

# Desarrollo de un Sistema Integral de Medición de Parámetros Hemodinámicos in Vitro Para la Caracterización de Células Endoteliales

R. L. Armentano, F. M. Pessana, L. J. Cymberknop, A. Lozano, L. B. Fraigi y A. Furfaro  
Departamento de Electrónica, Facultad Regional Buenos Aires, Universidad Tecnológica Nacional,  
Buenos Aires, Argentina  
Contacto: armen@ieee.org

## Abstract

*Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las causas de muerte con mayor prevalencia en las sociedades occidentales industrializadas. En los mecanismos fisiopatológicos interviene la disfunción endotelial, que es considerada como un síndrome con manifestaciones sistémicas asociadas a morbilidad y mortalidad cardiovasculares significativas. El concepto de disfunción endotelial podría extenderse hasta los vasos que irrigan la pared vascular y más aún, la médula ósea y las células progenitoras del endotelio. El objetivo de este proyecto es la implementación de un sistema integral para la obtención y procesamiento en tiempo real de presiones, flujos, dimensiones vasculares, campos de velocidades y tensión de cizallamiento parietal, en forma simultánea. El mismo constituirá el estándar oro de una inmediata miniaturización, con miras al desarrollo de sensores implantables con capacidad de adquisición de magnitudes adicionales, como temperaturas, PH y óxido nítrico, entre otras.*

**Palabras clave:** aterosclerosis, células endoteliales, bioMems, CFD, velocimetría Doppler

## Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad crónica, sistémica y difusa con complicaciones focales en diferentes lechos vasculares. No se conocen los mecanismos que expliquen por qué un sitio específico presenta mayor predisposición al desarrollo de la enfermedad sintomática y eventos subsecuentes. Sus características fisiopatológicas sugieren la hipótesis de que la interfase y la interacción entre la pared vascular y la circulación, es el sitio primario de estos mecanismos [1]. En esta interfase se ubica el endotelio, una monocapa de células que limitan el lumen de los lechos vasculares, estratégicamente ubicada bajo el punto de vista mecánico y metabólico, separando la pared vascular de la circulación y los componentes sanguíneos [1,2]. Es necesario conocer la naturaleza y función del endotelio para entender los mecanismos por los que alteraciones en su función pueden conducir a eventos mórbidos.

Normalmente, los vasos sanguíneos están dinámicamente sometidos a fuerzas ejercidas por acción de la presión sanguínea (stress circunferencial) y por acción del flujo de sangre, cuyo perfil de velocidad ejerce sobre la capa celular más interna de la pared, el endotelio, un efecto mecánico conocido como tensión de

cizallamiento parietal o wall shear stress (WSS) [3]. La precisa caracterización del WSS en el sistema arterial, es un punto crítico si se busca dilucidar los efectos espaciales y temporales del cizallamiento sanguíneo sobre la actividad biológica de la células endoteliales (CE). Efectivamente, el WSS regula la morfología de las CE así como su compleja actividad biológica. En experiencias in vivo, los campos de velocidades eritrocitarias son asimétricos debido a la geometría del sistema arterial y como consecuencia de la variación de las componentes temporales y espaciales del flujo pulsátil. En su impronta micro, el WSS ha sido determinado por métodos directos e indirectos. Los últimos están basados en el efecto de anemometría térmica [4,5]. Este fenómeno se fundamenta en la transferencia de calor por convección, a través del WSS, proveniente de un elemento resistivo calentado previamente. En forma no invasiva se utiliza el ultrasonido (efecto Doppler) o la resonancia magnética nuclear (MRI). Ambas tecnologías requieren de una geometría conocida para correlacionar adecuadamente y caracterizar el cizallamiento. Debido a su carácter no invasivo, la resolución espacial cerca de la pared es dificultosa de establecer.

