



Estación I3D :Impresión 3D y evaluación de propiedades geométricas y morfológicas.

Diseño de estructuras en Inventor, fabricación de *scaffolds* en Impresión 3D, y evaluación de propiedades geométricas y morfológicas mediante Arquímedes y Lupa.

Dr. Juan Francisco Vivanco, Carlos Toro, Sebastián Llano, Fernanda Álamos, Alejandra Correa y Felipe Maturana

Dentro del desarrollo de estructuras porosas biocompatibles utilizadas en ingeniería de tejidos, es importante considerar y controlar su geometría interna, debido a que los parámetros que definen su estructura pueden afectar su desempeño biológico y mecánico para su uso en el área de regeneración de tejidos. De esta manera, las propiedades geométricas, las cuales se pueden identificar como porosidad y tamaño de poro, aportan al conocimiento para estudiar el desempeño de un andamio al aplicarse directamente en un tejido.

En este laboratorio se procederá a diseñar e imprimir estructuras porosas tridimensionales con el objetivo de medir las propiedades geométricas a partir del principio de Arquímedes y medición por lupa.

Objetivos:

- Diseñar estructuras porosas con 50% de porosidad en Autodesk Inventor.
- Fabricar modelos de estructuras porosas en impresoras 3D.
- Medir porosidad de estructuras porosas a partir del Principio de Arquímedes.
- Realizar procedimiento para medir el tamaño de poro de una estructura mediante medición por Lupa.

Conceptos importantes:

- **Porosidad:** Corresponde al volumen total del espacio vacío sobre el volumen total de la estructura que se está evaluando, $Porosidad = \frac{V_{vacío}}{V_{total}} = 1 - \frac{V_{sólido}}{V_{total}}$.

Así, se asigna un porcentaje, el cual puede verse físicamente representado en distintos diseños de arquitecturas a partir del tamaño de poro que conforman la estructura. Esta propiedad se mide a partir del principio de Arquímedes, a partir del peso seco y mojado de esta con una balanza (Imagen 1).



Imagen 1: Balanza para medir porosidad

- **Tamaño de poro:** Corresponde a la arista de cada poro que conforma el volumen de la estructura. Esta se mide a partir de la medición por lupa, la cual genera imágenes para comparar la longitud de cada arista a partir de un microscopio estereoscópico.

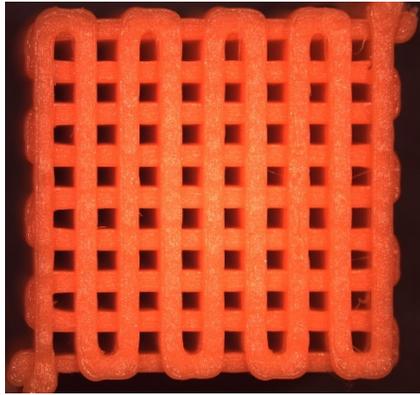


Imagen 2: Medición de tamaño de poro de estructura de 50% de porosidad por imagen obtenida por Lupa

Actividades:

- **Diseño de estructuras porosas (45 minutos)**

La presente estación se dividirá en 2 actividades:

- **Presentación *nTopology* (20 minutos):** En esta actividad se les dará a los estudiantes un acercamiento sobre el funcionamiento del software, el cual se utiliza para diseñar estructuras porosas en gradiente para su aplicación en ingeniería de tejidos.
- **Diseño en Autodesk Inventor (25 minutos):** Se guiará a los estudiantes para a diseñar dos *scaffolds* cúbicos a través de la plataforma Autodesk Inventor 2022. Estos tendrán un porcentaje de porosidad de 50% y 10 mm de arista, encontrándose 2 estructuras con 1 y 8 poros internos respectivamente.

- **Impresión 3D (10 minutos)**

En esta etapa, los estudiantes podrán observar cómo se lleva a cabo el proceso de impresión 3D, que incluye la importación del diseño. STL y posterior exportación del GCODE para poder ser interpretado por la impresora. Con esto, se les explicará el funcionamiento de las impresoras y podrán fabricar las estructuras diseñadas en la estación anterior.

