

Desarrollo de un estimulador electromecánico programable para el entrenamiento electromecánico de cultivos monocapas de células miocárdicas

O.A. Pla-Terrada¹, R. Albert¹, M. Rodrigo¹, A.M. Climent², M. S. Guillem¹

¹ Instituto ITACA, Universitat Politècnica de València, Valencia, España

² Servicio de Cardiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España

Resumen

Diversos estudios médicos han concluido que es posible regenerar tejido cardíaco a partir de células madre. A pesar de ello, la tasa de supervivencia de las células madre implantadas en corazones resulta inferior al 10%. Un preacondicionamiento electromecánico de las células a implantar puede ser efectivo a la hora de aumentar el efecto paracrino, puesto que las células estarían ya adaptadas a un entorno con estiramiento cíclico y, adicionalmente, el entrenamiento promoverá la diferenciación hacia tejido cardíaco adulto. Para ello, se ha diseñado e implementado un estimulador electromecánico programable para entrenar cultivos de células miocárdicas.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad en el mundo. La insuficiencia cardíaca provocada por dichas enfermedades supone uno de los retos más importantes para la medicina regenerativa debido a su alta incidencia.

La ingeniería tisular tiene como objetivo producir sustitutos viables que restauren, mantengan o mejoren las funciones del tejido y órganos humanos. A diferencia de las terapias estándar, los productos de la ingeniería tisular utilizan células vivas que se integran en el paciente [1]. Así pues, las células madre son células capaces de replicarse y dar lugar a diversos tipos celulares. Algunas de las células "hijas" se especializan mediante diferenciación, y otras mantendrán su capacidad replicativa y serán por tanto nuevas células madre. La existencia de este tipo de células permite mantener la capacidad regenerativa de los tejidos [2].

En los últimos años se han desarrollado numerosas estrategias y ensayos clínicos de terapia celular que han perseguido regenerar el tejido dañado mediante la administración de células con potencial cardiorregenerativo. En concreto, se han implantado células madre adultas procedentes de la médula ósea y tejido adiposo entre otros [3]. El principal efecto cardiorregenerativo de la inyección de células madre adultas es fundamentalmente paracrino, es decir, debido a la liberación de citoquinas y otros factores que potencian la vascularización del tejido [4]. Los resultados han demostrado que la implantación de células madre adultas es una técnica segura y mejora la función cardíaca, sin embargo, los índices de retención celular y supervivencia han sido inferiores al 10% [5].

Un preacondicionamiento electromecánico de las células a implantar podría ser efectivo a la hora de aumentar el efecto paracrino, puesto que las células estarían ya adaptadas a un entorno con estiramiento cíclico y, adicionalmente, el entrenamiento podría promover la diferenciación hacia tejido cardíaco adulto. Diversos autores han estudiado el efecto beneficioso de un entrenamiento eléctrico o mecánico en cultivos de células procedentes de corazones neonatos durante su maduración. Eschenhagen y Zimmerman demostraron la eficiencia de un entrenamiento mecánico durante el cultivo de células cardíacas neonatales [6]. Bajo estas condiciones, las células formaron músculo cardíaco altamente diferenciado que exhibía propiedades contráctiles y electrofisiológicas más similares al miocardio adulto que aquellos tejidos que no habían sido entrenados. En nuestro grupo de investigación hemos demostrado que el cultivo de una línea cardíaca de células auriculares murinas aumentó sus niveles de maduración tras una estimulación mecánica [7].

Estos estudios han puesto de relieve la importancia del entrenamiento en el proceso de maduración del tejido miocárdico. Es por ello que la principal finalidad del presente proyecto es la adaptación y aplicación de la tecnología necesaria para la construcción, entrenamiento y caracterización de parches de tejido cardíaco bioartificial.



Figura 1. Diagrama general del estimulador electromecánico.