Finalmente, es bien sabido que el óxido nítrico (ON) actúa como un mensajero

intercelular endotelial involucrado mecánicamente en enfermedades vasculares, tales como los accidentes cerebrovasculares, la insuficiencia cardíaca crónica y la epilepsia. Puede especularse que la actividad del ON, relacionada a la función endotelial, podría estar reducida en la disfunción endotelial sistémica y la aterosclerosis.

El presente trabajo tiene como objetivo primario el desarrollo de un banco de ensayos *in vitro*, para la obtención y procesamiento en tiempo real de presiones, flujos, dimensiones vasculares, campos de velocidades y WSS en forma simultánea, mimificadas en un simulador circulatorio hidráulico. Este desarrollo, patrón oro del procesamiento de parámetros fisiológicos, posibilitará una inmediata miniaturización, con miras al diseño de biosensores implantables e integrados (bioMems), que constituye la segunda fase del mismo. Estos últimos contarán con capacidades adicionales, tales como la medición de temperaturas, PH y ON. La característica de estos sensores permitirá, en una primera etapa, que puedan ser crónicamente instrumentados en paredes arteriales con o sin placas de aterosclerosis, con y sin endotelio, en el banco de ensayos diseñado a tal efecto. Posteriormente se procederá a la experimentación animal, con el objetivo final de ser utilizados en arterias humanas, posiblemente obtenidas en un banco de órganos, en instancias más allá del alcance de este proyecto.

## Material y Métodos

El abordaje de la temática fue efectuado integralmente desde las TICs, utilizando un enfoque basado en tiempo real con alto poder y velocidad de cálculo, de modo obtener el patrón oro requerido en estudios realizados en un banco de ensayos *in vitro*. Consecuentemente, la evaluación integral cuenta con el desarrollo de los siguientes subsistemas:

### A. Módulo integrado de adquisición y procesamiento de señales fisiológicas

Fue desarrollado con el objeto de acondicionar y preprocesar las señales provenientes de sensores de presión invasivos de alta respuesta en frecuencia (Königsberg instruments inc, 1200Hz, Pasadera, USA), señales de velocimetría doppler multipuerta (VDM), señales de diámetros arteriales provenientes de cristales piezoeléctricos (sonomicrometría) y señales provenientes de sensores de anemometría térmica (WSS). Permite conectar los distintos tipos de sensores, teniendo en cuenta que se requieren 2 canales de diámetros, 2 de tonometría o mecanográficos, 3 canales de

electrocardiografía (derivaciones ECG), 2 de velocimetría doppler y 2 de presión invasiva (Königsberg). Para llevar a cabo el preprocesamiento de las señales y convertir al módulo en un sistema semi-independiente, se dispuso de un microcontrolador de bajo consumo, con conversores analógico/digital integrados (12bits, 5KHz max.) y una conexión a PC. El sistema permite además, el ingreso de imágenes (secuencias), provenientes de un ecógrafo en modo B. Estas últimas tienen un formato estándar (NTSC/PAL) y pueden ser ingresadas a través una placa digitalizadora de imágenes. El software especializado se encarga del procesamiento de las imágenes y su almacenamiento en tiempo real, siendo crítica la velocidad de 15 imágenes/segundo, mínima indispensable para adquirir secuencias completas. El software cuenta con un sistema de visualización y almacenamiento simultáneo. La placa de adquisición dispone de una señal de disparo que puede ser calibrada con la señal de ECG, proveniente del módulo de señales, para coordinar determinados estudios no invasivos. Los algoritmos de procesamiento, entre los que pueden destacarse técnicas de identificación de sistemas y aplicación de la transformada ondita, fueron desarrollados en su totalidad bajo plataforma MatLab® (Mathworks inc., Massachusetts, USA)

### B. Sistema de circulación *in vitro*

Es un conjunto constituido por un motor de corriente continua y una bomba centrífuga, de manera de alcanzar la impulsión fluidica requerida (1 L/min.). Para poder montar un circuito de circulación cerrado, se apeló a un reservorio de almacenamiento, que se comporta además como una cámara compliante, y a un sistema de sujeción del segmento a estudiar.