- **Medición de propiedades geométricas (25 minutos)**

La presente estación se dividirá en 2 actividades: medición por lupa para definir el tamaño de poro y principio de Arquímedes para medir la porosidad de la estructura.

- **Medición por Lupa:** los estudiantes observarán el funcionamiento del microscopio estereoscópico, capturando las imágenes que serán utilizadas para medir la arista de los poros que se utilizan para definir el tamaño de estos.
- **Principio de Arquímedes:** los estudiantes procederán a masar en seco y mojado las estructuras impresas en 3D, para luego aplicar los datos obtenidos a la ecuación que permite definir la porosidad real de éstas.



Estación CCB: Cultivo Celular y Biocompatibilidad

Observación y manejo de células en cultivo para cargar andamios porosos tridimensionales (3D-scaffolds).

Dr. Raúl Vallejos, Dra. Isabel Benjumeda, Dra. Carola Millán

Bernardita Heusse y Pablo Núñez

Protocolo para generar moldes para scaffolds y montar

1. Disolver 0,6 gr de agarosa en 30 ml de PBS.
2. Calentar en microondas en su máxima potencia por unos instantes, evitando que se derrame (ir verificando).
3. Colocar agarosa en los moldes y dejar solidificar por unos minutos.
4. Con la ayuda de una espátula y un bisturí, retirar el molde de agarosa y cortar en pocillos individuales para 4 scaffolds (2 de cada tipo).
5. Colocar scaffolds en los moldes y posteriormente en la placa de 4 pocillos.

Protocolo para despegar células para siembra

1. Revisar confluencia de células en la placa al microscopio.
2. Retirar medio y lavar las células dos veces con 1ml de PBS.
3. Agregar 350 μ l de tripsina para despegar células y dejar en la incubadora a 37°C por 5 minutos.
4. Revisar si las células se despegaron al microscopio, si no lo han hecho, dejar 5 minutos más en incubadora.
5. Agregar 1,4 ml de medio de cultivo DMEM para detener la acción de la tripsina.
6. Mover el contenido de la placa a un tubo Falcon de 15mL.
7. Apartar 100 μ l de esta solución en un tubo Eppendorf pequeño para contar células.
8. Poner tubos con el resto de las células en la centrífuga con un tubo contrapeso (agua).
9. Centrifugar a 1500 RPM por 5 minutos.

Protocolo para contar células

1. Combinar los 100 μ l de la solución de células del paso 6 anterior con 100 μ l de azul de tripán. Mezclar bien.
2. Añadir 10 μ l de esta solución a los lados A y B de una lámina de conteo.
3. Contar células por ambos lados en el contador celular.

Protocolo para sembrar scaffolds con una gota de células

1. Retirar tubos Falcon de la centrífuga y retirar sobrenadante (se debe observar un pellet de células).
2. Agregar 500 μ l de medio de cultivo DMEM y mezclar bien.
3. Agregar 50 μ l de células con medio a cada scaffold.



Estación QMB: Química y Microscopía Bioinspirada

Muestras celulares y biomateriales bioinspirados observados bajo el microscopio óptico, preparación de soluciones de trabajo y manejo de equipos de laboratorio básicos y avanzados.

Dra. Carola Millán, Dra. Carolina Angulo, Catalina Miranda

1. Preparación de una solución con múltiples sales:

a. Trabajo previo:

El PBS es una solución buffer comúnmente utilizada para mantener células estables en periodos cortos de tiempo. Está compuesta por 4 sales distintas y produce un pH estable, isotónico, y no tóxico para la célula. Presenta una apariencia muy similar al agua y un pH de 7,4. En la siguiente tabla se puede observar la cantidad de cada sal necesario para generar una solución de PBS estable:

Compuesto	Cantidad para generar 1 litro	Calcule para 100 mL [gr]	Concentración final
NaCl	8 g		137 mM
KCl	0,2 g		2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	1,44 g		10 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g		1,8 mM

Para litro: estas se disuelven en 800 mL de agua, se ajusta el pH a 7,4 con HCl y luego se añade H₂O destilada hasta completar 1 litro (se afora).