2. Materiales y métodos

En el presente trabajo se ha desarrollado un estimulador electromecánico coordinado para el desarrollo de cultivos de células miocárdicas. Este sistema se basa en tres partes que actúan simultáneamente: el estimulador eléctrico, el estimulador mecánico y una interfaz de usuario mediante pantalla táctil para poder configurar los parámetros de forma fácil e intuitiva (Figura 1).

El estimulador eléctrico está coordinado con el mecánico para así simular los latidos de un corazón, en el que la activación eléctrica precede a la mecánica. Todo el sistema cuenta con dos interfaces de comunicación: una interfaz mediante una pantalla táctil donde podremos cambiar los valores de los parámetros del estímulo eléctrico y una red ZigBee donde podremos comunicar el ordenador con el estimulador de forma inalámbrica.

2.1. Estimulador mecánico

El estimulador mecánico cuenta con un microcontrolador (Arduino UNO) que se encarga de gestionar las señales que envía al driver del motor (EasyDriver). Este driver acciona el motor paso a paso (SM-42BYG011-25) que crea un estímulo longitudinal en el pocillo de goma donde residen las células. Además, el estimulador mecánico cuenta con un sensor hall (A3144) y su respectivo imán que implementan la función de final de carrera.

Para la realización del diseño de la parte mecánica de nuestro sistema se utilizó el programa FreeCad para más tarde imprimir las piezas en una impresora 3D (MakerBot® Replicator® 2). La primera pieza hace la función de base y soporta uno de los lados del pocillo de goma. Estos pocillos tienen dos agujeros en cada lado para poder fijarlos a la superficie que deseemos. En nuestro caso, se dibujaron dos agujeros con la forma de una tuerca para así poder atornillar los pocillos a la pieza. Además, esta pieza sirve de sujeción del motor paso a paso (Figura 2).

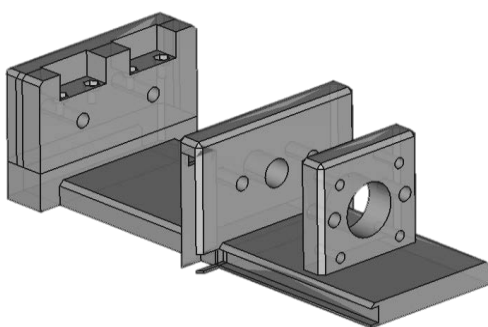


Figura 2. Pieza base del estimulador mecánico.

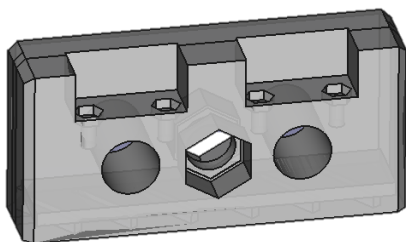


Figura 3. Pieza móvil del estimulador mecánico.

La pieza móvil (Figura 3) soporta el otro extremo del pocillo de goma. Esta pieza que está enfrentada a la pieza base, se mueve hacia delante y hacia atrás provocando un estímulo mecánico gracias a una varilla roscada enganchada al eje del motor paso a paso. En el centro de la pieza, se sitúa una tuerca de diámetro 8 mm para producir el movimiento y en los laterales dos rodamientos con sus respectivas varillas que sirven de sujeción y deslizamiento de la misma. Para ello se han realizado los agujeros correspondientes para el encaje de estas piezas. Finalmente se realizó el montaje y encaje de todas las piezas (Figura 4).

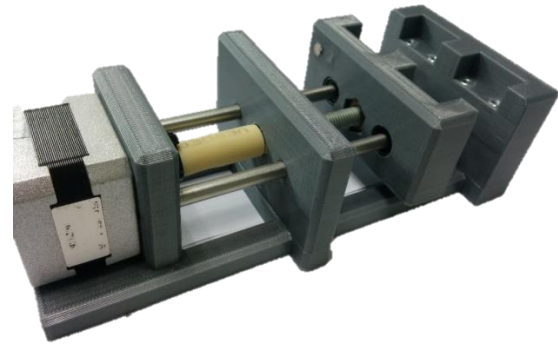


Figura 4. Montaje del estimulador mecánico.

