

## Desarrollo e implementación de una cámara de recirculación termostatizable para microscopía *in vivo*

Valeria Sigot; Carolina Galetto; Gastón L. Miño; María F. Sampedro

Autores: Laboratorio de Microscopía Aplicada (LAMAE), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB-CONICET-UNER).  
Contacto: [valeria.sigot@uner.edu.ar](mailto:valeria.sigot@uner.edu.ar)

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/39ixitn8x>

### Resumen

Actualmente, las cámaras y dispositivos comerciales que controlan el medio de incubación de una muestra biológica para microscopía óptica tienen en general sólo control térmico unidireccional y suelen ser equipos muy costosos, no siempre disponibles para todo tipo de plataformas de microscopios y difíciles de manipular. Es deseable entonces generar configuraciones adaptables y en lo posible con un control térmico bidireccional del medio de incubación.

El prototipo denominado Cámara de Recirculación Termostatizable (CRT), consiste en un ensamble de módulos impresos, por los que circula agua termostatizada mediante una celda Peltier y una bomba hidráulica. En el marco de este PID se avanzó en la implementación de nuevos esquemas de programación del controlador digital para optimizar el funcionamiento del Peltier, con la bomba hidráulica y en la compactación del control electrónico para que sea portable y operable en forma segura en la sala de microscopía. El objetivo final es lograr el control bidireccional de temperatura dentro de la cámara propiamente dicha donde se coloca el medio de incubación y el espécimen; e implementar su uso para la visualización de embriones y larvas de pez cebra, modelo animal sobre el que se desarrollan varias líneas de investigación en FI-UNER.

Palabras clave: cámara de recirculación termostatizable, impresión 3D, microscopía *in vivo*, sistemas de microfluídica, pez cebra

## Objetivos propuestos y cumplidos

El presente proyecto amplía y mejora el diseño de la CRT cuyo primer prototipo fue parte de un proyecto final de grado de Bioingeniería 1. Se planteó como objetivo general optimizar y mejorar los sistemas de control digital y de potencia del prototipo para alcanzar y mantener la estabilidad térmica del medio de incubación durante la observación microscópica de embriones de pez cebra (28°C) o cultivos celulares (37°C).

En el último año del proyecto y para poder realizar ensayos con la CRT en forma reproducible y segura se decidió priorizar el diseño del control del dispositivo por software y la compactación en un gabinete para que fuera portable y trasladable en forma segura a la sala de microscopía.

En la configuración final alcanzada se realizaron pruebas de funcionamiento (calentamiento-enfriamiento) y se hicieron los primeros registros de estabilidad térmica a potencia variable.

Dado que las resinas poliméricas utilizadas para la impresión 3D de los módulos encastrables de la CRT se deformaban con los cambios de temperatura se hizo una adaptación a una cámara de recirculación de acero quirúrgico 2.

Como innovación, se fabricaron sistemas de microfluídica adaptable a la CRT con el fin de inmovilizar a los embriones y ensayar suministro de drogas a distintas dosis en simultáneo a temperatura controlada.

## Marco teórico y metodológico

La visualización de procesos morfogénéticos en especímenes gruesos *in vivo* es posible con la disponibilidad de técnicas de microscopía óptica de alta resolución "espacio-temporal"<sup>3-5</sup>. Sin embargo, para observar embriones o larvas sub-milimétricos con geometrías que varían durante el desarrollo, o para monitorear procesos de varias horas como la migración celular o regeneración de tejidos, es necesario contar con cámaras de observación diseñadas para tales aplicaciones. Esto exige como solución la construcción de cámaras versátiles que permitan orientar al espécimen y mantener su viabilidad, que sean fáciles de ensamblar y compatibles con todo tipo y marcas comerciales de microscopios. En particular, para los estudios *in vivo* que se extienden a períodos de horas o días, la observación microscópica requiere un control estricto de la temperatura en el medio de incubación.

Los sistemas de control térmico conforman una parte importante dentro de las herramientas de trabajo de la biología, puesto que una variación mínima de temperatura puede afectar la viabilidad celular en cultivo, la velocidad de desarrollo de un organismo influir en la determinación del sexo<sup>6</sup>.

En general, las salas de microscopía se mantienen a temperaturas cercanas a 20 °C para asegurar la vida útil de los componentes electrónicos de los equipos de última generación. Sin embargo, cuando las observaciones se extienden a horas, esta temperatura no es óptima para la mayoría de organismos modelo (25-28°C) o para el cultivo celular o de tejidos (37 °C). En sistemas más avanzados, ésta se controla con costosas cámaras climatizadas y platinas de calentamiento acopladas al microscopio.

El pez cebra (*Danio rerio*) se utiliza como organismo modelo en distintos campos de investigación<sup>7-9</sup>. La similitud de su desarrollo embrionario con el de otros vertebrados superiores y la alta homología genética con el ser humano lo han convertido en la

última décadas en uno de los organismos modelo más utilizado en experimentación biomédica<sup>8,10,11</sup>. Como ventaja adicional, su transparencia óptica permite visualizar el desarrollo embrionario externo en tiempo real. La mayoría de las cámaras de montaje o contención apuntan a orientar e inmovilizar a los embriones, pero no todas son termostatzables y están limitadas al uso de lentes objetivas en aire de 4X y 10X<sup>8,12,13</sup>. En FI-UNER, el pez cebra se utiliza en estadíos embrionarios y larvales como modelo animal para ensayos de penetración transdérmica de drogas, regeneración de tejidos y morfogénesis epitelial. Estos procesos se monitorean mediante microscopía de fluorescencia en tiempo real a una temperatura de 24°C, por debajo de la óptima para la cría de este modelo (28°C).

En este proyecto se propuso además combinar la tecnología de los dispositivos microfluídicos por litografía blanda para el cultivo celular con la plataforma termostatzable a desarrollar, permitiendo de esta manera potenciar a la herramienta CTR y cubrir un mayor número de aplicaciones<sup>14</sup>. Dentro de estas aplicaciones podemos citar algunos ejemplos, en los cuales el diseño de distintos dispositivos, permite estudiar diferentes procesos celulares y tisulares<sup>15</sup>. Si bien los dispositivos microfluídicos en su mayoría producen ambientes nutricionales adecuados para el mantenimiento celular o tisular, en muchas aplicaciones se necesita controlar la temperatura de estos procesos.

