

Sistema de galvanotaxis para migración celular en medio de cultivo semisólido: Diseño y construcción del dispositivo generador de señales (Parte 1)

H. Pérez-Rubio^{1,2}, E. Porras-Martínez^{1,2}, E. Ortiz-Jacome^{1,2}, K. Moreno-Guerrero² e I. Chairez¹

¹Laboratorio de robótica médica y procesamiento de biosenales,UPIBI/IPN, Ciudad de México, México

²Laboratorio de tecnología ambiental,UPIBI/IPN, Ciudad de México, México

hectorperezrubio25@gmail.com, erika-porras@hotmail.com

Resumen— La galvanotaxis es un fenómeno biológico donde las células migran en presencia de campos eléctricos y los motivos por los que migra, aún siguen siendo desconocidos. Por esta razón, se desarrolló un sistema para generar señales eléctricas que puedan ser aplicados sobre un cultivo de microorganismos en medio semisólido. El sistema incluyó una interfaz gráfica de usuario o GUI que simplificó el ajuste de los parámetros de operación del generador de señales para inducir una migración celular controlada y la comunicación con un dispositivo de adquisición de imágenes para un posterior registro de la variación en la distribución de las células sobre el medio. En las pruebas del sistema electrónico de generación de señales se determinó que las señales generadas tuvieron un error medio cuadrático menor al 12% en el 80% de los casos evaluados. El sistema de cultivo aseguró la interfaz necesaria entre el generador electrónico por contacto directo (mediante electrodos de acero inoxidable) con el sistema de cultivo. En la segunda parte de este trabajo se establece un método para analizar cuantitativamente la migración de células de *Escherichia coli*.

Palabras clave— Campo eléctrico, Galvanotaxis, Migración celular, Generadores de señales digitalmente controlados, Interfaz gráfica de usuario.

I. INTRODUCCIÓN

A inicios de 2017, en México, se necesitaban 20,388 trasplantes, de los cuales, según datos del Centro Nacional de Trasplantes se resolvieron 7,128, lo que corresponde al 34.96% del total necesario [1]. Como respuesta ante esta problemática, se han desarrollado alternativas centradas en la regeneración de tejidos utilizando terapias celulares, sin necesidad de depender de un donante [2].

La ingeniería de tejidos ha buscado desarrollar estructuras tisulares que tengan la forma del órgano a sustituir. Una de las soluciones al problema de reproducir adecuadamente la forma de un tejido, en cuanto a direccionamiento de células *in vitro*, es la galvanotaxis [3]. La galvanotaxis se define como la migración direccionada de células, a partir de la interacción de un organismo vivo con estímulos eléctricos [4]. La migración celular varía de acuerdo con el tipo de campo eléctrico aplicado sobre el cultivo de un mismo tipo de células. Hasta el momento, las moléculas que sirven como “sensores”, señalizadores o ligandos para los campos eléctricos débiles siguen siendo desconocidas [5].

Debido a la importancia en el ámbito de las ciencias biomédicas que la galvanotaxis tendría en el desarrollo de órganos artificiales, el estudio del fenómeno galvanotáctico aplicado a la ingeniería de tejidos, como técnica para controlar la migración celular, requiere a la par de la creación de tecnología que pueda generar las señales adecuadas para

inducir la migración celular controlada para lograr la formación específica de estructuras celulares.

La contribución de este trabajo al área de la galvanotaxis fue diseñar y construir un dispositivo galvanotáctico que, mediante el desarrollo de una interfaz gráfica, permita generar señales eléctricas arbitrarias y preestablecidas, así como la asignación de la dirección en la que va a circular la corriente a través de un sistema de cultivo. El dispositivo generador de señales tiene que acompañarse de un sistema óptico que registre la migración celular por medio de un procesamiento y análisis de imágenes digitales, con el fin de comprobar el fenómeno de la migración inducida.

II. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del proyecto se propusieron cuatro etapas principales, las cuales se resumen en la Fig 1.

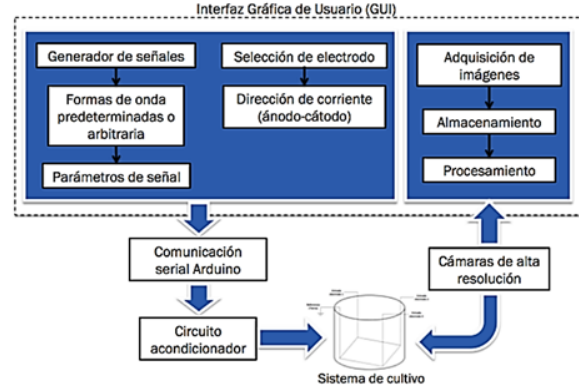


Fig 1. Proceso de desarrollo del sistema de galvanotaxis propuesto.