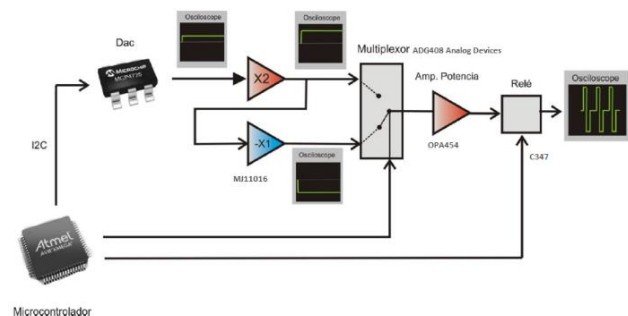


Figura 5. Esquema eléctrico generación señal bifásica.

2.2. Estimulador eléctrico

En la Figura 5 podemos observar los distintos componentes del estimulador eléctrico. Mediante la comunicación inalámbrica o la pantalla táctil se envían las órdenes para que el estimulador empiece a funcionar. Una vez interpretadas las órdenes por el microcontrolador (Arduino MEGA 2560) se establece una señal de referencia gracias a los conversores digitales-analógicos (DACS), que convierten la instrucción digital generada por el microcontrolador en una señal analógica. A continuación, la tensión es amplificada en la siguiente etapa para generar una señal bipolar. Para ello, se requiere de una etapa de amplificación con un amplificador no inversor de ganancia 2 y otro inversor de ganancia -1 en cascada, implementados con dos amplificadores operacionales, logrando así una señal positiva y negativa entre -10 y +10 V. Una vez generada la forma de onda deseada, ésta es amplificada tanto en tensión como en corriente para alcanzar los valores requeridos para la experimentación.

Para que los electrodos y todo el sistema estén aislados del tejido a estimular, se ha implementó un relé entre la

salida de la etapa de amplificación de potencia y los conectores de los electrodos, lo que permite aislar eléctricamente el tejido del sistema cuando no se está estimulando. Para el montaje del estimulador se utilizaron cuatro PCBs, una por cada canal. En nuestro caso, se utilizaron cuatro canales para poder conectar varios electrodos y así utilizar los necesarios para los diferentes experimentos. Estas PCBs albergan todos los circuitos descritos anteriormente. Por último, todos estos componentes se instalaron junto con las fuentes de alimentación, los microcontroladores y el driver del motor en una caja de plástico ABS diseñada para instrumentación de laboratorio (Figura 6).

2.3. Interfaz de usuario

Para poder configurar los parámetros fácilmente se decidió incorporar al sistema una interfaz de usuario mediante pantalla táctil utilizando la pantalla Arduino TFT Touch Shield V2.0. Esta pantalla está conectada a un Arduino UNO, en el cual se configuran cada uno de los pines para el buen funcionamiento de la pantalla.

La interfaz de usuario se ha programado de manera que sea sencillo para el usuario final. Para ello se han implementado una serie de menús que van apareciendo de

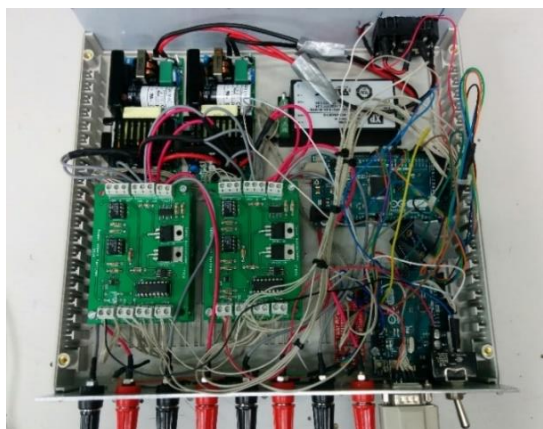


Figura 6. Montaje del estimulador electromecánico de 4 canales.