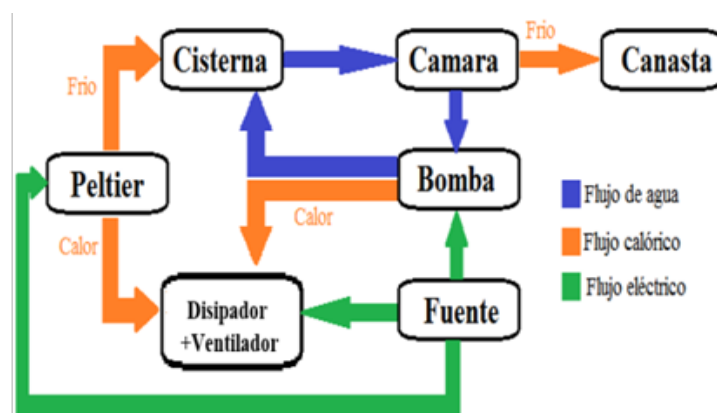
El presente proyecto se sustentó en los avances obtenidos previamente con un prototipo fabricado mediante módulos encastrables obtenidos mediante impresión 3D que conforman una cámara de recirculación de agua termostatzable (CRT) mediante una celda Peltier<sup>1</sup>.

Metodológicamente se puede describir en tres etapas:

## Etapa I

### Ensayo del funcionamiento de los bloques del equipo (CRT, módulo frío-calor y bomba hidráulica) por separado y en su conjunto

En primer lugar, se verificó el funcionamiento individual de los módulos correspondientes al sistema de alimentación, refrigeración/calefacción y bomba hidráulica del prototipo original, presentado en el plan. En la Figura 1 se muestra el esquema de circulación cerrado del agua, el flujo calórico y el eléctrico entre los módulos.



**Figura 1:** Esquema del flujo calórico, eléctrico y de agua del sistema

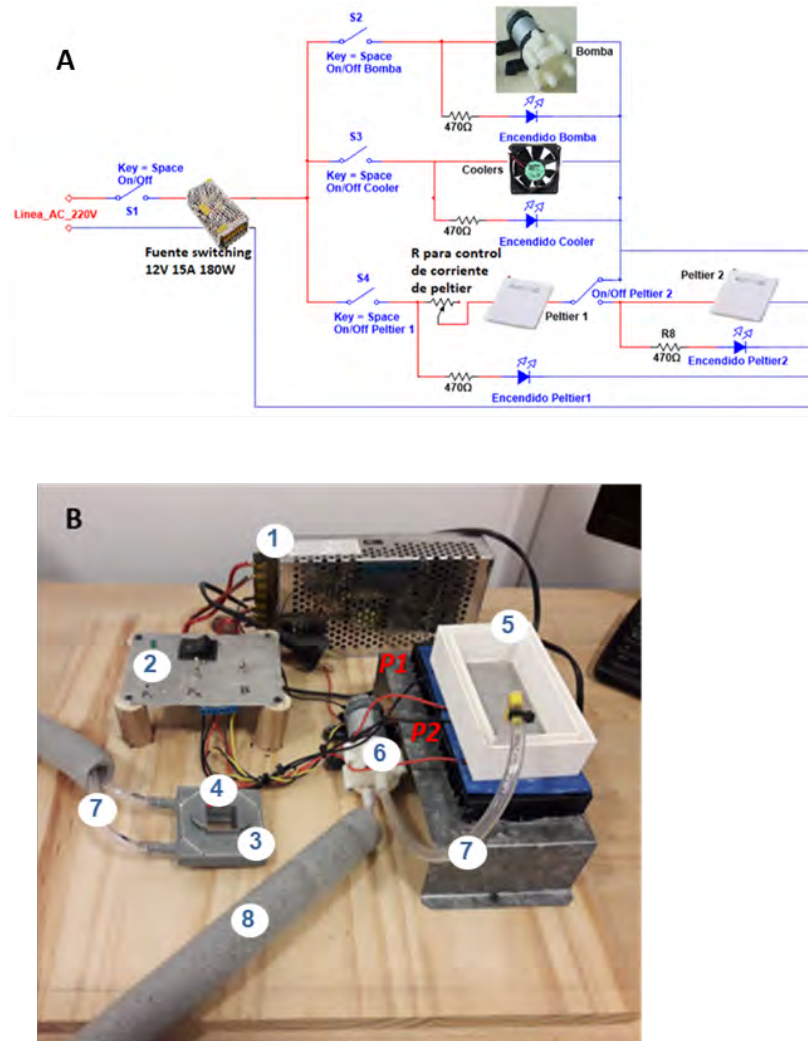
Una primera modificación en el circuito fue el reemplazo del intercambiador tér-

mico de aluminio con un volumen limitado a 10 ml de agua del diseño original, por un reservorio de paredes de plástico y base de aluminio denominado “cisterna”, con una capacidad de 60 ml. Este reservorio fue impreso en plástico en el Laboratorio de Prototipado e Impresión 3D de FIUNER por lo que pudo modificarse y reimprimirse permitiendo cambios de configuración durante las pruebas. Otra modificación significativa sobre el módulo frío/calor fue el agregado de una segunda celda Peltier conectada eléctricamente en serie a la primera. Luego, para poder evaluar el efecto de estas modificaciones sobre el funcionamiento del dispositivo se diseñó e implementó un circuito de prueba (Figura 2A).

El circuito consta de interruptores de encendido/apagado que permiten seleccionar los diferentes componentes activos (bomba hidráulica, disipadores y celdas Peltier) variando la configuración espacial de los mismos durante los ensayos de termostatzación de la CRT. Para el montaje del prototipo (Figura 2B) ambas celdas Peltier se colocaron una al lado de otra (configuración alineada), con las caras “que enfrían” orientadas hacia arriba, en contacto directo con la base de aluminio de la cisterna. Por debajo de las celdas se ubicaron los disipadores y a lado se colocó la bomba hidráulica.

Las partes encastrables de la CRT (Fig. 2B-3, 2B-4) fueron fabricadas en el Laboratorio de Prototipado e impresión 3D de FIUNER utilizando resinas poliméricas de la línea Fullcure, si bien éstos materiales permitieron hacer pruebas en el prototipo original, resultaron altamente higroscópicos. Además, se deformaron al hacer recircular agua a 40 °C, produciendo fallas de encastrado, pérdida de agua y burbujeo en el interior de la cámara. Luego, se imprimió la CRT en ABS (acrilonitrilo butadieno estireno), plástico de mayor resistencia mecánica y térmica que las resinas Fullcure disponibles, aunque a expensas de una menor resolución en la impresión 3D.

Una vez realizado el encastrado y sellado, la CRT se conectó a la cisterna y al circuito de recirculación de agua. Se llenó la cisterna con agua, y se encendió sólo la bomba hidráulica, una vez llena la CRT y purgado el circuito, se lo dejó funcionar a temperatura ambiente por más de una hora, sin observar pérdidas de agua. No se hizo registro de temperatura en esta etapa.



**Figura 2:** Configuración del prototipo de prueba para dos celdas Peltier alineadas (P1 y P2). A) Esquema del circuito auxiliar utilizado para fijar la temperatura. B) Imagen de los componentes fijados a soporte de madera impermeabilizada.