Ejercicio para el estudiante: Calcule cuánto debería pesar de cada sal para obtener 100 mL de solución de PBS. Luego, se les entregará un mix de 3 sales, y ustedes deberán identificar la sal faltante en base a una pista que le entregará la profesora/ayudante.

b. Preparación en laboratorio:

Primero que nada, siempre recuerden que cada utensilio que sea utilizado debe estar adecuadamente lavado y sanitizado, si ese es el caso, además deben acatar a las reglas de seguridad del laboratorio en todo momento.

Sus materiales deben ser los siguientes:

Material	Cantidad
Pocillo con sales	1
Matraz de 100 mL	1
Pocillo pequeño	2

Espátula	1
Matraz de aforo 100 mL	1
Bagueta	1
Probeta de 100 mL	1
Piseta	1

Si les falta algo, por favor acérquense a su ayudante y háganselo saber.

Tomando los cálculos realizados y sus materiales, el procedimiento es el siguiente:

- i. Después de descubrir la cantidad de sal faltante para la mezcla de PBS, identifique su pocillo con la sal a pesar.
- ii. Lleve el pocillo con la sal que le corresponde y el pocillo vacío a la balanza (¹La pesa que necesitará usar depende de la sal que le haya tocado a su grupo. La ayudante le indicará la pesa correcta, analítica/granataria).
- iii. Deposite el pocillo vacío en la pesa y calíbrelo/tarar para que quede en 0,00 g.
- iv. Con cuidado, tome un poco de la sal que tiene con la espátula y agréguela al pocillo en la balanza. Haga esto hasta que la balanza indique el peso deseado. No se puede pasar, nunca se debe devolver un reactivo a su envase original.
- v. Una vez terminado pesando, limpie la pesa y vuelva a su estación de trabajo.
- vi. Agregue al matraz la mezcla de sales y la sal faltante (que acaba de pesar).
- vii. Llene la probeta de agua destilada hasta aproximadamente la marca de 80 mL.
- viii. Agregue el agua destilada al matraz con todas las sales.
- ix. Con la bagueta revuelva hasta que no queden rastros de las sales (entre 1 y 3 minutos).
- x. Lleve la solución preparada al matraz de aforo y lave el resto con agua de la piceta (aprox. 10 mL de agua) y afore hasta la marca de 100 mL con agua destilada.
- xi. Lavar los materiales con agua destilada, secar y dejar en papel estilando.

2. pH en Medios de Cultivo:

a. ¿Qué es un medio de cultivo?

Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio para cultivar microorganismos que consiste en, generalmente, un gel o líquido que posee las condiciones ideales para que cierto tipo de microorganismo crezca, o sea que tienen una cierta cantidad de nutrientes, un determinado pH y una temperatura controlada.

b. ¿Cómo afecta el pH a un medio de cultivo? ¿Porqué es importante tener indicadores de pH en medios de cultivo?

Un medio de cultivo es el entorno en el que se busca que un microorganismo prolifere. Los microorganismos suelen tener un alto nivel de sensibilidad a cambios de pH, por lo que la habilidad del medio de cultivo de mantener un determinado pH constante es fundamental para la supervivencia del microorganismo. Pero esto es difícil ya que el pH dependerá de la concentración de diferentes elementos dentro del medio, la cual está constantemente cambiando debido al metabolismo del mismo microorganismo. Por lo tanto, el tener un indicador de cuándo el pH ha cambiado, se pueden tomar las decisiones adecuadas para el cuidado del microorganismo, antes de que este sea afectado de forma irreversible por el cambio en el medio de cultivo.

c. Observación práctica:

¹ La pesa que necesitará usar depende de la sal que le haya tocado a su grupo. La ayudante le indicará la pesa correcta.

Antes de partir, asegúrese de tener los siguientes materiales a mano. Si no es así, acérquese a la ayudante y comuníquesele.