1) *Interfaz Gráfica de Usuario (GUI)*: Se desarrolló un generador de señales, capaz de emitir formas de onda basadas en la elección del usuario, de manera que este pudiera seleccionar una forma preestablecida, o bien, diseñarla totalmente de forma libre, mediante barras de desplazamiento manual o *sliders*. El dispositivo se diseñó para proporcionar al usuario la facultad de asignar los valores de frecuencia y amplitud a la señal, así como la dirección de la corriente.

2) *Circuito electrónico*: El dispositivo electrónico fue capaz de traducir la información digital, mandada desde la GUI, a una señal alterna con los parámetros de frecuencia, amplitud y forma, ya antes programados. Para ello, se utilizó un microcontrolador Arduino® Leonardo, que procesa los datos y un circuito acondicionador de señales analógicas para regular el offset y la amplitud final de la señal. El circuito acondicionador contempla las siguientes etapas: 1) filtro

pasabajas, 2) cambiador de nivel, 3) demultiplexor y 4) relevadores de estado sólido.

3) *Sistema óptico* Con la finalidad de detectar la dirección de migración de las células, se propuso el uso de un sistema óptico basado en una cámara digital de alta resolución marca y modelo *HD Logitech Pro C910* [6]. Las características de la cámara son: resolución de video 1080p a 16:9, campo visual diagonal (DFOV) 78°, distancia focal 4.3 mm y distancia del lente al sistema de cultivo variable (usando 8 cm). Esta cámara permite la adquisición de imágenes con suficiente resolución para que, posteriormente, puedan ser procesadas en la GUI y almacenadas de acuerdo con el algoritmo propuesto en la Fig 2.



Fig 2. Proceso de adquisición de imágenes.

4) *Sistema de cultivo*: La construcción del sistema de cultivo consistió en diseñar un medio nutritivo que permitió tanto el crecimiento como la migración celular y el ingreso de electrodos de acero inoxidable proveniente del exterior hacia el medio de cultivo, a través de la cual se conduce el estímulo eléctrico producido por el generador de señales. El diseño propuesto consiste en una base y una tapa (de manera similar al cultivo realizado en cajas Petri), que tiene cuatro puertos de entrada para realizar las conexiones de los electrodos con el generador eléctrico (Fig. 3).

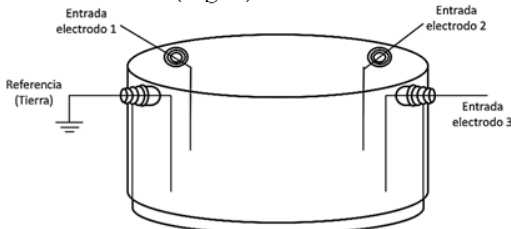


Fig 3. Representación de matriz de electrodos sobre recipiente de cultivo.

III. RESULTADOS

A. Generador de señales

En la GUI, el generador de funciones (Fig.4) representa la zona destinada para la programación de los parámetros de la señal eléctrica en el cual se pueden programar la 1) forma de onda (senoidal, cuadrada, sierra y rampa), 2) frecuencia (1 – 200 Hz) y 3) amplitud (1 – 20 Vpp).

Los rangos de frecuencia y voltaje se propusieron con base en los dispositivos desarrollados y evaluados previamente y que tienen objetivos similares [7], [8]. En la Fig 4 se muestra cómo se programa una señal arbitraria, su amplitud y frecuencia desde la GUI.

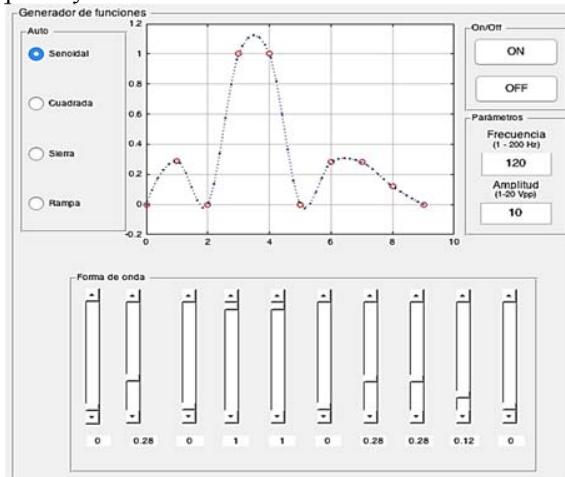


Fig 4. Programación del generador de una señal arbitraria mediante sliders.