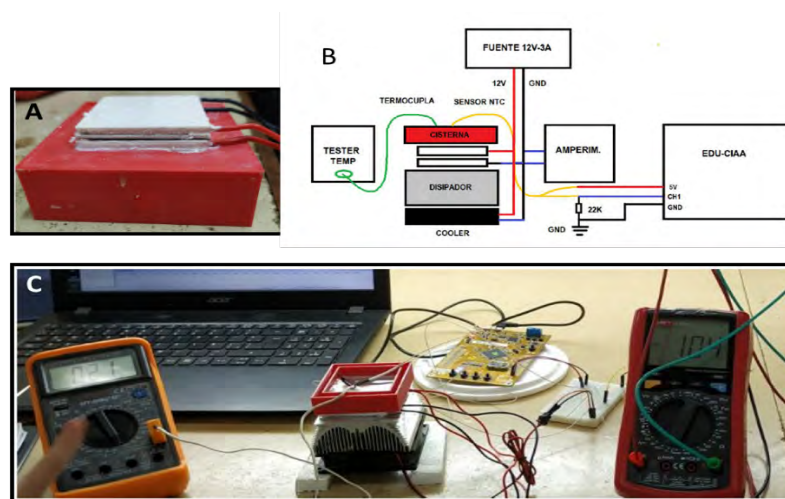
1-Fuente, 2-Interruptor de encendido apagado, 3-CRT, 4-Canasta de incubación para espécimen con base de cobreobjeto, encastrada en la CRT. 5- Cisterna, su base metálica está en contacto con ambas celdas Peltier, 6-Bomba de agua, 7-Mangueras de silicona para la circulación del agua desde la cisterna (una salida) y hacia la CRT (dos entradas), 8-Aislante térmico.

**Programación del sistema de control digital del Peltier y control de potencia de la bomba hidráulica**

Se realizó un procedimiento para obtener las características principales de la fuente de corriente, del controlador de potencia de la bomba hidráulica y de las celdas Peltier. Para esto se utilizó una fuente variable, un multímetro para registrar el valor de corriente entregada a las celdas Peltier, un multímetro con su termocupla para registrar también los valores de temperatura del agua contenida en la cisterna, un disipador y un “cooler” para evitar que las celdas se quemen, un sensor NTC 100k y una placa EDUCIAA para registrar los valores de temperatura en una PC.

Para caracterizar el consumo de corriente en la etapa de refrigeración las celdas Peltier que en la configuración previa (Fig 2B, P1 y P2) estaban alineadas, se configuraron espacialmente en forma apilada (cara caliente/cara fría/cara caliente/cara fría) y se colocaron con grasa siliconada sobre la base de la cisterna (Figura 3A). Luego se colocó la cisterna sobre un disipador, se incorporó el sensor NTC y la termocupla del multímetro adentro de la cisterna (Figura 3B-C). Se conectó el multímetro en serie a la salida de las placas Peltier para medir el amperaje y se conectaron las celdas y el ventilador a la fuente variable.

Se comenzó aplicando valores bajos de voltaje hasta visualizar un valor de 2A en el multímetro. En paralelo se registraron los valores de temperatura. Se observó que al alimentar las celdas Peltier con un valor máximo de 2A a través de un controlador LN298n, la temperatura del agua alcanzó un mínimo de 17 °C y un máximo de 30 °C, rango de temperatura acotado para los requerimientos experimentales (hasta 40°C). Se concluyó que era necesario suministrar un mayor amperaje por lo que se adquirió un controlador de motor VNH3SP30 que puede entregar un continuo de 9 A.



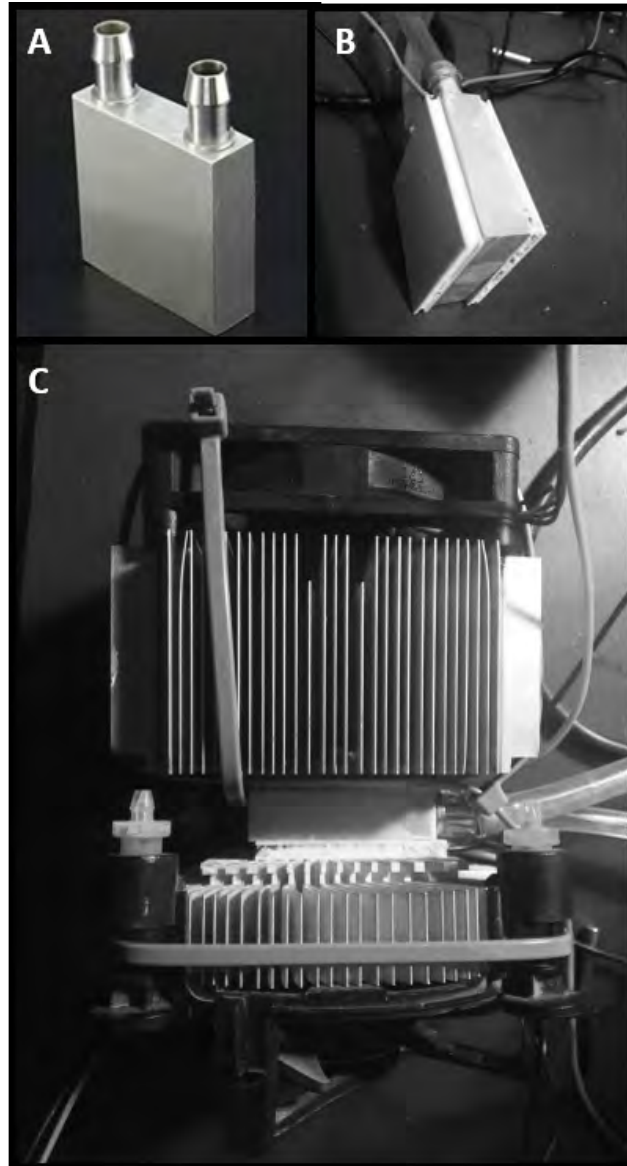
**Figura 3:** Caracterización del consumo de corriente en la etapa de refrigeración del agua de la cisterna. A) Celdas Peltier conectadas en serie en el circuito eléctrico en configuración apilada y apoyadas sobre la base de la cisterna. B) Esquema de conexión eléctrica. C) Montaje y ensayo para caracterizar el consumo de corriente.

Estas actividades se realizaron activando los componentes en forma manual hasta poder lograr el control digital automatizado a través de Arduino.