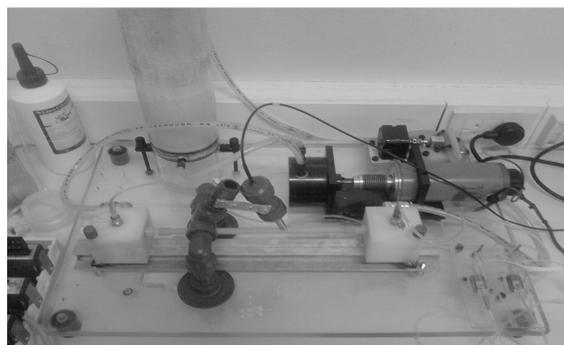


Figura 1.- Módulo Simulador Circulatorio de ensayos *in vitro*, para medición de presiones, diámetros y perfiles de velocidad Doppler.

El carácter pulsátil de la circulación se sistematizó mediante un sistema de control digital, desarrollado a tal efecto, utilizando como señal de realimentación la presión interna a la

que se encuentra sometida el segmento (Figura 1).

El sistema de sujeción mencionado, sobre el cual se monta el segmento, puede sumergirse en una cuba con una solución adecuada, bajo un sistema de temperatura controlada. Como objeto de análisis se utilizaron elastómeros, de módulo elástico normalizado. La medición del gradiente de presión intraluminal fue realizada mediante dos microtransductores de presión Konigsberg, dispuestos en el segmento a 30cm de distancia uno del otro. Las señales se digitalizaron a 200Hz, utilizando el módulo de adquisición previamente descrito (A). El fluido utilizado para alimentar el circuito hidráulico consistió en una solución de glicerina combinada con agua destilada y partículas en suspensión (para la VDM), de manera de obtener un grado de viscosidad similar a la del flujo sanguíneo (3.5 cP).

### C. Módulo de simulación numérica

El sistema de simulación numérica y mecánica mediante dinámica de fluidos computacional (CFD), se gestó a partir de un cluster de computadoras equipadas con unidades procesamiento gráfico de propósito general (GPGPU), para el procesamiento de imágenes y señales con alto rendimiento. Consiste en cuerpos computacionales conectados a través de una red de datos de alta velocidad, libre de colisiones, por medio de placas basadas en el protocolo Infiniband (velocidades de hasta 5 Gbps, libres de colisiones), vinculados a través de un router específico para el mencionado protocolo.

### D. Módulo ultrasónico para la medición de perfiles de velocidad

Para la medición de los perfiles de velocidad (correspondientes al fluido interior del segmento bajo análisis), se utilizó un velocímetro ultrasónico multipuerta. Su principio de funcionamiento está basado en el efecto Doppler. El mismo permite la medición en forma simultánea de velocidades a diferentes profundidades, de modo que se dispone de información instantánea de la velocidad eritrocitaria, en cuanto a profundidad y tiempo. La matriz de velocidades obtenida, constituyó el patrón de validación de las simulaciones numéricas y de mecánica computacional mediante CFD, pertenecientes al módulo detallado previamente (C).

### E. Abordaje módulo MEMS para medición de tensión de cizallamiento en tiempo real

Se parte del desarrollo de sensores implantables, constituidos por una capa de

Titanio y Platino embebida en un polímero flexible. Los mismos operan bajo el principio de transferencia de calor, que consiste en medir el enfriamiento convectivo de un elemento resistivo al ser sometido a temperatura, como consecuencia del flujo circulante, del cual se infiere el WSS [4,6]. Existe una relación lineal entre la potencia de entrada al sensor y el cizallamiento a estimarse ( $V^2/R \propto WSS^{1/3}$ ), debiendo minimizarse de la pérdida de calor hacia el sustrato [7]. La etapa de validación será puesta en marcha durante la experimentación animal, contrastando simultáneamente con las mediciones indirectas del WSS por Doppler.