B. Selección del electrodo

La GUI tiene una sección que permite realizar la selección de los electrodos empleados para aplicar la señal eléctrica. Esta selección permite al usuario controlar la dirección preferencial de la corriente eléctrica aplicada en el medio de cultivo. Estos electrodos se trasladan hacia el interior del sistema de cultivo y son los encargados de transferir la corriente eléctrica que induce la migración celular.

Los electrodos están hechos de acero inoxidable y tiene forma de alambre con un diámetro de 0.2 mm. La elección de materiales para los electrodos se realizó de manera que, la corriente que circule por los mismos durante el envío de los estímulos, no afecte la composición fisicoquímica del medio o que pueda generar ambientes tóxicos para el crecimiento (Fig. 5).

C. Sistema óptico

El registro de la migración celular se realizó mediante un sistema óptico y se halla delimitado con color verde en la Fig 5. El sistema incluyó los elementos de programación gráfica que admite la adquisición, almacenamiento y procesamiento de la imagen del medio de cultivo semisólido.

D. Circuito electrónico

El circuito electrónico recibe la información desde la GUI, procesó el conjunto de datos y genera la señal, de forma que se aplique el campo eléctrico sobre el sistema de cultivo. Se realizaron pruebas de funcionamiento al generador de señales, comparando los parámetros de amplitud, frecuencia y forma de onda entre las señales de salida y las programadas a través de la GUI desarrollada en MatLab®.

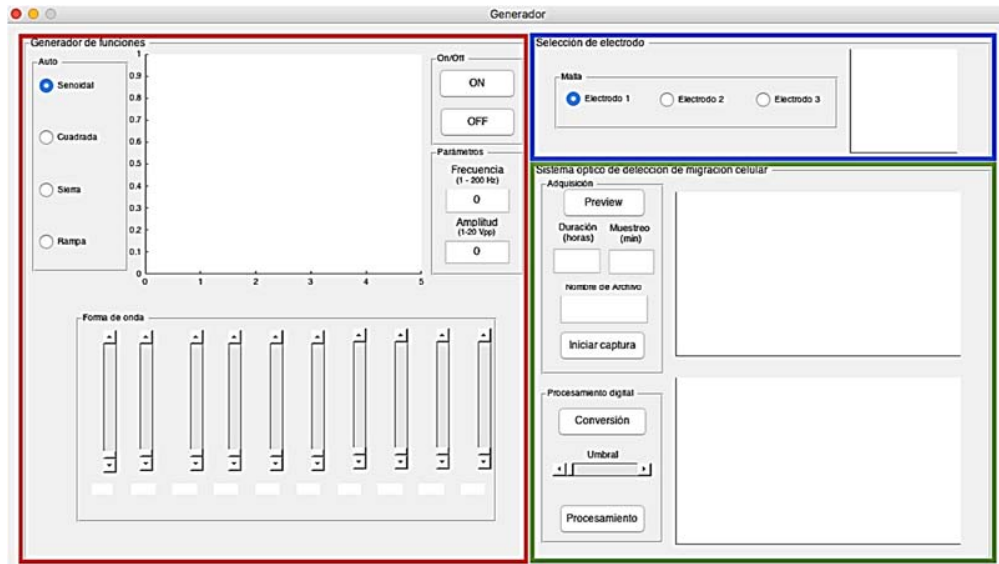


Fig 5. Interfaz gráfica de usuario para dispositivo galvanotático. La forma de onda puede ser tanto predeterminada como diseñada por el usuario (mediante sliders). (Recuadro rojo). Se colocaron diez sliders (que representan puntos en una gráfica), los cuales se interpolaron de tal manera que se genera una función continua. A cada señal se le asigna frecuencia y amplitud. Este sistema se diseñó de tal modo que permitiera la selección de dos electrodos diferentes (ánodo y cátodo), indicando el sentido de la corriente. (Recuadro azul). En el GUI se puede inicializar la captura de fotos con el botón “Preview”, posteriormente se introduce el tiempo del experimento y el lapso de fotos para ser almacenadas y procesadas. (Recuadro verde)..

