



Universidad Tecnológica Nacional
Rectorado
Secretaría de Ciencia y Tecnología

**SISTEMA DE INFORMACION DE CIENCIA Y
TECNOLOGIA (SICyT)**

FORMULARIO PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Código del Proyecto: ICTCAGP0008165TC

1. Unidad Científico-Tecnológica

- FR Pacheco - DEPARTAMENTO DE INGENIERIA ELECTRICA - FRGP
- FR Pacheco - SECRETARIA DE CIENCIA Y TECNOLOGIA - FRGP
- FR Pacheco - CENTRO IREN

2. Denominación del PID

ADQUISICIÓN DE IMÁGENES EN TIEMPO REAL Y CULTIVO CELULAR EN DISPOSITIVOS LAB ON A CHIP PARA LA OPTIMIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES MEDIANTE INTELIGENCIA

3. Resumen Técnico del PID

En este proyecto, se estudiarán sistemas de control automático mediante inteligencia artificial para la proliferación de células T de dispositivos de microfluídica. El tratamiento de pacientes con cáncer con sus propias células T que expresen el receptor quimérico (CAR-T) de antígeno de las células tumorales es una de las modalidades terapéuticas más prometedoras para el tratamiento de las malignidades hematológicas. Esta nueva tecnología no solo abre la puerta para explorar una nueva forma de evaluar el cultivo celular, analizando miles de variables de manera simultánea y automática, sino que también tendrá un gran impacto en el área de la salud y la medicina. El desarrollo de proyecto requiere múltiples actividades tales como la construcción de los dispositivos de microfluídica, la obtención y preparación adecuada de las células T, la configuración adecuada del set-up de horno de cultivo en conjunto con los microscopios automáticos y los equipos especiales para el procesamiento de datos y entrenamiento del agente de inteligencia artificial. En este proyecto se propone que el cultivo de células T será controlado mediante Inteligencia Artificial (IA), específicamente utilizando Reinforcement Learning. Las imágenes de las células T cultivadas en los dispositivos de microfluídica serán analizadas mediante algoritmos que brinden parámetros de proliferación celular, sirviendo como observaciones del proceso a controlar. El agente de reinforcement learning intentará maximizar la cantidad de células-T vivientes tomando acciones sobre las bombas de perfusión que suministren distintas citoquinas. De esta manera, el agente recibirá observaciones (células vivas, muertas, área ocupada, etc) del dispositivo que tiene el cultivo mediante imágenes obtenidas con un microscopio e inyectará la dosis adecuada de citoquinas para maximizar la cantidad de células T.

4. Programa

Ing. Clínica y Bioingeniería

5. Proyecto

Tipo de Proyecto: PID EQUIPOS CONSOLIDADOS CON INCENTIVOS TIPO A

Tipo de Actividad: Investigación Aplicada

Campos de Aplicación:

Rubro	Descrip. Actividad	Otra (especificada)
SALUD HUMANA (Desarrollo, protección y mejoramiento)	Desarrollo de Tecnología Sanitaria y Curativa	

Disciplinas Científicas:

Rubro	Disciplina Científica	Otras Disciplinas Científicas
BIOLOGÍA	Inmunología	-
FÍSICA	Física de los fluidos	-
INGENIERIA ELÉCTRICA	Automatización y control	-
CIENCIAS DE LA SALUD	Ciencias y servicios de la salud	-

Palabras Clave

Lab on a Chip, Celulas T, Machine Learning, Reinforcement learning

6. Fechas de realización

Inicio	Fin	Duración	Fecha de Homologación
01/01/2021	31/12/2023	36 meses	05/01/2021

7. Aprobación/ Acreditación / Homologación / Reconocimiento (para ser completado por la SCyT - Rectorado)

7.1 Aprobación / Acreditación / Reconocimiento (para ser completado por la FR cuando se posea N° Resolución)

N° de Resolución de aprobación de la FR:

7.2 Homologación (para ser completado por la SCyT - Rectorado)

Código SCyT: ICTCAGP0008165TC

Disposición SCyT: 009/2021

Código Ministerio:

8. Estado (para ser completado por la SCyT - Rectorado)

HOMOLOGADO

9. Avales (presentación obligatoria de avales)

10. Personal Científico Tecnológico que participa en el PID

Apellido	Nombre	Cargo	Hs/Sem	Fecha Alta	Fecha Baja	Otros Cargos	Cargo docente	Año cargo docente	Categ. Investigador Universitario	Categ. Prog. Incentivos	
PEREZ	MAXIMILIANO	DIRECTOR	10	01/01/2021	31/12/2023		Ayudante de 1ra	2014	Investigador B	Investigador III	Descargar CV
LERNER	BETIANA	INVESTIGADOR FORMADO	10	01/01/2021	31/12/2023		<ul style="list-style-type: none"> Ayudante de 1ra Jefe de Trabajos Prácticos 	2014	Investigador C	Investigador III	Descargar CV
PEÑAHERRERA PAZMIÑO	ANA BELÉN	INVESTIGADOR FORMADO	10	01/01/2021	31/12/2023				Ninguna	Ninguna	Descargar CV
MARTINEZ QUINTANA	LUIS ALFREDO	INVESTIGADOR FORMADO	10	01/01/2021	31/12/2023				Ninguna	Ninguna	Descargar CV
BAQUELA	ENRIQUE GABRIEL	INVESTIGADOR FORMADO	10	01/01/2021	31/12/2023		Profesor Adjunto	2012	Ninguna	Investigador IV	Descargar CV
MAILLOT	MARCOS	INVESTIGADOR FORMADO	10	01/01/2021	31/12/2023		Jefe de Trabajos Prácticos	2014	Investigador D	Ninguna	Descargar CV
BOURGUIGNON	NATALIA	INVESTIGADOR FORMADO	10	01/01/2021	31/12/2023				Ninguna	Ninguna	Descargar CV
CHAMORRO ENCALADA	DANIEL ALEJANDRO	BECARIO POSGRADO - DOCTORAL EN EL PAÍS	10	01/01/2021	31/12/2023				Ninguna	Ninguna	Descargar CV
PÉREZSOSA	CAMILO JOSÉ	BECARIO POSGRADO - DOCTORAL EN EL PAÍS	10	01/01/2021	31/12/2023				Ninguna	Ninguna	Descargar CV
GARCÍA SILVA	JULIO ISRAEL	BECARIO POSGRADO - DOCTORAL EN EL PAÍS	10	01/01/2021	31/12/2023				Ninguna	Ninguna	Descargar CV

11. Datos de la investigación

Estado actual de concimiento del tema

La optimización del método para alcanzar la expansión de las células T implicaría avances significativos en la terapia celular. El tratamiento de pacientes con cáncer con sus propias células T que expresen el receptor quimérico (CAR-T) de antígeno de las células tumorales es una de las modalidades terapéuticas más prometedoras para el tratamiento de las malignidades hematológicas [1]. Los receptores quiméricos de antígeno se unen específicamente al blanco expresado en las células tumorales. En la mayoría de los tipos de cáncer, los antígenos tumorales específicos no están definidos. De todas formas, en los cánceres de células B, el CD19 es un blanco atractivo. El tratamiento de los cánceres de células B ha tenido éxito porque éstas son las únicas células que expresan CD19 [2].

Para contrarrestar los factores que todavía limitan el desarrollo de esta estrategia terapéutica, como los costos exorbitantes, se

utilizarán plataformas de cultivo celular basadas en dispositivos de microfluídica. La microfluídica representa la manipulación controlada de los fluidos dentro de una red de canales [3]. Esto ofrece una reducción drástica del volumen de los reactivos y un microambiente que puede ser controlado con excelente precisión, permitiendo el control preciso de los fluidos y su composición para proveer nutrientes a las células [4]. La microfluídica ha colaborado en el desarrollo de nuevos tipos de dispositivos de cultivos celulares que permitieron el control preciso del microambiente celular y es una potente herramienta para estudios de células in vitro. Durante los últimos 20 años, el desarrollo y maduración de las tecnologías de microfluídica han permitido alcanzar una nueva generación de herramientas de manipulación celular.

Existen factores como la densidad celular después de la activación de las células T [8], la composición del cóctail de citoquinas [9] y el horario de administración que pueden ser ajustados al regular el flujo de alimentación mediante un controlador de presión en los dispositivos de microfluídica

Según las observaciones de Wong y colaboradores, la estimulación antigénica transitoria de los linfocitos T CD8 promueve su proliferación hasta 6 días después de la remoción de la estimulación antigénica. Ellos determinaron que la expansión de las células T CD8 es conducida por la citoquina IL-2 y es fomentada por IL-7 o IL-15 [9] que promueve la diferenciación de las células T en CD8.

La morfología y comportamiento de las células T ha sido monitoreado en microcámaras de PDMS adherido a placas de 96 pocillos durante 72 horas [6]. Esta investigación permitió observar las divisiones celulares a partir de una sola célula.

Un método factible para monitorear la proliferación es medir el área ocupada por las células T cultivadas [7] en el dispositivo multinivel. Este valor numérico serviría como guía para determinar la concentración de citoquina que se administra y el horario de dosificación. Sin embargo, debido a que las combinaciones posibles de citoquina a inyectar son elevadas, la cantidad de experimentos requeridos supera los que pueden ser realizados por un ser humano.

El avance actual de la microscopia permite la toma automática de imágenes de alta definición, permitiendo así la obtención de grandes bases de datos en el área de la bio-ciencia. Esto impulsó el desarrollo de herramientas de procesamiento automático que permitan organizar o pre-procesar dicha información según requisitos específicos, automatizando de esta manera las tareas que son realizadas por técnicos experimentados durante el análisis de las imágenes adquiridas. La extracción de información implícita, previamente desconocida y potencialmente útil de imágenes por medio de algoritmos de procesamiento de imágenes automáticos se ha convertido en un método popular y efectivo para descubrir tendencias o información subyacente en datos generados de manera masiva en dispositivos de microfluídica.