### F. Abordaje de sensores de óxido nítrico

La medición de señales biológicas de ON posee múltiples aspectos a considerar. En primera instancia, el ON *in vivo* posee un tiempo de vida medio reducido, inferior a los 250ms, por lo cual el sensor a desarrollar debe presentar una respuesta elevada en frecuencia. Además de ello, las concentraciones también son reducidas, requiriendo simultáneamente alta sensibilidad. Si bien las técnicas ópticas o las de detección química indirecta han demostrado resultados sustentables, la reducción-oxidación electroquímica (redox), en la superficie de un electrodo, parecería contar con las mejores prestaciones para el sistema de detección que se pretende desarrollar, debido a su capacidad de respuesta a una amplia gama de neuroquímicos [8]. La etapa de validación se pondrá en marcha en la fase correspondiente a la experimentación animal.

## Resultados

En esta primera fase, se configuró el Sistema de circulación *in vitro* (B), de modo de generar una señal de presión interna al segmento, de frecuencia y morfología específicas, acorde a un estado fisiológico similar al del comportamiento arterial.

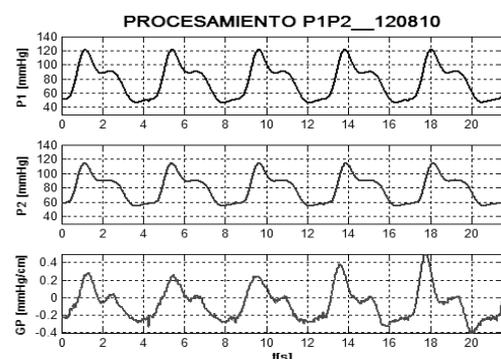


Figura II.- Panel superior: Señal de presión, primer extremo de medición. Panel central: Señal de presión, extremo opuesto. Panel inferior: Gradiente de presión resultante.

Posteriormente, se adquirieron las señales de presión intraluminal provenientes de los sensores adheridos al segmento, con el objeto de obtener el gradiente de presión correspondiente (Figura II). Simultáneamente, se adquirió la matriz de perfiles de velocidad mediante el módulo ultrasónico desarrollado a tal efecto (Figura III). Las señales en su conjunto fueron pre-procesadas en el hardware del módulo de adquisición.

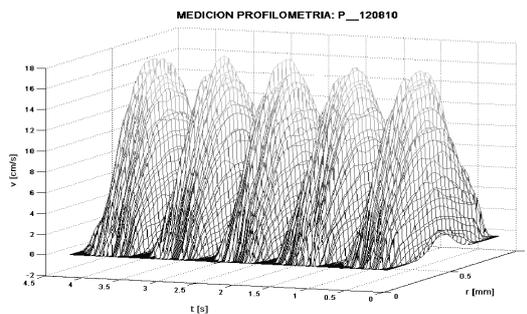


Figura III.- Perfiles de velocidad de flujo obtenidos mediante del Módulo Ultrasónico de adquisición por efecto Doppler.