## Etapa II

### Incorporación de bloque de enfriamiento y disipadores

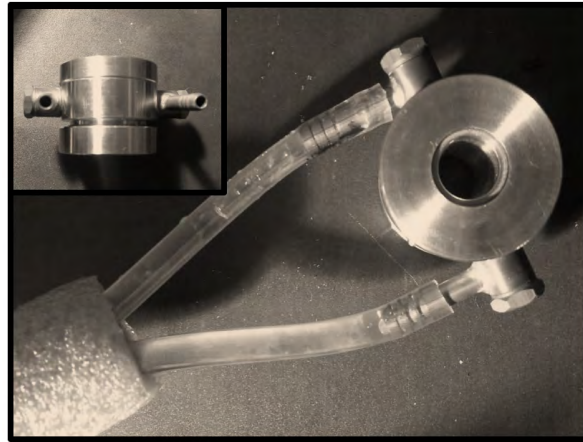
Entre las modificaciones realizadas en esta etapa se incorporó un bloque de enfriamiento de agua fabricado en aluminio (Figura 4A) mejorando la transmisión de calor hacia y desde las celdas Peltier en la configuración “apilada” (Figura 4B) logrando una temperatura mínima de 15°C desde una temperatura ambiente inicial de referencia de 24°C. Luego, en las caras externas se colocaron los disipadores y coolers (Figura 4C).



**Figura 4:** Configuración del sistema de celdas Peltier, bloque de aluminio y disipadores. A) Bloque de aluminio para la circulación de agua a termostatar B) incorporación de las celdas Peltier en configuración apilada, con sus caras “frías” en contacto con el bloque de circulación de agua. C) Incorporación de los disipadores de convección en contacto con las caras “calientes” de las celdas Peltier y coolers respectivos.

### **Cámara de recirculación metálica con base de cubreobjetos para el montaje de muestra**

Durante las pruebas de recirculación de agua al aumentar a temperatura a 40 °C se observó una deformación de los materiales impresos que conformaron la CRT propiamente dicha y la canasta para espécimen (Fig. 2B, 3,4) que generaron fallas de encastre, pérdida de agua y burbujeo en el interior de la cámara. Por lo tanto, se optó por utilizar una cámara de recirculación de agua, cilíndrica fabricada en acero quirúrgico<sup>2</sup> (Figura 5), la misma se sella en la base con un cubreobjetos generando un pocillo de incubación con una capacidad máxima de 3 ml de medio líquido para el montaje de la muestra biológica.

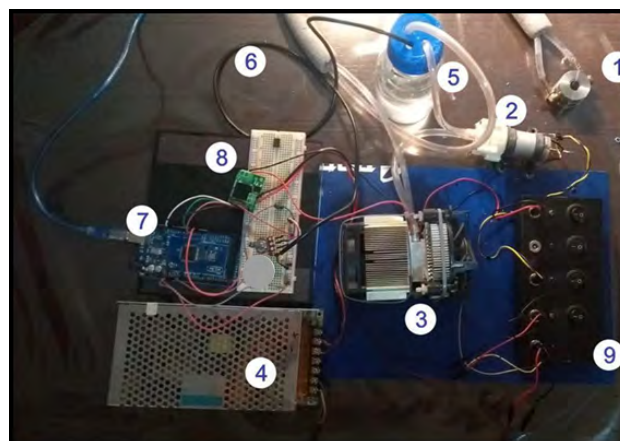


**Figura 5:** Cámara cilíndrica para espécimen en acero quirúrgico, la base se cierra con un cubreobjetos circular de 18 mm sujeto con un O-ring para generar un pocillo análogo a la canasta de incubación en la CRT original.

Adicionalmente se reemplazó la cisterna abierta (Figura 2B, 5) por un recipiente de vidrio cerrado denominado tanque cisterna (Figura 6, 5) con la finalidad de mantener constante el volumen de agua de termostatzación. Se observó que no se formaban burbujas al succionar el líquido desde el fondo del tanque con el retorno en la superficie.

Como avance hacia el sistema de control final se incorporó un sensor digital DS18B20 con cubierta impermeable con rango de temperatura de medición dentro de los parámetros objetivos con el cual se digitalizaron las mediciones de temperatura hacia la PC, con la finalidad de estimar los parámetros del sistema para el control.

A través de un microcontrolador Arduino Mega 2560 con una entrada analógica (potenciómetro) se logró variar la salida PWM para alimentar las celdas Peltier por medio de un driver MD01B. Este driver permite abastecer con la suficiente corriente que precisa la celda de Peltier, la cual no puede ser proporcionada por el micro. En este momento la cantidad de potencia que alimenta al sistema de celdas Peltier lo proporciona el microcontrolador Arduino con el Driver MD01B siendo regulado por el usuario a través de un potenciómetro.



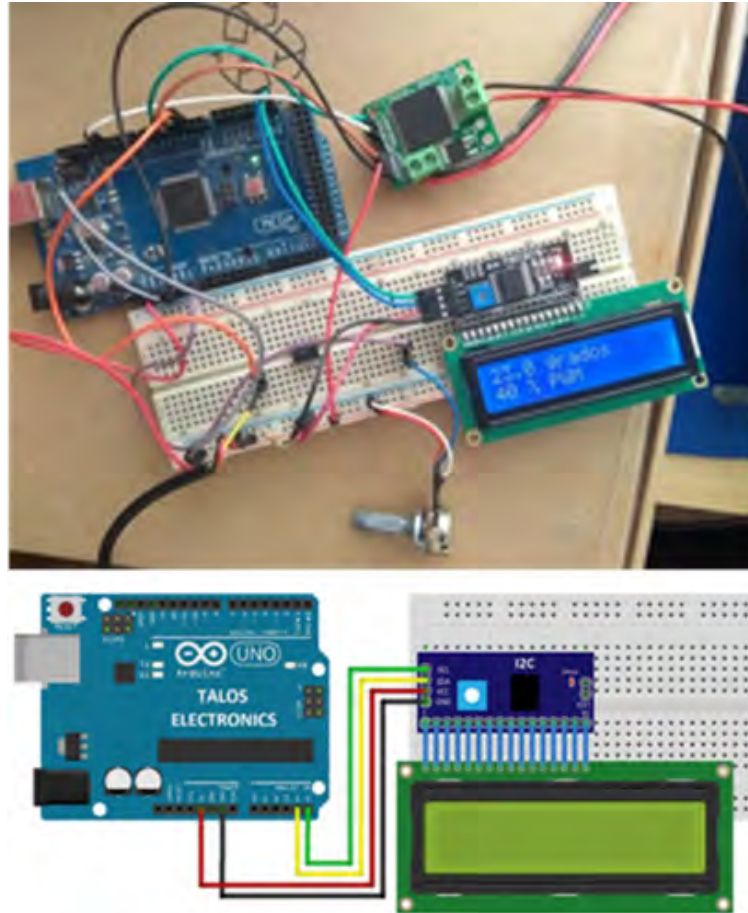
**Figura 6:** Sistema completo en su configuración actualizada. 1-Cámara porta muestra en acero quirúrgico. 2-Bomba hidráulica. 3-Sistema Peltier-Bloque aluminio-Peltier con sus respectivos disipadores y coolers. 4-Fuente de alimentación. 5-Tanque cisterna. 6-Sonda de temperatura DS18B20. 7-Controlador Arduino Mega 2560. 8-Driver MD01B. 9-Panel de conexión.