Todos estos algoritmos de procesamiento automático pertenecen al área de machine learning, donde bajo diferentes técnicas matemáticas de ajustes y configuraciones específicas, se logran tareas tales como: clasificación de datos, reconocimiento de patrones, clustering de datos, arboles de decisiones, sistema de control de sistemas complejos, regresiones de series temporales, entre otras.

Mediante aprendizaje supervisado, se logran armar sistemas de identificación y clasificación de imágenes a partir de un conjunto de datos de entrenamiento con el cual se le "enseña" al sistema a identificar las distintas clases disponible en el conjunto de entrenamiento. Por otro lado, empleando el aprendizaje no supervisado, se puede realizar una agrupación automática de los datos según ciertas características que el sistema es capaz de detectar; poniendo esto al descubierto características semejantes en sub-grupos de datos obtenidos de los ensayos en campo.

Reinforcement learning es otro área de machine learning el cual ha ganado popularidad a través de la aplicabilidad de las Deep neural networks. En esta configuración de aprendizaje, un algoritmo (denominado agente) es expuesto a un entorno, con el cual puede interactuar mediante un conjunto de acciones determinadas. Al aplicar alguna de estas acciones, se puede producir cambios en el entorno, los cuales son observados por el agente. Por cada acción ejecutada, el entorno producirá un feedback (denominado recompensa) el cual es entregado al agente para que este pueda conocer cuan buena fue su acción ejecutada para la concreción de un objetivo final preseteado. De esta manera, el agente persigue dicho objetivo maximizando su recompensa que recibe del entorno. Con suficiente tiempo de entrenamiento, el agente se ajustará y aprenderá para cada estado del entorno, cual es la acción que maximice su recompensa y alcance su objetivo prefijado.

Para resolver el problema planteado en este proyecto, se propone que el cultivo de células T será controlado mediante **Inteligencia Artificial (IA)**, específicamente utilizando **Reinforcement Learning**, el cual es uno de los campos de la IA empleado para desarrollar el control de sistemas complejos. Las imágenes de las células T cultivadas en los dispositivos de microfluídica serán analizadas mediante algoritmos que brinden parámetros de proliferación celular, sirviendo como observaciones del proceso a controlar. Serán adquiridas en periodos de tiempos cortos para observar los cambios y enseñar al algoritmo a identificar las diferentes etapas del desarrollo de las células T. A partir de esta información, y luego del proceso de entrenamiento, el algoritmo será capaz de tomar las decisiones adecuadas sobre incrementar o disminuir la concentración de citoquina con el fin de maximizar la proliferación celular.

Citas bibliográficas

1. Wang, X. and I. Rivière, *Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy*. Molecular Therapy - Oncolytics, 2016. **3**: p. 16015.
2. Kalos, M., et al., *T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia*. Science translational medicine, 2011. **3**(95): p. 95ra73-95ra73.
3. Xiao, S., et al., *A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle*. 2017. **8**: p. 14584.
4. Haque, A., et al., *Cell biology is different in small volumes: endogenous signals shape phenotype of primary hepatocytes cultured in microfluidic channels*. 2016. **6**: p. 33980.

5. Lecault, V., et al., *High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays*. Nature Methods, 2011. **8**: p. 581.
6. Zaretsky, I., et al., *Monitoring the dynamics of primary T cell activation and differentiation using long term live cell imaging in microwell arrays*. Lab on a Chip, 2012. **12**: p. 5007
7. Renner, K., et al., *Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions*. Eur. J. Immunol, 2015. **45**: p. 2504.
8. Stemcell. *Optimization of Human T Cell Expansion Protocol: Effects of Early Cell Dilution*. Cell Culture Media and Supplements 2018 [cited 2019; Available from: <https://>]
9. Wong, P. and E.G. Pamer, *Cutting Edge: Antigen-Independent CD8 T Cell Proliferation*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(10): p. 5864.
10. Olmos, C.M., et al., *Hybrid microchannel-solid state micropore device for fast and optical cell detection*. RSC Advances, 2020. **10**(9): p. 5361-5370.
11. Olmos, C.M., et al., *Cost-effective fabrication of photopolymer molds with multi-level microstructures for PDMS microfluidic device manufacture*. RSC Advances, 2020. **10**(7): p. 4071-4079.
12. Olmos, C.M., et al., *Epoxy resin mold and PDMS microfluidic devices through photopolymer flexographic printing plate*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019. **288**: p. 742-748.
13. Georg, M., et al., *Development of image analysis software for quantification of viable cells in microchips*. PLoS One, 2018. **13**(3): p. e0193605.
14. Bourguignon, N., et al., *Accessible and Cost-Effective Method of PDMS Microdevices Fabrication Using a Reusable Photopolymer Mold*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2018. **56**(21): p. 1433-1442.
15. Bourguignon, N., et al., *Production of monoclonal antibodies in microfluidic devices*. Integrative Biology, 2018. **10**(3): p. 136-144.
16. Belgorosky, D., et al., *Analysis of tumoral spheres growing in a multichamber microfluidic device*. Journal of cellular physiology, 2018. **233**(9): p. 6327-6336.
17. Denise Belgorosky, T.F.-C., Ana Belén Peñaherrera-Pazmiño, Yanina Langle, Ross Booth, Shekhar Bhansali, Maximiliano Pérez, Ana María Eiján and Betiana Lerner. *MICROFLUIDIC DEVICE TO ANALYSE CANCER STEM CELLS*. in *IV international congress in translational medicine*. 2017. Buenos Aires.
18. Vega, M., et al., *Effect of butanol and salt concentration on solid-state nanopores resistance*. Cogent Chemistry, 2016. **2**(1): p. 1225345.
19. Vega, M., et al. *Automated and inexpensive method to manufacture solid-state nanopores and micropores in robust silicon wafers*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2016. IOP Publishing.
20. Peñaherrera, A., et al., *Evaluation of cell culture in microfluidic chips for application in monoclonal antibody production*. Microelectronic Engineering, 2016. **158**: p. 126-129.
21. Lerner, B., et al. *Effect of the microchip geometry in cells grown for production of monoclonal antibodies*. in *MNE 41st international conference on micro- and nanofabrication*. 2015. Netherlands.
22. Pattarone G. *Automatic breast cancer cell classification using deep convolutional neural networks*. Master thesis IMBS 2019
23. Ruarte D. *Automated perfusion system for longterm cell culture imaging*. Master thesis IMBS 2020.