E. Sistema de cultivo

El recipiente de cultivo está diseñado para la estimulación por contacto directo con electrodos de acero inoxidable (Fig 6). Los puertos añadidos en la tapa proporcionaron las entradas para los electrodos y una comunicación directa con el circuito externo para la inyección de la corriente eléctrica sobre el medio de cultivo.

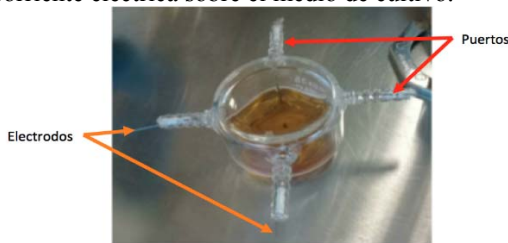


Fig 6. Sistema de cultivo con matriz de electrodos en el medio semisólido.

IV. DISCUSIÓN

A. Generador y circuito electrónico

Se realizaron pruebas de funcionamiento al generador de señales, comparando los parámetros de amplitud, frecuencia y forma de onda entre las señales de salida y las programadas a través de la GUI desarrollada en MatLab®. Para esta parte de la evaluación, se utilizó un osciloscopio Agilent Technologies®, modelo DSOX2002A (Fig 7).

Para verificar cuantitativamente que la señal generada por el circuito se aproxima a la señal programada, se calculó el error medio cuadrático obtenido entre ambas señales. Este

error se calculó en cada una de las señales programables desde la GUI, a partir de la ecuación (1):

$$e = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (1)$$

Donde, \hat{y}_i = Señal programada, y_i = Señal real muestreada y n = Número de muestras. Para realizar evaluaciones más específicas, las formas de onda se programaron a una frecuencia de 50 Hz y con una amplitud de 2.5 Volts. Éstas se muestrearon a una frecuencia de 200 Hz con el microcontrolador Arduino® Leonardo y se analizaron en MatLab®. En la Fig 8 se observa un ejemplo de una señal senoidal programada desde la interfaz comparada con la señal real y el error acumulado.

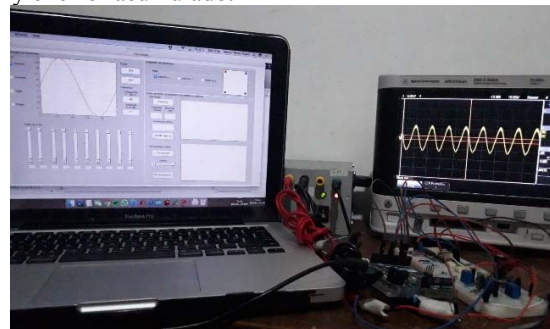


Fig 7. Medición con osciloscopio de la señal programada desde la GUI.

La Tabla 1 muestra un resumen de las formas de señal que se evaluaron considerando los programas en la interfaz.

El valor medio cuadrático caracterizó la exactitud del generador de señales. Nótese que en un solo caso se obtuvo en error superior al 10%, el cual se presentó por las variaciones abruptas de la señal programada (forma cuadrada).

Tabla 1. PORCENTAJES DE ERROR DE SEÑALES AJUSTADAS EN LA GUI.

Señal	Porcentaje de error
Senoidal	1.36 %
Rampa	7.05 %
Triangular	0.84 %
Cuadrada	11.48 %
Arbitraria	8.49 %