## Etapa III

### Incorporación de pantalla LCD para visualización de datos

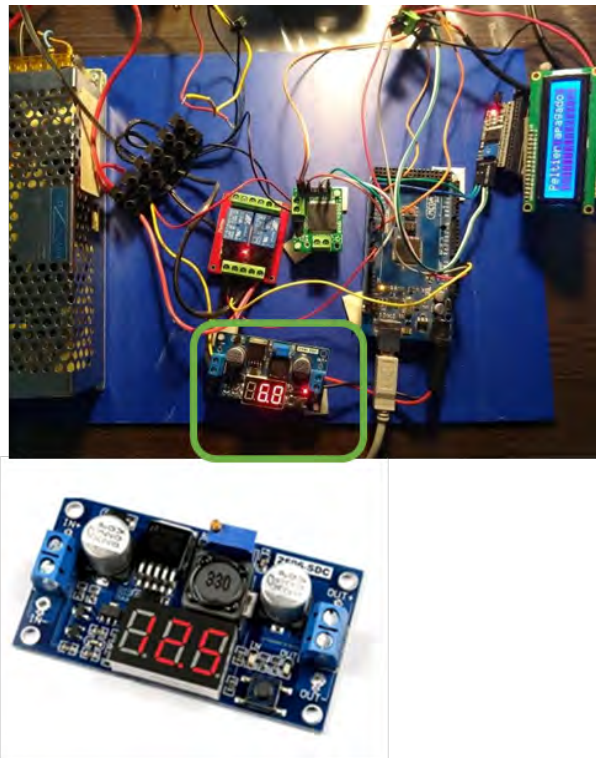
Para facilitar el acceso a la lectura de los datos del sensor de temperatura e independizar el sistema de una computadora se incorporó una pantalla LCD 1602 y un módulo I2C que permite reducir la cantidad de 16 cables de conexión al Arduino a solo 4 (Figura 7). A través de esta pantalla LCD se pueden visualizar datos como la temperatura del sistema, temperatura deseada, potencia de la placa de Peltier, tiempo de funcionamiento del sistema y parámetros ingresados por el usuario.



**Figura 7:** Conexionado de pantalla LCD1602 utilizando un módulo I2C (panel superior). Esquema del conexionado reducido a cuatro cables (panel inferior).

### Alimentación de la placa Arduino independiente de la PC

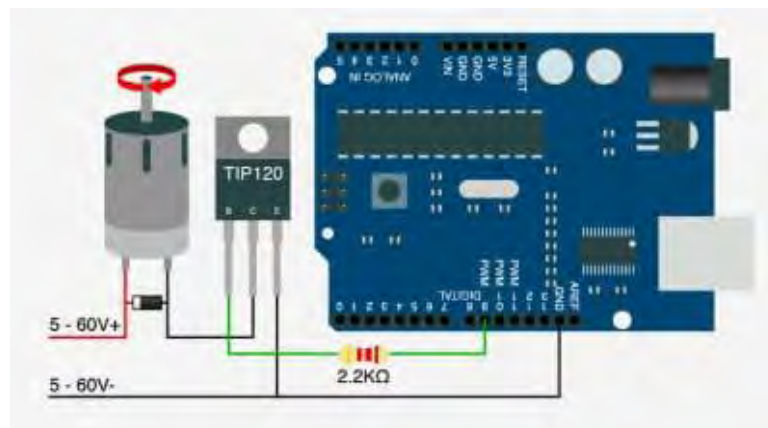
Otras de las necesidades para independizar el sistema de la conexión a la PC era la necesidad de alimentar la placa Arduino a través de su conector Jack de corriente continua que hasta el momento se hacía a través de un USB de PC. Para esto, se utilizó un convertidor de voltaje Lm2506 *step down* que permite utilizar los 12 Voltios de la fuente de alimentación del sistema y obtener una salida de 5 Voltios suficiente para alimentar el Arduino y todos los componentes conectados al mismo (Figura 8).



**Figura 8:** Incorporación de un convertidor de voltaje Lm2605.

### Sustitución de encendido manual de bomba de agua y disipadores

Otros de los avances fue el encendido electrónico de la bomba de agua y ventiladores comandados por el Arduino. Para eso se utilizó primero un arreglo de relés que permiten encender y apagar con voltajes altos (12 Voltios para el caso de estos componentes) mandando una señal de bajo voltaje desde el Arduino. Así además se esperaba automatizar por medio de programación el encendido y el apagado. Sin embargo, se observó la presencia de ruido magnético que producía la bomba en los relés, por lo que se decidió reemplazar el sistema de relés que comandaba el encendido de la bomba de agua y coolers por un transistor de potencia, (Figura 9).

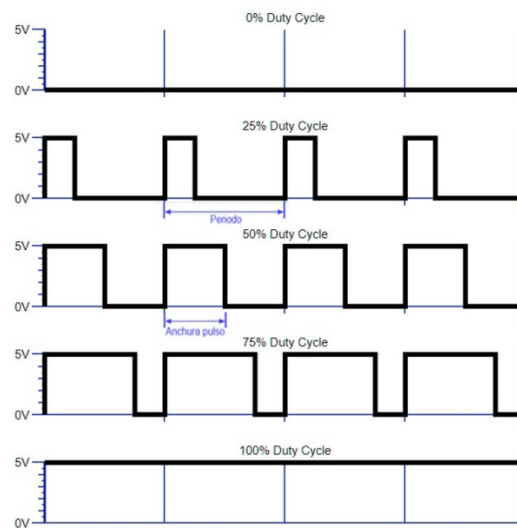


**Figura 9:** Esquema de conexionado del transistor de potencia.

## Modulación por ancho de pulso

Para alimentar la celda de Peltier se utilizó el método de modulación por ancho de pulso (PWM - pulse-width modulation) el cual consiste aplicarle tensión a la celda con una señal cuadrada (Figura 10) a la cual se le modifica el ciclo de trabajo (*duty-cycle*), o tiempo en que la señal se encuentra en estado alto en relación con el período de la señal, con la finalidad de aplicarle más o menos energía a la celda Peltier y evaluar cómo responde el sistema. A mayor ancho de pulso mayor energía se trasmite a la celda y mayor es el aporte de temperatura.

Este método se utilizó ya que anteriormente la celda fue alimentada con una señal que le aportaba energía en todo el ciclo (100% *duty cycle*) lo cual llevaba al sobrecalentamiento y daño.