Grado de Avance

Trabajos previos realizados por el grupo de investigación en conjunto con instituciones nacionales como internacionales (Brasil, USA, Alemania y España) permitieron alcanzar avances fundacionales en esta línea de investigación.

Por un lado, en el trabajo presentado por [23] se logró estudiar en profundidad distintas estrategias de perfusión de nutrientes y medicamentos para el cultivo de células T (Células de cáncer de mama JIMT-1). En este trabajo, se probaron diversos dispositivos Lab on a chip:

- E-11 multilevel microfluidic PDMS device
- IBIDI μ -Slide III 3D Perfusion ibiTreat
- IBIDI μ -Slide 4 Well ibiTreat

Para medir el crecimiento del cultivo en función de las distintas estrategias de perfusión, el trabajo incluyó una etapa de adquisición de imágenes y post procesamiento. Se empleó como métrica, la medición de la relación de área ocupada por las células antes y después de aplicado el tratamiento. Las imágenes fueron procesadas mediante Fiji y un algoritmo desarrollado *ad-hoc* basado en procesamiento de imágenes y reconocimiento automático de formas.

Adicionalmente, en el trabajo presentado por [22], se implementó una red neuronal para clasificar células T (Células de cáncer de mama) en distintos estadios celulares: células en autofagia (estado de espera), células en apoptosis programada, células vivas y células muertas (que ya entraron en apoptosis); a partir de imágenes de microscopía de campo claro. En este trabajo, cultivos de células fueron preparados en dispositivos Lab on a chip, y luego de distintas estrategias de perfusión, se obtuvo una amplia base de datos de los cultivos mediante microscopios adecuados. La base de datos contó con imágenes de microscopía de campo claro e imágenes de tinciones realizadas sobre los cultivos, a modo de conocer el verdadero estado de las células luego del tratamiento específico aplicado. De esta manera, se logró obtener con un muy buen porcentaje de acierto, una red neuronal capaz de identificar distintos estadios celulares sin necesidad de realizar una tinción del cultivo. Esto permite determinar los distintos estadios de un cultivo celular sin intervención sobre el mismo durante un proceso de perfusión de

citoquinas de distintos tipos o concentraciones.

En lo que respecta a la construcción de dispositivos *Lab on a chip*, el grupo tiene importantes trabajos en este ámbito [10 a 16] al mismo tiempo que se han realizado avances en el control automático de bombas de perfusión para realizar control de tinciones en mezcla de fluido en dispositivos de microfluídica.

De lo enunciado anteriormente se destaca la capacidad del grupo de investigación en el conocimiento y manejo experimental de [17 a 21]:

- Cultivo de células en distintos dispositivos.
- Perfusión controlada por bombas.
- Sistema de captura de imágenes durante el crecimiento / ensayo.
- Técnicas confiables sobre como contabilizar, detección de crecimiento y viabilidad celular.

Objetivos de la investigación

Objetivo general:

El objetivo general de este plan de trabajo es desarrollar una nueva metodología para optimizar la proliferación de células T, utilizando **inteligencia artificial** combinada con adquisición y de **imágenes en tiempo real** sobre cultivos celulares en dispositivos **lab on a chip** (LOC).

Se pretende generar un proceso automático que permita controlar las microbombas de inyección de medio para administrar los reactivos necesarios con el fin de afectar el crecimiento del cultivo de la manera deseada.