Material	Cantidad
Tubo de ensayo con medio de cultivo	1
Tubo Eppendorf de 1,5 mL	3
Pipeta gotario	2
Pipeta de transferencia	2
Tiras de pH	3
Plumón marcador	1
Tubo de ensayo con ácido	1
Tubo de ensayo con base	1

Procedimiento:

- i. Organice sus tubos y marque cada uno con los números 1, 2 y 3. Donde 1 es medio de cultivo; 2 es medio con HCl diluído y 3 medio con NaOH.
- ii. Usando la pipeta de transferencia, tome 1,5 mL del medio de cultivo desde el tubo de ensayo y deposite ese volumen en cada uno de los tubos eppendorf. (1,5 mL por tubo)
- iii. Con una pipeta gotario, tome un cierto volumen de ácido con mucho cuidado, agregue **GOTA A GOTA HASTA CAMBIO DE COLOR (usted define cuantas entre 3-5)**. Asegúrese de no tocar nada más con la pipeta gotario, ya que esta contiene ácido diluído. Una vez agregadas las gotas, devuelva el volumen de ácido no utilizado al tubo de ensayo original y ciérrelo, luego deseche la pipeta en el basurero de su puesto.
- iv. Con una pipeta gotario nueva, tome un cierto volumen de base con mucho cuidado, agregue **GOTA A GOTA HASTA CAMBIO DE COLOR (usted define cuantas entre 3-5)**. Asegúrese de no tocar nada más con la pipeta gotario ya que esta contiene base diluída. Una vez agregadas las gotas, devuelva el volumen de ácido no utilizado al tubo de ensayo original y ciérrelo, luego deseche la pipeta en el basurero de su puesto.
- v. Asegúrese de que todos sus materiales no se contaminen (la pipeta de transferencia no toque ácidos o bases, las pipetas gotarios no toquen nada más que lo que deben, etc.).
- vi. Sabiendo que el control debería tener pH 7,4, infiera que pH tienen las otras muestras.
- vii. Luego, con una tira de pH identifique el pH de sus muestras.
- viii. Anote el resultado obtenido y compárelo con su estimación, ¿qué tan acertada fue?.

3. Biomateriales Inspirados en el Mundo Microscópico:

El microscopio óptico es una herramienta que nos permite estudiar el mundo microscópico que nos rodea de una mejor manera. En su caso particular, el microscopio permite analizar muestra mediante la observación de una forma altamente tecnológica. Esto es muy importante para muchas materias como la microbiología, la biología celular, e incluso el estudio de los biomateriales, ya que todas estas ciencias buscan entender cómo estructuras en la escala de lo micro juegan su rol en un entorno macro. Por ejemplo, los cristales de hielo. Es solo gracias a la estructura minúscula cristalina que es posible que se armen grandes estructuras, ya que esta, al repetirse innumerables veces, termina formando la estructura final. Obteniendo así, sus propiedades como su fuerza, su resistencia, ¡y hasta su módulo de Young! Y es solo la repetición de un patrón a nivel microscópico, el cual podemos ver en el microscopio.

Y como el hielo mucho otros materiales que se ven a simple vista de una forma que bajo el microscopio se ven diferentes. Las hojas, por ejemplo, son miles de células aglomeradas, pero para el ojo común se ven como simples láminas de color verde y textura rugosa, o tal vez suave. O también el polen, que a simple vista se ve como un polvo, pero bajo el microscopio se puede ver cómo se compone de miles y miles de pequeñas unidades amarillas.

A continuación, se realizará una serie de observaciones que les permitirá hacerse una idea de todo esto.

a. Muestras a observar: montada en portaobjeto de vidrio con un cubre objeto.: Tejidos eucarióticos de mamíferos: Lengua, cerebelo, hígado e intestino

Muestras a observar: usted mismo hará una preparación, atienda la explicación de cómo montar una muestra: Tejidos eucarióticos de plantas: Polen, Hojas, Pétalos, otros

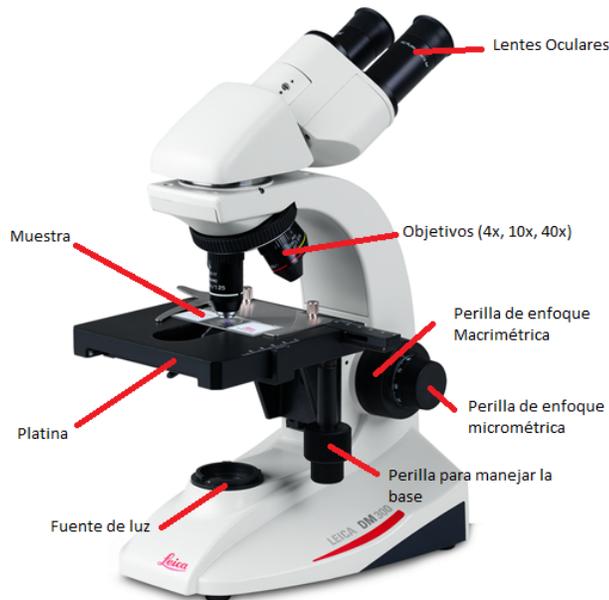
b. Procedimiento de observación:

- i. Para iniciar, prender el microscopio on/off (costado abajo).
- ii. Se debe observar mediante ambas **lentes oculares** y ajustar a la visión de ambos ojos.
- iii. Asegurar que el microscopio esté en el aumento menor de los **objetivos** (4x)
- iv. Una vez realizado, se debe posicionar la muestra en **platina** (base) ajustándolo con las pinzas.
- v. Luego, se debe observar por los lentes en el objetivo de aumento 4x y ajustar el enfoque con el macrométrico.

Para ajustar el enfoque: hay 2 perillas a cada lado de la base del microscopio, la más grande es el macrométrico y la más pequeña, al centro de la más grande, es el micrométrico. Primero se ajusta la macro y luego la micro, hasta poder ver de forma clara por lo lentes.

- vi. Una vez que el microscopio está ajustado, se puede cambiar el objetivo 4x al siguiente 10x, de la misma forma en que se hizo en el paso v. Una vez ajustado el objetivo, se debe volver a ajustar el enfoque, pero **solo con el enfoque micro**, no el macro. (OJO CON ESTO QUE PUEDE QUEBRAR LA MUESTRA O EL OBJETIVO)

c. Fotografía del microscopio con sus partes resaltadas:





Bioseguridad y medidas COVID

I. Reglamento resumido

1. Entrar a la sala en orden distanciados y colocarse en sus puestos de trabajo de a dos
2. Colocarse sus delantales y está prohibido entrar con pantalones cortos, vestidos y sandalias al laboratorio.
3. Usar guantes en las actividades de biología celular y química. En la otra, manos limpias y limpiarse regularmente con etanol 70%.
4. Limpiarse los guantes con etanol 70% (1 set por día)
5. Limpiar su estación de trabajo etanol 70% (colocar etanol, limpiar con papel absorbente)
6. Si van a usar el celular, limpiar celular con etanol 70%
7. Utilizar solo los materiales que son entregados a las parejas en su estación de trabajo.
8. Mantener distancia y mascarilla por toda la actividad.

Reglamento de Bioseguridad

II. Norma de vestimenta apta para el trabajo en laboratorio.

Delantal de laboratorio.

En el laboratorio se deberá utilizar delantal que cubra la mayoría de la ropa de calle para evitar potenciales daños a la salud del usuario, así como evitar estropear las prendas y vestimentas personales.

En el caso de los estudiantes de la Universidad Adolfo Ibáñez, deberán traer delantales con las características necesarias para el trabajo en laboratorios.

Medidas de protección para cabello.

El principal riesgo potencial relacionado al cabello, es una posible ignición al hacer contacto con una fuente de llamas, además podría quedar atrapado en algún equipo o máquina. De manera de evitar dichos accidentes, se debe llevar el pelo tomado por medio de moños o cofias, en el caso de los usuarios con cabello largo.

Medidas de protección para pies y piernas.

Las piernas deben estar totalmente cubiertas por un pantalón grueso tipo mezclilla y los pies deben estar cubiertos por zapatos cerrados de seguridad. El uso de sandalias y pantalones cortos están prohibidos dentro del laboratorio cuando se realizan experimentos o procedimientos de potencial riesgo, si se utilizan estas vestimentas poco seguras por cuales quiera eventualidad, queda a responsabilidad del usuario.

Medidas de protección para manos.

Las manos deberán ser protegidas por guantes adecuados al procedimiento a realizar (manipulación de químicos, manipulación de organismos, trabajos con temperaturas peligrosas, etc.)

Después de trabajar con organismos lavar las manos con alcohol al 70%, posteriormente lavar con jabón.