**Figura 10.** Señal cuadrada con distintos anchos de pulso de menor a mayor energía.

## Control del Arduino por PID (Proporcionalidad, Integración, Derivación)

Un controlador PID (Proporcionalidad, Integración, Derivación) calcula un valor de "error" como la diferencia entre una medida de "Entrada" en este caso la temperatura inicial de referencia y un punto de ajuste deseado, en el sistema sería la temperatura final consignada. El controlador intenta minimizar el error ajustando un valor de "Salida" tratando de hacer que la entrada sea igual a la temperatura consignada. Los parámetros de ajuste son  $K_p$  (constante de Proporcionalidad),  $K_i$  (constante de Integración),  $K_d$  (constante de Derivación) y *setpoint* (consigna o temperatura a la que queremos regular el sistema). Para el dispositivo de termostatzación estos parámetros se obtuvieron en forma empírica y luego se realizaron las pruebas de funcionamiento (ver Resultados).

En el micro-controlador Arduino se utilizó la biblioteca "Arduino PID" que permite aplicar un sistema de control PID reutilizando códigos ya existentes. Se aplicó entonces una función cuyos parámetros de entrada son las constantes antes mencionadas y la temperatura de consigna.

A través de un método iterativo el microcontrolador va calculando cuanta energía debe aplicarle a la celda Peltier en función del error que calcula a través de la temperatura leída hasta lograr minimizar ese error a cero, lo que significa que la temperatura del sistema es igual a la temperatura de consigna. Estos valores de temperatura se registraron en tiempo real a través de la comunicación entre el microcontrolador y la PC por puerto USB utilizando el programa CoolTerm y posteriormente, se graficaron.

### Fijación del sistema de termostatzación y ventiladores

En el denominado módulo frío-calor se encuentra la celda Peltier, el bloque de aluminio por donde recircula el agua a termostatzar y los disipadores. Esta configuración (Figura 11) resultó más eficiente para la disipación del calor respecto a las ensayadas anteriormente. Para fijar esta configuración se realizaron soportes en plástico por impresión 3D, uno (en rojo) para mantener en contacto el bloque de aluminio con una cara del Peltier y el otro soporte (en gris), para mantener unido el disipador con los dos ventiladores.



**Figura 11:** Módulo frío-calor donde se muestra la fijación de la celda Peltier con el bloque de aluminio al disipador y ventiladores mediante piezas impresas en 3D.

### Incorporación de un gabinete para la electrónica y montaje del sistema de recirculación termostatzable

El sistema de control digital y de potencia se colocó en un gabinete plástico termoformado, portable y separado de los componentes del circuito de agua: módulo frío-calor, mangueras de silicona con aislante térmico, bomba de agua y cámara de incubación para espécimen. Se realizó un orificio para poder presentar la pantalla en el gabinete y se le incorporó la tecla de encendido (Figura 12). Luego, para poder registrar los datos durante las pruebas de funcionamiento, se conectó la salida del Arduino a una PC externa mediante un puerto USB.



**Figura 12:** Cámara de recirculación termostatzable (CRT) con sistema de control electrónico en gabinete y sistema de circulación externo y cámara metálica de incubación para el espécimen. 1- Gabinete de control con microprocesador. 2-Módulo frío-calor. 3-Reservorio de agua. 4-Bomba hidráulica. 5-Mangueras de silicona de conexión (ampliada abajo). 6-Cámara de recirculación para espécimen. 7-PC.

## Síntesis de resultados

En la primera etapa el circuito eléctrico planteado (Figura 2A) permitió evaluar el funcionamiento del circuito de agua a temperatura ambiente y optimizar la ubicación espacial de los componentes en un formato más compacto y portátil que el del prototipo original<sup>1</sup>.

El agregado de una cisterna con descarga a presión atmosférica permitió purgar las burbujas del sistema y aumentar el volumen de termostatzación a 60 ml, 6 veces mayor que el del intercambiador de aluminio del prototipo original. El plástico de las paredes de la cisterna funcionó como aislante mientras que la base de aluminio en contacto con las celdas Peltier inició la termostatzación (frío/calor) del agua de forma inmediata una vez encendidas las celdas.

El nuevo diseño de la CRT y la fabricación en ABS resultaron adecuados para evitar pérdidas de agua en los puntos de encastre y se anuló la formación de burbujas durante la pruebas de recirculación de agua por 60 min. a temperatura ambiente (24-25 °C).

En la segunda etapa utilizando la nueva configuración (Figura 6) se logró variar la potencia de las celdas de Peltier, ya que las celdas conectadas directamente a la fuente trabajan a su máxima potencia. Así se logró controlar la temperatura hasta un valor inferior de  $15^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  medido dentro del tanque cisterna tomando como temperatura ambiente inicial de referencia  $24 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

En la última etapa se realizaron los ensayos con el prototipo ubicado dentro de un gabinete (Figura 12). Para realizar las mediciones se llenó el reservorio con agua y se hizo funcionar la bomba hasta llenar todo el sistema (75 mL volumen total). Se verificó que no quedaran burbujas y se colocó un sensor térmico (NTC) en el reservorio de agua a temperatura ambiente, se esperó a que se estabilizara el valor y se tomó como temperatura de referencia. No se pudieron hacer las medidas directamente con el sen-

sor dentro de la cámara para el espécimen debido a que no se lo podía sumergir por completo. En pruebas posteriores se agregará una pequeña termocupla calibrada que se utilizará en paralelo para registrar la temperatura real en el medio de incubación.

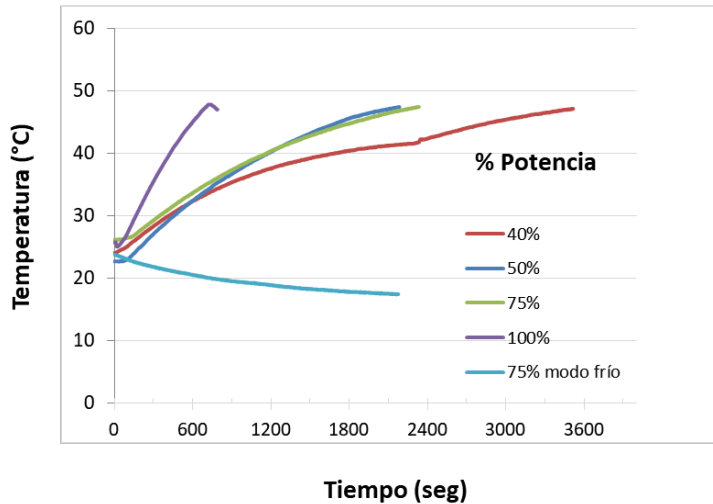
### **Control automático de temperatura y pruebas de funcionamiento a potencia variable**

Antes de realizar mediciones se avanzó en el control automático de temperatura por programación a través de microcódigos de una biblioteca Arduino. A través de herramientas preexistentes, provistas por una biblioteca Arduino-PID (<https://playground.arduino.cc/Code/PIDLibrary/>) se pudo lograr el control del microprocesador Arduino con el objetivo de automatizar la respuesta del sistema para alcanzar la temperatura consignada. Si bien los parámetros de entrada se pueden calcular de forma teórica en este caso se obtuvieron en forma empírica. Primero, se registró en cuánto tiempo se alcanzaba la temperatura consignada para la potencia entregada, que a su vez se fue variando; y en base a la respuesta se fueron tomando los valores que luego se utilizaron para las pruebas de estabilidad térmica.