Objetivos específicos:

- Adquirir imágenes de la morfología de las células T y procesar las mismas para obtener parámetros de características que permitan al sistema experto reconocer los estadios del desarrollo de las células
- Entrenar un sistema experto capaz de reconocer patrones en el crecimiento de células T y de tomar decisiones así como de controlar la administración de sustancias.
- Determinar las concentraciones óptimas del cóctel de citoquinas que se debe dosificar a las células T y los horarios a los cuales deben ser entregados, para obtener la mejor proliferación posible en dispositivos de microfluídica.

Descripción de la metodología

En este proyecto, se estudiarán sistemas de control automático mediante inteligencia artificial para la proliferación de células T de dispositivos de microfluídica. El desarrollo del mismo requiere de un equipo interdisciplinario que se encargue de distintos aspectos, tales como la construcción de los dispositivos de microfluídica, la obtención y preparación adecuada de las células T, la configuración adecuada del set-up de horno de cultivo en conjunto con los microscopios automáticos y los equipos especiales para el procesamiento de datos y entrenamiento del agente de inteligencia artificial.

Se detalla a continuación cada aspecto así mencionado en detalle.

Fabricación de dispositivos de microfluídica

La arquitectura de los canales se diseña en Layout editor software y se transfiere a un film como se describe en nuestro trabajo previo [11] para fabricar un molde hembra. Posteriormente, la resina epóxica se coloca sobre el molde hembra para replica el diseño en alto relieve; el molde macho resultante se utiliza para fabricar dispositivos polidimetilsiloxano (PDMS) y su agente curante SYLGARD 184 (Dow Corning, USA) en una proporción 10:1. Para fabricar el piso de PDMS se utiliza el mismo procedimiento pero sin aplicar el diseño. El dispositivo de microfluídica consiste en dos réplicas curadas de PDMS. Para fabricar la réplica donde se albergan las células (PDMS-piso), se utilizan 3 gramos de PDMS desgasificado de la mezcla PDMS-agente curante y se dispensan sobre el molde de resina epóxica. En cuanto a la capa de PDMS superior, se utilizan 5 gramos de la mezcla PDMS-agente curante. Ambas replicas se curan a 40°C durante 24 horas. Finalmente, el piso de PDMS y la capa superior son expuestas a plasma de oxígeno producido por el generador de alta frecuencia BD-10A (Electro-Technic Products, USA) para enlazar las dos capas de forma irreversible.

Purificación, activación y cultivo de células T

Se extrae sangre de un ratón saludable y se separan las células mononucleares de sangre periférica mediante el medio de separación de linfocitos (Anprotec, Alemania) por gradiente de densidad al centrifugar sin el freno para evitar disturbar las capas mientras la centrífuga se detiene. La capa de mononucleares se colecta y se lava con PBS antes de colocar los 20 µl de microcuentas CD3 (Miltenyl Biotec GmbH, Germany) como se describe en el protocolo recomendado por el fabricante. Las células CD3⁺ son aisladas a través de la tecnología MACS® para selección positiva. Se obtienen 1.2 x10⁶ células T y 33,8 µl de

Gibco? Dynabeads? T-Activator CD3/CD28(Thermo Fisher Scientific, Lithuania) se aplican para activar las células T en una relación 1:1.

Estimulación de las células T en el microdispositivo

Las células T se cultivan en medio RPMI 1640 (1X) 90%, Gibco (Life Technologies, United Kingdom) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% penicilina/estreptomina (Life Technologies, United Kingdom) y 20 ng.ml^{-1} de interleuquina humana recombinante 2 (rh IL-2) (CellGenix, Germany) para estimulación de las células en botellas T-25 durante 3 días. Al cuarto día de crecimiento, 1.39×10^5 células/ml son cultivadas en el dispositivo microfluidico y se monitorean durante 9 días con el microscopio invertido Zeiss Axio Observer con las magnificaciones 2.5X y 10X. El medio de cultivo se renueva cada 3 días a $5.5 \text{ } \mu\text{l.min}^{-1}$ con una bomba de jeringa modelo A22 (ADOX, Argentina).

Estufa de cultivo y microscopios

Las imágenes de crecimiento celular serán obtenidas mediante un microscopio supereyes. Se empleará una magnificación de 10x sobre una superficies de $867 \times 660 \mu\text{m}$, con un factor de conversión de $0.645 \text{ } \mu\text{m/pixel}$ generando de esta manera imágenes de 1346×1024 pixeles y un resolución de 16bit. El microscopio supereyes permite el cultivo en condiciones controladas de temperatura, humedad y CO_2 ; y al mismo tiempo realizar adquisición de imágenes en tiempo real. Se adquirirán imágenes cada 30 minutos, por un período total de 72 hs que dure el ensayo de cada dispositivo, obteniendo de esta manera un total de 144 imágenes por dispositivo de cultivo.

Segmentación y procesamiento de imágenes

El área ocupada por las células en cada microcanal del dispositivo es estimada por un algoritmo escrito en FIJI. El algoritmo será entrenado con imágenes para que reconozca características específicas de la morfología celular. En cuanto al modelado se propone utilizar las técnicas de identificación por mínimos cuadrados para obtener una estructura dinámica lineal o no lineal que describa el comportamiento del proceso biológico a los fines de la posterior definición de la ley de control.

