control de temperatura más rápido y un control de gases con una mejor velocidad de respuesta.
- Una estructura de recipientes donde se puedan montar y desmontar más fácil las mangueras para conectar fácilmente el tejido.
- Implementar nuevos módulos más específicos para tejido cardíaco como sistemas de estimulación eléctricos y mecánicos, y sensores para medir la respuesta mecánica y eléctrica del tejido.
- Implementar nuevos módulos más específicos para tejido cardíaco como sistemas de estimulación eléctricos y mecánicos, y sensores para medir la respuesta mecánica y eléctrica del tejido.
- Realizar pruebas sobre el ventrículo izquierdo de un corazón de conejo, manteniéndolo por más de 48 horas conectados y medir la viabilidad celular y pruebas de integridad histológica.

Bibliografía

- [1] Centro Nacional de Trasplantes, proceso del trasplante. http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_proceso_trasplante.html. Registrado: 2017-09-25.
- [2] Daniel Carreño, tiempo espera de trasplante. http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_tiempo_registro.html. Última modificación: 2015-07-10.
- [3] United Network For Organ Sharing, datos sobre donación de órganos en estados unidos. https://www.unos.org/data/transplant-trends/#transplants_by_donor_type. Registrado: 2017-09-25.
- [4] CENATARA, número de pacientes de lista de espera en México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264913/Presentaci_nTercerTrimestre2017.pdf. Última modificación: 2017-10-03.
- [5] Organ Donor Gov, datos sobre donación de órganos en estados unidos. <https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>. Registrado: 2017-09-25.
- [6] Briggs et al. Causes of death after renal transplantatio. *Nephrol. Dial Transplant*, (16):1545–1549, 8 2011.
- [7] Hyun-Wook Kan et al. A 3d bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, (34):312–319, 2 2016.
- [8] journal = Nano Lett year = 2013 number = 13 pages = 2634–2639. month = 6 Mannor et Al, title = 3D Printed Bionic Ears.

-
- [9] Pati F et al. 3d bioprinting of tissue/organ model. *Angew Chem Int Ed Engl*, (19):312–317, 2 2016.
- [10] Murphy et al. 3d bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnolog*, (32):773–785, 2014.
- [11] Seung-Schik Yoo. 3d-printed biological organs: medical potential and patenting opportunity. *Expert Opin Ther Pat*, (5):507–511, 4 2015.
- [12] Ma Y. Genome modification by crispr/cas9. *FEBS J*, (281):5186–5193, 2014.
- [13] Sara Reardon. New life for pig-to-human transplants. *Nature*, (527):152–154, 2015.
- [14] Thomas W. Gilbert. Strategies for tissue and organ decellularization. *Journal of cellular biochemistry*, 113(7), 2014.
- [15] Scarrit et al. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechno*, (30), 2015.
- [16] Ott et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.*, (13):213–221, 2008.
- [17] Organ Recovery Systems, lifeport transpot. <https://www.organ-recovery.com>. Visitada: 2015-09-10.
- [18] Sekine et al. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun.*, 4(399), 2013.
- [19] Maidhof et al. Biomimetic perfusion and electrical stimulation applied in concert improved the assembly of engineered cardiac tissue. *J Tissue Eng Regen Med.*, 6(16):12–23, 2012.
- [20] Ramasway et al. A novel bioreactor for mechanobiological studies of engineered heart valve tissue formation under pulmonary arterial physiological flow conditions. *J Biomech Eng.*, 12(136), 2014.
- [21] Kensah et al. A novel miniaturized multimodal bioreactor for continuous in situ assessment of bioartificial cardiac tissue during stimulation and maturation. *Tissue Eng Part C Methods.*, 17(4):463–473, 2011.
- [22] Tandon et al. Portable bioreactor for perfusion and electrical stimulation of engineered cardiac tissue. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 17(4):463–473, 2015.

-
- [23] Brown et al. Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering. *Biotechnology Progress.*, 4(24):907–920, 2015.
- [24] Lueders et al. Short-term culture of human neonatal myofibroblasts seeded using a novel three-dimensional rotary seeding device. *ASAIO J.*, 3(53):310–314, 2006.
- [25] Bijonowski et al. Bioreactor design for perfusion-based, highly-vascularized organ regeneration. *Curr Opin Chem Eng.*, (2):32–40, 2013.
- [26] Ott2 et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.*, (14):213–221, 2008.
- [27] Hulsmann et al. A novel customizable modular bioreactor system for whole-heart cultivation under controlled 3d biomechanical stimulation. *Journal of Artificial Organs.*, 3(16):294–304, 2013.
- [28] Uzarski et al. Dual-purpose bioreactors to monitor noninvasive physical and biochemical markers of kidney and liver scaffold recellularization. *Tissue Eng Part C Methods.*, (10):1032–1043, 2015.
- [29] Cannon RM et al. To pump or not to pump: a comparison of machine perfusion vs cold storage for deceased donor kidney transplantation. *J Am Coll Surg.*, 4(216):625–633, 2013.
- [30] Forde et al. Single centre experience of hypothermic machine perfusion of kidneys from extended criteria deceased heart-beating donors: a comparative study. *Irish Journal of Medical Science.*, 1(185):121–125, 2016.
- [31] Transmedic, transplant organ transport. <http://www.transmedics.com/wt/home/index>. Visitada: 2015-09-10.
- [32] Popov et al. Utilization of the organ care system – a game-changer in combating donor organ shortage. *Med Sci Monit Basic Res.*, (21):29–32, 2015.
- [33] Messer et al. Normothermic donor heart perfusion: current clinical experience and the future. *Transpl Int.*, (21):632–642, 2015.
- [34] Stamp et al. Successful heart transplant after ten hours out-of-body time using the transmedics organ care system. *Heart Lung Circ.*, 6(24):611–613, 2015.
- [35] Garcia et al. Evaluation of the organ care system in heart transplantation with an adverse donor/recipient profile. *Ann Thorac Surg.*, 6(98):2099–2105, 2015.

- [36] NodeJS, sitio web. <https://nodejs.org/es/>. Visitada: 2015-10-01.
- [37] Arduino, sitio web. <https://www.arduino.cc>. Visitada: 2015-10-01.
- [38] Edwards et al. The cardiac output of unanesthetized rabbit. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences.*, 44(3):309–321, 1959.