Se ensayó el funcionamiento del equipo bajo el control de Arduino, donde primero se observó la respuesta del Peltier a potencia variable mediante la modulación del ancho de pulsos (%PWM, del inglés Pulse Width Modulation) (Figura 13) y se luego se probó la regulación automática de temperatura mediante la incorporación de parámetros de ajuste a partir de microcódigos obtenido de una biblioteca PID-Arduino (Figura 14).

En el primer caso, se realizaron ensayos fijando una temperatura de trabajo por encima y otra por debajo de la temperatura de referencia (PWM75%) para evaluar la velocidad de respuesta de la celda Peltier en la nueva configuración. Para ello se fijó la sonda de temperatura en el reservorio de agua y se registró la temperatura ambiente la cual se tomó de referencia como temperatura inicial, luego se evaluó el tiempo requerido para alcanzar una temperatura máxima o mínima al suministrarle al Peltier potencias de 40%, 50%, 75% y 100%.

Al suministrarle al Peltier potencias variables se observó que, si bien se alcanzaba la temperatura máxima establecida en 47°C en menor tiempo a mayor potencia de trabajo, no se observó una respuesta lineal. En el caso de enfriamiento se probó el Peltier al 75% de potencia estabilizándose en una temperatura mínima de 17,4 °C grados al cabo de 36 minutos, siendo la respuesta menos eficiente que para el calentamiento a la misma potencia.



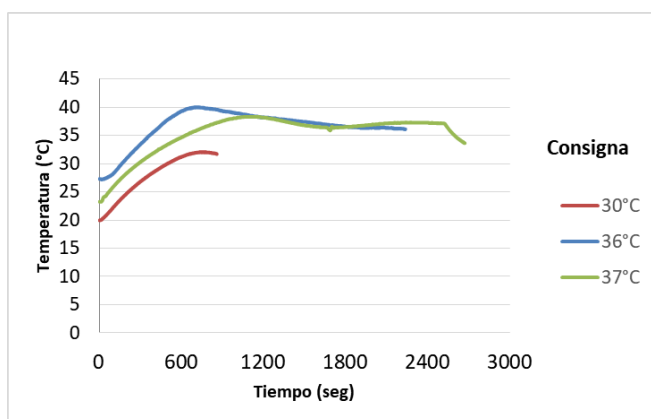
Modo	PWM (%)	Temp. Inicial (°C)	Temp. Final (°C)	Tiempo total (min)
Calor	40	23,6	47,13	60
Calor	50	22,6	47,38	32
Calor	75	26,1	47,44	28
Calor	100	25,5	47,06	15
Frio	75	23,75	17,44	36

**Figura 13:** Pruebas de funcionamiento de la celda Peltier a potencia variable. Cuatro condiciones en modo calor y una en modo frío.

Estos valores de temperatura fueron capturados en tiempo real a través de la comunicación entre el microcontrolador y la PC por puerto USB utilizando el programa CoolTerm y posteriormente se graficaron.

### Pruebas de estabilidad térmica del sistema de control PID en modo calentamiento para diferentes temperaturas de consigna

Luego se realizaron pruebas de estabilidad térmica (Figura 14). Para el valor de consigna de 36°C primero se observó que al cabo de 10 minutos alcanzaba una temperatura de 40°C (curva azul), que luego bajaba al valor establecido. Para el valor de consigna de 37°C (curva verde), el perfil es similar y alcanza la temperatura consignada que se mantiene por 20 min pero luego se apaga la bomba por lo que la temperatura decae rápidamente al no circular agua hacia el reservorio donde se mide la temperatura. En todos los casos se observa un pico previo al valor de consigna.



Modo	Consigna	Temp. Inicial (°C)	Temp. Final (°C)	Tiempo total (min)
Calor	36	22.6	36.13	32
Calor	30	19.94	31.69	22
Calor	37	23.25	33.63	45

**Figura 14:** Pruebas de estabilidad térmica del sistema de control PID en modo calentamiento para diferentes temperaturas de consigna.

## Conclusiones

El proyecto apuntó a cubrir la necesidad de las nuevas técnicas de microscopía *in vivo*, de mantener constantes las condiciones para la observación de organismos modelos en períodos de horas a días para estudiar procesos dinámicos a nivel celular y de desarrollo embrionario, siendo las condiciones más exigentes el control de la temperatura del medio de incubación a largo plazo y la inmovilización y sobrevida del espécimen.

La propuesta se realizó mediante recursos más económicos que los planteados en los equipos encontrados durante la revisión de tecnologías existentes en el área.

El prototipo desarrollado es de carácter tecnológico con transferencia directa a la educación en ciencias, investigación básica o aplicada en biología y con potencial transferencia comercial para el mercado de equipamientos de laboratorio.

Presentó un enfoque multidisciplinario donde se combinó la experiencia de los integrantes del LAMAE, en microscopía y microfluídica, y la colaboración del laboratorio de Prototipado Electrónico y 3D de FIUNER.

Es importante destacar que durante la ejecución del proyecto fue cambiando la disponibilidad de los tipos y marcas de resinas poliméricas de impresión 3D en FIUNER, al momento de volver a diseñar la CRT propiamente dicha o cámara de recirculación se observó una marcada deformación del material a temperatura ambiente en un período de días. A los fines del proyecto, y para poder avanzar con el sistema de control digital de termostatzación se reemplazó la mencionada cámara por otra metálica. Así se logró sellar completamente el circuito de agua y se espera de esta forma optimizar en ensayos sucesivos la velocidad de termostatzación bidireccional a través de la celda Peltier.

En el estado actual del prototipo es necesario seguir avanzando en el control digital por software y establecer el rango de estabilidad térmica.

## Indicadores de producción

Durante el último año del proyecto año y en colaboración con el codirector Dr. Gastón Miño se avanzó con el diseño y fabricación de sistemas microfluídicos en diferentes líneas de investigación que luego podrán ser integrados o conectados a la CRT para su termostatzación.

Además, a través de este proyecto se han implementado trabajos prácticos de laboratorio en la materia de 5to año de la carrera de Bioingeniería, Biomateriales y Biocompatibilidad. En estas prácticas se utilizó como modelo animal al pez cebrá para estudiar la toxicidad de resinas de impresión 3D en el desarrollo embrionario. Este acercamiento de la comunidad de ingeniería a un modelo animal y a la microscopía es un avance sin precedentes que ha logrado el interés de los alumnos a apostar por proyectos finales utilizando nuevos materiales, microscopía, microfluídica y al modelo animal. Los planteles de peces cebrá se alojan en un Acuario en el Bioterio de FIUNER que cumple con las condiciones para la cría y mantenimiento y se encuentra bajo la supervisión de la Lic. M. Florencia Sampedro (CPA-Conicet-UNER).