Una vez las células fueron segmentadas, se correrá un algoritmo de reconocimiento del estado de las mismas, empleando una red neuronal U-Net, ampliamente utilizada en imágenes biológicas, previamente entrenada para reconocer células en estados: autofagia, apoptosis programada, células vivas y células muertas. De esta etapa se espera obtener indicadores claros sobre el crecimiento, disminución del cultivo celular (células vivas, muertas, área ocupada, etc.) en el dispositivo de microfluidica durante el proceso de ensayo para brindar la información requerida por el agente.

Agente de aprendizaje reforzado

El agente a emplear estará basado en el concepto de aprendizaje reforzado, para el cual el agente debe ser capaz de realizar experimentaciones sobre el entorno que desea aprender a controlar, tomando observaciones de la recompensa obtenida por cada acción ejecutada.

El agente intentará maximizar la cantidad de células-T vivientes tomando acciones sobre las bombas de perfusión que suministren distintas citoquinas. De esta manera, el agente recibirá observaciones (células vivas, muertas, área ocupada, etc) del dispositivo que tiene el cultivo mediante imágenes obtenidas con un microscopio e inyectará la dosis adecuada de citoquinas para maximizar la cantidad de células T. Se modelará el proceso como una Markov Decision Process (MDP) con un campo de acciones en concordancia con las citoquinas a inyectar.

La parte de control será implementada en Python, empleando las librerías de Reinforcement Learning de TensorFlow y PyTorch. El espacio de acciones será discreto, acorde con la escala discreta de flujos de inyección de las bombas de perfusión a controlar. Por otro lado, el espacio de estados del entorno también será discreto, estableciendo estados de crecimiento o decrecimiento del cultivo. Las políticas para el aprendizaje a utilizar será la que más se adapte al problema a solucionar.

Es importante mencionar que el responsable del proyecto actualmente está trabajando en conjunto con el grupo de neurorobótica de la universidad de Freiburg (Alemania), quienes son referentes globales en el área de machine learning para el control computacional de sistemas complejos.

12. Contribuciones del Proyecto

Contribuciones al avance científico, tecnológico, transferencia al medio

La efectividad de este método podría ser de gran utilidad para la producción de medios de cultivo definidos para la terapia de células CAR-T. Las células T utilizadas en este tipo de terapias pertenecen al paciente, por lo que los medios definidos comerciales estándar para células T no tienen la misma efectividad con las células T extraídas de diferentes pacientes. De ahí que generar un medio definido específico para cada paciente sería de gran utilidad. Mediante la tecnología propuesta, se pretende evaluar el crecimiento de células T utilizando diferentes citoquinas, de manera de encontrar la composición óptima para cada tipo de células T.

Esta nueva tecnología no solo abre la puerta para explorar **una nueva forma de evaluar el cultivo celular, analizando miles de variables de manera simultánea y automática**, sino que también tendrá un gran impacto en el área de la salud y la

medicina personalizada.

Contribuciones a la formación de Recursos Humanos

En el contexto del proyecto estarán involucrados 3 estudiantes de doctorado, 2 de posdoctorado y 3 investigadores formados, esto brindará un ámbito de intercambio de experiencias y conocimientos entre los mismos.

A su vez, el grupo de investigación conformado es de características heterogéneas en formación académica de sus integrantes. Esta diversidad de áreas del conocimiento aunadas en un proyecto de investigación permitirá el abordaje de problemáticas con distintas estrategias que resultará un aspecto enriquecedor en la formación profesional de los integrantes.

Por otro lado, dadas las características del proyecto de investigación, cabe la posibilidad de incorporar becarios de las carreras de grado que dicta la UTN FRGP para que los alumnos desarrollen su proyecto final con aplicación en equipos necesarios de módulos experimentales del presente proyecto.

Por último, en el ámbito de la Semana de la innovación que se lleva año tras año en la UTN FRGP, se prevé brindar charlas y seminarios sobre los avances alcanzados en el proyecto como así también en cátedras de carreras de grado tales como:

- Fundamentos para el análisis de señales.
- Metodología de la investigación.
- Mecánica de los fluidos.