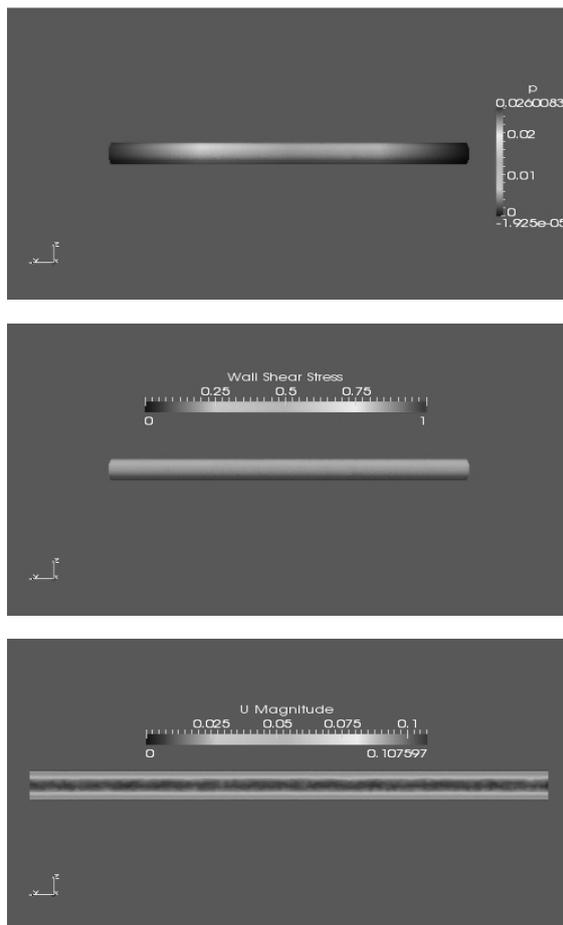


Figura IV.- Panel superior: Simulación numérica de la distribución del gradiente de presión del segmento bajo estudio. Panel central: Distribución del WSS. Panel inferior: Perfiles de velocidad de flujo obtenidos (corte en U).

El procesamiento final fue efectuado por el software complementado al mismo, donde se calcularon parámetros instantáneos derivados, tales como la velocidad central del fluido, WSS, flujo instantáneo y diámetro pulsátil, entre otros. La conclusión del análisis consistió en la transferencia de la totalidad de los datos generados al módulo de simulación numérica, basado en CFD. Se obtuvo un esquema dinámico en tres dimensiones del segmento analizado, donde pudieron observarse los parámetros dinámicos de interés: gradiente de presión, WSS y perfil de velocidades estimado (Figura IV). La capacidad computacional del cluster permitió que la simulación fuera implementada prácticamente en tiempo real.

## Discusión

El objetivo primario de este trabajo consistió en implementación de un banco de ensayos *in vitro* para la adquisición de parámetros fisiológicos, apelando técnicas de alto poder de cálculo y en tiempo real. El desarrollo permitió la medición simultánea de presiones, perfiles de velocidad y dimensiones intraluminales, que fueron procesados por un módulo de simulación numérica con resultados de rendimiento temporal aceptables. Los resultados obtenidos constituirán la información de validación de los biosensores en desarrollo y valida en una segunda etapa, aquellos de los que ya se han efectuado ensayos preliminares a escalas superiores. El WSS se ha propuesto como el factor fundamental en la localización enfermedad aterosclerótica. Esta hipótesis, aunque apoyada por amplias pruebas en cultivos celulares y estudios realizados en modelos animales, ha sido difícil de probar en seres humanos, debido a la larga latencia de la aterogénesis y la complejidad de la determinación de WSS en arterias nativas. Las técnicas más exitosas para la determinación del WSS son altamente costosas y muy dependientes de la geometría. Los datos adquiridos, se utilizan posteriormente para su tratamiento CFD, de manera de obtener el WSS indirectamente en la interfase lumen-endotelial. En contraste con la aterosclerosis, que lleva años en desarrollarse, los injertos de vena, como los utilizados en cardiología y cirugía de bypass periféricos, generan estenosis a menudo (en unos meses o unos pocos años) derivada de la hiperplasia miointimal. Es por ello que constituyen un modelo adecuado para estudiar la relación del WSS con los fenómenos relacionados con los crecimientos neointimales. Para la correcta determinación del WSS y sobre todo de los efectos sobre la interfase lumen-endotelio, se requiere de una medición in situ simultánea de presiones, diámetros, ON y