III. Comportamiento durante el trabajo en el laboratorio

Dentro del laboratorio no se debe comer, beber, ni fumar, para evitar cualquier riesgo potencial de accidente.

No distraer a las personas que se encuentran realizando experimentos, ni realizar bromas dentro del laboratorio. Podría generarse un accidente con consecuencias serias para la salud o arruinar los experimentos en marcha.

IV. Tipos de riesgos.

En este Manual de Seguridad y Procedimientos en laboratorio de Bioingeniería, de Viña del Mar, se reconocen potenciales riesgos asociados a la manipulación de equipos (Riesgo Mecánicos); contacto con sustancias químicas peligrosas (Riesgos Químicos); contacto con elementos, que por medio de sus propiedades físicas pueden producir injurias en los usuarios (Riesgos Físicos); interacción con material biológico de cierto riesgo, asociados a organismos de baja patogenicidad que puedan causar algún daño sobre la salud humana, animal, y de carácter de seguridad ambiental (Riesgos Biológicos).

1.1 Riesgos Químicos.

Los reactivos químicos utilizados en los laboratorios revisten un riesgo potencial para la salud de los usuarios, ya que, por su naturaleza química reactiva de la mayoría de estos, podrían generar serias consecuencias en caso de ser ingeridos, inhalados, irritaciones por contacto con la piel, daños a las mucosas o los ojos y hasta producir serios daños irreparables a largo plazo en la integridad física del afectado. Los envases de sustancias químicas deben estar debidamente rotulada, indicando los efectos que producen sobre la salud del usuario y el medio ambiente, tales como: si el producto es irritante, corrosivo, tóxico o nocivo, además deben estar señaladas las propiedades de incompatibilidad con otras sustancias, con la cuales puedan tener reacciones peligrosas como producir vapores tóxicos, explosiones, ser inflables o actuar como comburentes en caso de incendios.

1.2 Riesgos Físicos.

Los riesgos físicos pueden producir un potencial daño hacia la salud de los usuarios de los laboratorios, producto de la naturaleza de estos, tales como: exposiciones a radiaciones ionizantes y no ionizantes, material particulado, exposición a ruidos y vibraciones, quemaduras a la piel producto de equipos y/o procedimientos que generan temperaturas elevadas, quemaduras productos de equipos que funcionan a temperaturas extremadamente bajas como ultra frízer - 80° C, y todos los equipos que funcionan con electricidad, son siempre un potencial riesgo en caso de electrocución.

1.3 Riesgos Biológicos.

En el laboratorio de Bioingeniería se trabaja con algunos microorganismos, líneas celulares y plantas.

Los microorganismos como bacterias y hongos pueden generar algún riesgo potencial sobre la salud, cuando se trata de organismos de naturaleza patógena. En el laboratorios de bioingeniería se trabaja con cepas no patógenas que rara vez causan algún malestar en la salud de las personas, no obstante, este material biológico debe ser eliminado a través de procesos de esterilización con autoclaves o ser retirados por alguna empresa de servicios autorizada por los organismos de salud pública pertinentes, que se encargarán de eliminar dichos deshechos, de forma tal, que estos residuos, no signifiquen un riesgo para la salud humana y/o un riesgo ambiental.

Las líneas celulares utilizadas en el laboratorio de bioingeniería, independiente de su procedencia, ya sean de cultivos primarios o líneas celulares certificadas, tras ser utilizadas, deben ser eliminadas por procesos de esterilización con autoclaves o ser retirados por alguna empresa de servicios, autorizada por los organismos de salud pública pertinente, de forma tal, que no exista ninguna probabilidad de infección hacia la salud de los usuarios.

1.4 Riesgos Mecánicos.

En el laboratorio de Bioingeniería, existen potenciales riesgos asociados al funcionamiento o procedimientos, que pueden causar daños a la integridad física de los usuarios, producto de la no correcta manipulación de herramientas mecánicas, herramientas de cortes, elementos de vidrio, equipos de ensayos mecánicos, todos estos instrumentos deben ser correctamente operados por usuarios capacitados en el uso de estos instrumentos, y especialmente al operar equipos de ensayos mecánicos.



FACULTAD DE
INGENIERÍA Y CIENCIAS