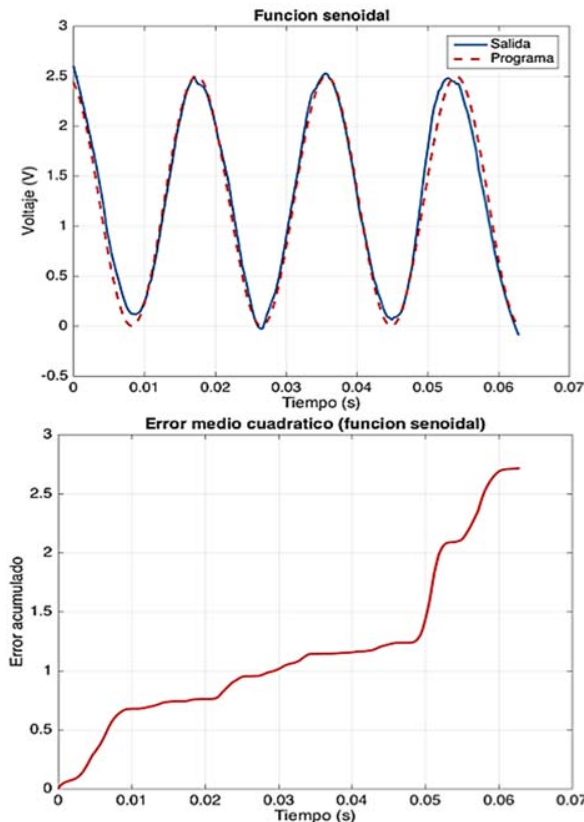


Fig 8. Comparación entre una señal senoidal programada y la real obtenida del dispositivo galvanotáctico (arriba). Medición del error acumulado (abajo).

En la Fig 9 se muestran los tres componentes principales que forman el dispositivo galvanotáctico completo. El círculo azul señala el dispositivo electrónico generador y acondicionador de señales. El sistema de cultivo delimitado por el círculo verde y, para registrar la migración celular, se tiene una cámara de alta resolución, que se comunica a la GUI, en la parte inferior al sistema de cultivo (círculo rojo). El sistema de adquisición de imágenes se construyó para su posterior evaluación de la migración de células cultivadas.

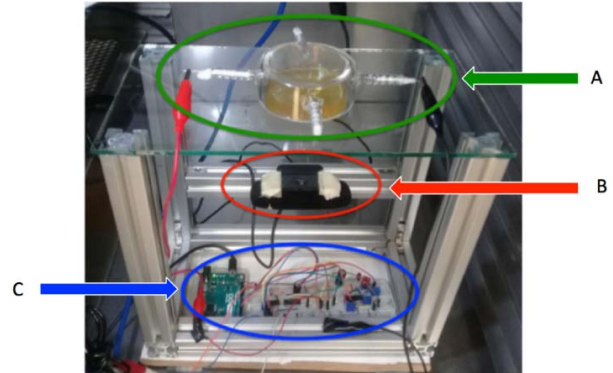


Fig 9. Montaje completo de dispositivo galvanotáctico.

V. CONCLUSIÓN

En este trabajo se concretó la construcción de un dispositivo electrónico generador de señales con una GUI amigable al usuario para ser implementado en el estudio del fenómeno galvanotáctico. Se desarrolló un generador de funciones alternas con parámetros de forma de onda, frecuencia y amplitud personalizables desde una GUI. Se demostró, que el generador fue capaz de construir las señales programadas con un error medio cuadrático por debajo del 10% en el 80% de los casos evaluados. Esta evaluación se realizó de forma independiente al sistema de generación, lo que asegura la objetividad del estudio de validación. La construcción del sistema de cultivo permitió el ingreso de los electrodos, provenientes del circuito electrónico, al interior del recipiente de cultivo. El análisis de todo el sistema demostró su viabilidad para realizar experimentos de migración celular, los cuáles se desarrollan en la segunda parte de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Centro Nacional de Trasplantes, «Resultados 2017,» México, 2017.
- [2] P. Hernández R., «Medicina regenerativa II. Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular,» *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, vol. 22, n° 1, 2006.
- [3] R. Balint, N. J. Cassidy y S. H. Cartmell, «Electrical Stimulation: A Novel Tool for Tissue Engineering,» *Tissue Engineering*, vol. 19, n° 1, 2013.
- [4] W. A. Nagel, «Ueber Galvanotaxis,» vol. 59, n° 11, p. 603, 1895.
- [5] N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto y M. Ishikawa, «A physical model for galvanotaxis of Paramecium cell,» *Science Direct*, 18 Abril 2006.
- [6] Logitech, «Productos,» 2018. [En línea]. Available: http://support.logitech.com/es_es/product/hd-pro-webcam-c910/specs. [Último acceso: 11 mayo 2018].
- [7] Y. Yuan, M. He, Y.-W. Zou y Z.-B. Huang, «An Adjustable Electrical Stimulator for Cell Culture,» *Journal of Circuits, Systems, and Computers*, vol. 25, n° 11, p. 21, 2016.
- [8] I. Zironi, L. Boccioletti, F. Amorini, G. Castellania y A. Gabrielli, «A prototype electronic board to investigate galvanotaxis phenomena,» *Journal of Instrumentation*, vol. 12, 2017.