temperatura, esta última asociada también a los fenómenos de disipación de energía propios del músculo liso (ML) de la pared arterial. La mencionada acción relacionada con el ML, tiene la misión de evitar que las altas frecuencias en el pulso de la presión vascular injurien el tejido, reduciendo las oscilaciones de la aceleración del estiramiento en la pared. Todas estas mediciones, en adición a la modelización en tiempo real por CFD, permitirán tener una completa caracterización de la pared arterial, del flujo y de la interrelación entre ambos a través del WSS medido in situ, validado por VDM. La medición concomitante del ON permitirá conocer la actividad vasodilatadora de las células endoteliales y su acción sobre el músculo liso de la pared, evaluado a través de la disipación de energía. Estas mediciones se realizarán en arterias con y sin endotelio y con y sin placas de ateroma. Estos datos constituirían el estándar oro primario y serán de gran utilidad para los estudios no invasivos. No obstante, el objetivo a posteriori es que esta plataforma sea implementada a través de BioMems, de modo que estos sensores puedan ser implantados en la pared arterial de animales de experimentación, para lo cual el abordaje computacional desarrollado en el presente proyecto se trasladaría inmediatamente. Finalmente, se manifiesta un análisis inédito del WSS, que gracias a la potencia de cálculo podrá ser también procesado en tiempo real (recurriendo a la transformada ondiva, bajo un análisis temporal – frecuencial simultáneo), a fin de encontrar marcadores de la dinámica endotelial enmascarados en el mismo. Debido a que estos últimos se alteran en base a distintas geometrías, pueden evaluarse cambios en la dinámica endotelial, y su relación con la liberación de ON.

## Conclusión

En síntesis, el desarrollo de un simulador circulatorio *in vitro* con técnicas de análisis de del alto poder computacional, no sólo constituye un patrón de referencia en el estudio de la actividad endotelial, sino que sienta las bases fundacionales para el desarrollo de un biosensor implantable integral.

Contar en un futuro con simultaneidad de parámetros relacionados con la actividad arterial, adquiridos en tiempo real *in vivo*, constituye uno de los mayores desafíos que enfrenta la comprensión del fenómeno de la aterogénesis en los seres vivos. El análisis del WSS y su incidencia sobre el comportamiento desarrollado por las células endoteliales, representa en la actualidad uno de los objetos de estudio de mayor prevalencia en el marco de la medicina cardiovascular, consecuencia del rol

ejercido por la disfunción endotelial como marcador inicial de patologías vasculares.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado bajo el marco de la beca doctoral docente otorgada por la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – FONCyT – IP – PRH - 2007, Convocatoria 2008, al doctorando Leandro J. Cymberknop. Adicionalmente se agradece especialmente al Ing. Biomédico Fernando Salvucci y al Sr. Federico Roux por su aporte en el procesamiento de los datos adquiridos.

## Referencias

- [1] Bonetti y col. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:168 –175.
- [2] Lerman A y col. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992; 86 (suppl III): III-12–III-19
- [3] Kamiya A, Togawa T., *Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery*, Am J Physiol, 1980; 239(1):H14-21.
- [4] M.A. Schmidt, R.T. Howe, S.D. Senturia, and J.H.Haritonidis, *Design and calibration of a microfabricated floating element shear stress sensor*. IEEE Transactions of Electron Devices, Vol. ED-35,pp. 750-757, 1988.
- [5] Shajii J, Ng, KY, Schmidt, MA, *A microfabricated floating element shear stress sensor using wafer-bonding technology*. J. of Microelectromechanicals systems, 1992, 89-94.
- [6] Ai L, Yu H, Tabake W, Paraboschi A, YU F, Kim ES, LI R, Hsiai TK, *Optimization of intravascular shear stress assessment in vivo*, J Biomech 2009; 42(10):1429-37.
- [7] Tzung K Hsiai, Sung K. Cho, Pak K. Wong, Michael Ing, Mohammad Navab, Srinuvassa Reddy, Linda L. Demer, Chih M Ho, *Bio-MEMS Sensors for Real-Time Shear Stress on Endothelial Cell Dynamics*, Proceedings of the Second Joint EMBS/BMES, Houston, TX, USA, 2002.
- [8] M. Naware, A. Rege, R. Genov, M. Stanacevic, G. Cauwenberghs and N. Thakor, *Integrated Multi-electrode fluidic nitric-oxide sensor and vlsi potentiostat array*. Proceedings of the 2004 International Symposium on Circuits and Systems (ISCAS'04).