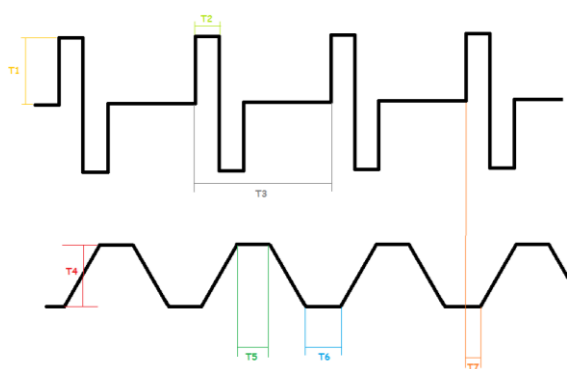


Figura 7. Formas de onda de la estimulación eléctrica y mecánica y parámetros configurables: T1: Voltaje de pico, T2: Ancho de pulso, T3: Periodo, T4: % de estiramiento, T5: Tiempo de espera con el pocillo estirado, T6: Tiempo de reposo entre estímulos, T7: Tiempo entre la las estimulaciones eléctrica y mecánica.

forma secuencial y que nos permiten elegir el canal por el que deseamos estimular, los parámetros que deseamos modificar y el valor que le queremos asignar a cada uno de estos parámetros, ilustrados en la Figura 7: voltaje de pico, periodo de estimulación, ancho de pulso eléctrico, porcentaje de estiramiento mecánico del pocillo flexible y tiempos con pocillo estirado, en reposo y entre estimulación eléctrica y mecánica. Por último, se diseñó una caja impresa en 3D para incorporar la pantalla al sistema. En la Figura 8 podemos observar el diseño final del conjunto del estimulador electromecánico para el cultivo de células miocárdicas preparado para su traslado a un laboratorio de electrofisiología.

3. Resultados

En esta sección se detalla la caracterización realizada sobre el estimulador desarrollado para comprobar el cumplimiento de las condiciones de diseño estipuladas.

Se ha comprobado el número de pasos que da el motor para los diferentes porcentajes de estiramiento. Se obtuvo una gráfica lineal debido a que el porcentaje de estiramiento es directamente proporcional al número de pasos del motor (Figura 9). El número de pasos de motor se pudo calcular sabiendo que cada vez que el motor da una vuelta, la pieza se mueve 1,25 mm, es decir, el paso de la rosca.

Por último, se ha realizado un estudio de los límites de funcionamiento del motor a la hora de realizar un estímulo. El motor seleccionado NEMA 17 cuenta con un



Figura 8. Sistema completo de estimulación electromecánica.

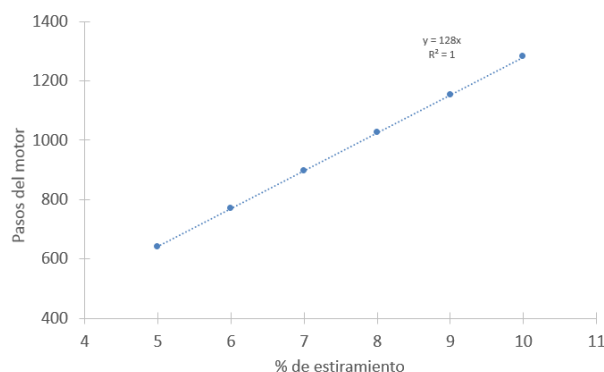


Figura 9. Número de pasos del motor en función del porcentaje de estiramiento del pocillo.

par motor de 3.2 Kg/cm, una inercia total de 3.5 Kg·m² y una corriente máxima de 1.2 A por bobinado.