## Publicaciones

Spatio-temporal analysis of collective migration in vivo by particle image velocimetry. María F Sampedro, GL Miño, C Galetto and V Sigot. *Phys. Biol.* (18) 066008, <https://doi.org/10.1088/1478-3975/ac2e71>, 2021.

Anionic Quantum Dots reveal actin-microridges in zebrafish epidermis V. Sigot\*, P. E. Cabral Filho, M. F. Sampedro, B. S. Santos, A. Fontes. *Methods Appl. Fluoresc.* 8(3) 035007, <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab9124>, 2020.

## Divulgación de resultados en reuniones científicas

1. Poster: Protocolo Para El Cultivo Celular A Partir De Pez Cebrá. Nicolás Escuri Graf (orador), Gastón L Miño, V Sigot. Jornadas de Integralidad de las Funciones Universitarias-INEXA. Paraná, 2-3 noviembre 2022.
2. Poster: Caracterización de biopelículas con Quantum dots usando canales microfluídicos. Nadia Aljarrat (oradora), V Sigot, Gastón L Miño. VI Congreso de Microfluídica. Bs As, 7 al 9 noviembre 2022.
3. Poster: Understanding Sorter micro-device: simulation vs. experiment. Lara Guzmán (oradora), Gastón L. Miño, Adolfo J. Banchio, V. I. Marconi. III Brazil-Argentine Microfluidics Congress / VI Congreso de Microfluídica Argentina. Bs As, 7 al 9 noviembre 2022.
4. Poster: Understanding experimental vs simulation discrepancies in rectification. Lara Guzmán, Gastón L. Miño, Adolfo J. Banchio, V. I. Marconi (oradora). Conference Physics of Active Matter 2022. Coyhaique, Chile, octubre de 2022.
5. Poster: Estudio de modelos biológicos multicelulares de interés evolutivo. Guzmán L. (oradora), Miño G. L., Banchio A. J., Marconi V. I. 107a Reunión de la Asociación Física Argentina. Bariloche septiembre de 2022.
6. Disertante y coordinadora de Simposio: El pez cebrá, un modelo para estudiar migración celular colectiva. II Reunión científica internacional, VII Reunión Científica Regional y VI Congreso de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AA-CyTAL Virtual), 27 al 29 octubre, 2021.
7. Co-autora de trabajo presentado como comunicación oral: Caracterización in vivo de la migración colectiva en embriones de pez cebrá. GL Miño (orador), María F. Sampedro, C Galetto, V Sigot. 106ª Reunión de la Asociación Física Argentina (Virtual), 11 al 15 de octubre, 2021.
8. Expositora: Implementación de técnicas de microfluídica para analizar migración celular colectiva. María F. Sampedro, Gastón L. Miño, Valeria Sigot. 105ª Reunión de la Asociación Física Argentina (Virtual), 30 septiembre, 2020.
9. Póster: Cell migration dynamics inside of zebrafish embryos. Gastón L. Miño, María F. Sampedro, Valeria Sigot. II Brazil-Argentine Microfluidics Congress, V Congreso de Microfluídica Argentina. Córdoba, 22 al 25 de octubre, 2019.
10. LASDB Meeting 2019 Xth Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology. October 28-31, 2019. UADE Foundation, Buenos Aires, Argentina. Lima 717, Ciudad de Buenos Aires. María Florencia Sampedro, Gastón L. Miño, y Valeria Sigot. Dynamics of E cadherin distribution during collective migration of the posterior lateral line primordium.

## Bibliografía

1. Gonzalo A Pighín. Diseño de una cámara termostatzada para la visualización in vivo de embriones animales mediante microscopía de fluorescencia. (Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Ingeniería, 2017).
2. Sigot, V., Pellegrino, J. M., Guibert, E. E. & Rodriguez, J. V. A modular perfused chamber for low- and normal-temperature microscopy of living cells. *BioTechniques***50**, 251–254 (2011).
3. Kamei, M. & Weinstein, B. M. Long-term time-lapse fluorescence imaging of developing zebrafish. *Zebrafish***2**, 113–123 (2005).
4. Hardin, J. Confocal and multi-photon imaging of living embryos. *Handb. Biol. Confocal Microsc.* 746–768 (2006).
5. Hickey, S. M. et al. Fluorescence Microscopy—An Outline of Hardware, Biological Handling, and Fluorophore Considerations. *Cells***11**, 35 (2021).
6. Kimmel, C. (1995) - Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.pdf.
7. Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture***269**, 1–20 (2007).
8. Li, Y. et al. Zebrafish on a Chip: A Novel Platform for Real-Time Monitoring of Drug-Induced Developmental Toxicity. *PLoS ONE***9**, e94792 (2014).
9. Brugman, S. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Dev. Comp. Immunol.***64**, 82–92 (2016).
10. Lieschke, G. J. & Currie, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.***8**, 353–367 (2007).
11. Bergen, D. J. M., Kague, E. & Hammond, C. L. Zebrafish as an Emerging Model for Osteoporosis: A Primary Testing Platform for Screening New Osteo-Active Compounds. *Front. Endocrinol.***10**, (2019).
12. Lucchetta, E. M., Munson, M. S. & Ismagilov, R. F. Characterization of the local temperature in space and time around a developing *Drosophila* embryo in a microfluidic device. *Lab. Chip***6**, 185 (2006).
13. Alessandri, K. et al. All-in-one 3D printed microscopy chamber for multidimensional imaging, the UniverSlide. *Sci. Rep.***7**, 42378 (2017).
14. Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature***507**, 181–189 (2014).
15. Rusconi, R., Garren, M. & Stocker, R. Microfluidics Expanding the Frontiers of Microbial Ecology. *Annu. Rev. Biophys.***43**, 65–91 (2014).

**PID 6191**

**Denominación del Proyecto**

Desarrollo e implementación de una cámara de recirculación termostatzable para microscopía in vivo

**Directora externa**

Sigot Valeria (LMAE-IBB-CONICET-UNER)

**Codirectora**

Galetto Carolina Daniela

**Codirector Externo**

Miño Gastón Leonardo

**Unidad de Ejecución**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Ingeniería

**Contacto**

[valeria.sigot@uner.edu.ar](mailto:valeria.sigot@uner.edu.ar)

**Cátedra/s, área o disciplina científica**

Laboratorio de Microscopía Aplicada (LMAE).

**Instituciones intervinientes**

Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB-CONICET-UNER)

**Integrantes del proyecto**

Docentes: Gastón Miño (IBB-CONICET-UNER). Estudiante de postgrado: María Florencia Sampedro (IBB-CONICET-UNER). Becarios PID: Pablo Enrique Ayala y Bruno Horacio Agostini

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

01/02/2019 y 24/12/2022

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 104/24 (26-04-2024)