13. Cronograma de Actividades

Año	Actividad	Inicio	Duración	Fin
1	Búsqueda bibliográfica actualizada.	01/01/2021	2 meses	28/02/2021
1	Construcción de dispositivos LOC	01/01/2021	4 meses	30/04/2021
1	Cultivos de células T para los ensayos.	01/03/2021	8 meses	31/10/2021
1	Ajustes y validación de algoritmos de procesamiento de imágenes.	01/03/2021	4 meses	30/06/2021
1	Programación del agente de Reinforcement Learning.	01/07/2021	4 meses	31/10/2021
1	Validación del agente mediante simulaciones.	01/09/2021	4 meses	31/12/2021
1	Montaje de laboratorio de ensayos de LOC. Validación de sus funciones.	01/09/2021	2 meses	31/10/2021
2	Implementación en laboratorio del sistema experto.	01/01/2022	2 meses	28/02/2022
2	Ensayos en dispositivos LOC y entrenamientos del agente.	01/02/2022	11 meses	31/12/2022
2	Ajustes de dispositivos y del agente.	01/06/2022	2 meses	31/07/2022
2	Transfer learning entre distintas etapas de aprendizaje.	01/07/2022	2 meses	31/08/2022
2	Publicaciones de resultados parciales.	01/08/2022	4 meses	30/11/2022
3	Ajustes finales del agente.	01/01/2023	2 meses	28/02/2023
3	Ensayos en dispositivos LOC y entrenamientos del agente.	01/03/2023	8 meses	31/10/2023
3	Ajustes de dispositivos y del agente.	01/06/2023	2 meses	31/07/2023
3	Transfer learning entre distintas etapas de aprendizaje.	01/07/2023	2 meses	31/08/2023
3	Publicaciones del resultado de la investigación.	01/08/2023	4 meses	30/11/2023
3	Informe final.	01/11/2023	2 meses	31/12/2023

14. Conexión del grupo de Trabajo con otros grupos de investigación en los últimos cinco años

Grupo Vinc.	Apellido	Nombre	Cargo	Institución	Ciudad	Objetivos	Descripción
Department of Electrical and Computer Engineering.	Bhansali	Shekhar	DIRECTOR	Florida International University	Florida USA	Referente a nivel global en el área de micro y nanotecnología, teniendo publicaciones en importantes revistas internacionales. El Dr. Shekhar Bhansali colabora con el grupo en la fabricación de dispositivos en la clean room de la UNSAM cuando las capacidades de microfabricación de el grupo de trabajo o sus colaboradores locales requieren alguna tecnología o proceso no existente en el país.	
Neurorobotics Lab	Boedecker	Joschka	DIRECTOR	University of Freiburg	Freiburg, Alemania	Referente a nivel global en el machine learning, teniendo publicaciones en importantes revistas internacionales. El Dr. Boedecker Joschka colabora con el grupo en la implementación de algoritmos de inteligencia artificial para el procesamiento de imágenes biomédicas y el control de dispositivos LOC	

15. Presupuesto

Total Estimado del Proyecto: \$ 5054886,00

15.1. Recursos Humanos - Inciso 1 e Inciso 5

Primer Año

Becarios Inciso 5	Cantidad	Pesos	Origen del financiamiento
1. Becario Alumno Fac.Reg.	0	\$ 0,00	-
2. Becario Alumno UTN-SAE	0	\$ 0,00	-
3. Becario Alumno UTN-SCyT	0	\$ 0,00	-
4. Becario BINID	0	\$ 0,00	-
5. Becario Posgrado-Doctoral en el país	3	\$ 378000,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
6. Becario Posgrado Doctoral en el extranjero	0	\$ 0,00	-
7. Becario Posgrado - Especialización	0	\$ 0,00	-
8. Becario Posgrado - Maestría en el país	0	\$ 0,00	-
9. Becario Posgrado - Maestría en el extranjero	0	\$ 0,00	-

Docentes Investigadores y Otros - Inciso 1	Cantidad	Pesos
1.Administrativo	0	\$ 0,00
2.CoDirector	1	\$ 190500,00
3.Director	1	\$ 190500,00
4.Investigador de apoyo	0	\$ 0,00
5.Investigador Formado	5	\$ 813462,00
6.Investigador Tesista	0	\$ 0,00
7.Otras	0	\$ 0,00
8.Técnico de Apoyo	0	\$ 0,00

Totales	Inciso 5	Inciso 1	Total
Primer Año	\$ 378000,00	\$ 1194462,00	\$ 1572462,00

Segundo Año

Becarios Inciso 5	Cantidad	Pesos	Origen del financiamiento
1. Becario Alumno Fac.Reg.	0	\$ 0,00	-
2. Becario Alumno UTN-SAE	0	\$ 0,00	-
3. Becario Alumno UTN-SCyT	0	\$ 0,00	-
4. Becario BINID	0	\$ 0,00	-
5. Becario Posgrado-Doctoral en el país	3	\$ 378000,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
6. Becario Posgrado Doctoral en el extranjero	0	\$ 0,00	-
7. Becario Posgrado - Especialización	0	\$ 0,00	-
8. Becario Posgrado - Maestría en el país	0	\$ 0,00	-
9. Becario Posgrado - Maestría en el extranjero	0	\$ 0,00	-

Docentes Investigadores y Otros - Inciso 1	Cantidad	Pesos
1.Administrativo	0	\$ 0,00
2.CoDirector	1	\$ 190500,00
3.Director	1	\$ 190500,00
4.Investigador de apoyo	0	\$ 0,00
5.Investigador Formado	5	\$ 813462,00
6.Investigador Tesista	0	\$ 0,00
7.Otras	0	\$ 0,00
8.Técnico de Apoyo	0	\$ 0,00

Totales	Inciso 5	Inciso 1	Total

Segundo Año	\$ 378000,00	\$ 1194462,00	\$ 1572462,00
-------------	--------------	---------------	---------------