Para una determinada frecuencia de estimulación se comprobó el rango de porcentajes de estiramiento posibles para los cuales la pieza móvil llega al final de su recorrido antes de empezar la siguiente estimulación. La frecuencia cardíaca en un ser humano adulto suele estar entre 60-100 pulsaciones por minuto que equivale a una pulsación entre 1000 ms y 600ms. En nuestro estudio se han considerado cuatro periodos diferentes en un rango desde los 700ms hasta los 1000ms. Se ha podido comprobar que hasta un 7% de estiramiento el motor cumple todos los periodos propuestos. A partir de 8% el motor ya no tiene suficiente velocidad para coordinar los dos estímulos (ver Tabla 1).

	5%	6%	7%	8%	9%	10%
700ms						
800ms						
900ms						
1000ms						

Tabla 1. Tabla gráfica de los límites de funcionamiento del motor según las condiciones de porcentaje de estiramiento y periodo. En verde, las condiciones en las que el motor funciona favorablemente y en rojo, las que funciona desfavorablemente.

4. Discusión

En el presente trabajo se ha logrado el diseño e implementación de un estimulador electromecánico coordinado para entrenar cultivos de células miocárdicas. El sistema es capaz de provocar un estímulo mecánico mediante estiramiento longitudinal y coordinarlo con el pulso bifásico eléctrico. Para poder llevar a cabo el control del sistema, se programó una interfaz de usuario controlado mediante una pantalla táctil, aunque también se puede controlar el sistema mediante una red inalámbrica Zigbee. Una de las ventajas de este sistema es que es completamente programable y, por tanto, podemos ajustar todos los parámetros de la estimulación, cosa que no podríamos hacer en otros sistemas comerciales.

Se han pensado diversas mejoras y actualizaciones que podrían implantarse en una versión futura de nuestro estimulador:

- El diseño de un estimulador más grande con un mínimo de cuatro pocillos elásticos para poder estimular más cultivos simultáneamente.
- Monitorizar en todo momento la posición de la pieza móvil del estimulador mecánico para poder moverla electrónicamente a la posición que deseamos desde la interfaz de usuario.
- Programar protocolos de estimulación para poder cambiar los parámetros del estímulo durante el tiempo del experimento.

5. Conclusión

Se ha diseñado y construido un sistema de estimulación electromecánica coordinado para el desarrollo de parches de tejido artificial. El uso de este equipo permitirá un mejor entendimiento del comportamiento electrofisiológico del tejido en diferentes condiciones de estiramiento y estimulación cardíaca.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido parcialmente financiado por el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (PI13-01882, PI13-00903) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Red RIC, PLE2009-0152).

Referencias

- [1] Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens TP, Radisic M. Challenges in Cardiac Tissue Engineering. *European Journal of Heart Failure*, vol 10, 2010, pp 169-87.
- [2] Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*, vol 27, 2006, pp 6052-63.
- [3] Bayes-Genis A, Soler-Botija C, Farré J, Sepúlveda P, Raya A, Roura S, Prat-Vidal C, Gálvez-Montón C, Montero JA, Büscher D, Izpisua Belmonte JC. Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol 49, 2010, pp 771-80.
- [4] Perez-Illzarbe M, Agbulut O, Pelacho B, Ciorba C, San Jose-Eneriz E, Desnos M, Hagege AA, Aranda P, Andreu EJ, Menasché P, Prósper F. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *European Journal of Heart Failure*, vol 10, sup 11, 2008, pp 1065-1072.
- [5] Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, Yeung AC, Johnstone BH, Yock PG, March KL. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*, vol 112, 2005, pp I150-I156.
- [6] Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattlechow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schäfer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB Journal*, vol 11, sup 8, 1997, pp 683-94.
- [7] Izquierdo-Albero R, Gómez-Cid L, Albert-Martínez R, Fuentes L, Hernández-Romero I, Guillem MS, Fernández-Santos ME, Atienza F, Fernández-Avilés F, Climent AM. Effect of in vitro mechanical stimulation on cardiac gene expression. *Actas del XXXIII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica*, Madrid, 2015, pp 293-6.