Tercer Año

Becarios Inciso 5	Cantidad	Pesos	Origen del financiamiento	
1. Becario Alumno Fac.Reg.	0	\$ 0,00	-	-
2. Becario Alumno UTN-SAE	0	\$ 0,00	-	-
3. Becario Alumno UTN-SCyT	0	\$ 0,00	-	-
4. Becario BINID	0	\$ 0,00	-	-
5. Becario Posgrado-Doctoral en el país	3	\$ 378000,00	-	-
6. Becario Posgrado Doctoral en el extranjero	0	\$ 0,00	-	-
7. Becario Posgrado - Especialización	0	\$ 0,00	-	-
8. Becario Posgrado - Maestría en el país	0	\$ 0,00	-	-
9. Becario Posgrado - Maestría en el extranjero	0	\$ 0,00	-	-

Docentes Investigadores y Otros - Inciso 1	Cantidad	Pesos
1.Administrativo	0	\$ 0,00
2.CoDirector	1	\$ 190500,00
3.Director	1	\$ 190500,00
4.Investigador de apoyo	0	\$ 0,00
5.Investigador Formado	5	\$ 813462,00
6.Investigador Tesista	0	\$ 0,00
7.Otras	0	\$ 0,00
8.Técnico de Apoyo	0	\$ 0,00

Totales	Inciso 5	Inciso 1	Total
Tercer Año	\$ 378000,00	\$ 1194462,00	\$ 1572462,00

TOTAL GENERAL	Inciso 5	Inciso 1	Total General
Todo el Proyecto	\$ 1134000,00	\$ 3583386,00	\$ 4717386,00

15.2 Bienes de consumo - Inciso 2

Año del Proyecto	Financiación Anual	Solicitado a
1	\$ 40.000,00	UTN - SCTyP
2	\$ 40.000,00	UTN - SCTyP
3	\$ 40.000,00	UTN - SCTyP
Total en Bienes de Consumo		\$ 120.000,00

15.3 Servicios no personales - Inciso 3

Año	Descripción	Monto	Solicitado a
1	Publicación en journal o participación en congreso	\$ 52.500,00	UTN - SCTyP
1	Viaticos y seguros de traslado	\$ 20.000,00	UTN - SCTyP
2	Publicación en journal o participación en congreso	\$ 52.500,00	UTN - SCTyP
2	Viaticos y seguros de traslado	\$ 20.000,00	UTN - SCTyP
3	Publicación en journal o participación en congreso	\$ 52.500,00	UTN - SCTyP
3	Viaticos y seguros de traslado	\$ 20.000,00	UTN - SCTyP
Total en Servicios no personales		\$ 217.500,00	

15.4 Equipos - Inciso 4.3 - Disponible y/o necesario

Año	Disp/Nec	Origen	Descripción	Modelo	Otras Espec.	Cantidad	Monto Unitario	Solicitado a
1	Disponible	Importado	Computadora de escritorio	i7, 16GgRAM, monitor 21"	-	6,00	\$ 0,00	Facultad Regional
1	Disponible	Nacional	Autoclave con bomba de vacio	-	-	1,00	\$ 0,00	Facultad Regional
1	Disponible	Nacional	Horno de convección para secado	-	-	1,00	\$ 0,00	Facultad Regional
								Organismos públicos

1	Disponible	-	Bombas de inyección a jeringa ADOX - Activa A22	-	-	4,00	\$ 0,00	nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Equipo de PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) para deposición de películas delgadas y	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Equipo para realización de fotolitografía para la fabricación de micro y nanoporos	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Balanza analítica	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Fuente para la detección y sensado eléctrico de células	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Microscopio de fluorescencia	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Estufa de cultivo.	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Equipo de espectrofotometría UV, infrarrojo, visible	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Baños de incubación con agitación mecánica	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Heladeras	-	-	2,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	freezer de ?20°C	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Cubas de electroforesis	-	-	1,00	\$ 0,00	Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI,

									CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Cicladores térmicos convencionales	-	-	1,00	\$ 0,00		Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
1	Disponible	-	Microcentrifuga	-	-	1,00	\$ 0,00		Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)
Total en Equipos							\$ 0,00		

15.5 Bibliografía de colección - Inciso 4.5 - Disponible y/o necesario

Año	Disp/Nec	Origen	Descripción	Modelo	Otras Espc.	Cantidad	Monto Unitario	Solicitado a
1	Disponible	-	Biblioteca FRGP	-	-	1,00	\$ 0,00	Facultad Regional
1	Disponible	-	Biblioteca IREM UTN FRH	-	-	1,00	\$ 0,00	Facultad Regional
1	Disponible	-	Portal de acceso de bibliotecas electrónicas	-	-	1,00	\$ 0,00	UTN - SCTyP
Total en Bibliografía							\$ 0,00	

15.6 Software - Disponible y/o necesario

Año	Disp/Nec	Origen	Descripción	Modelo	Otras Espc.	Cantidad	Monto Unitario	Solicitado a
-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total en Software							\$ 0,00	

16. Co-Financiamiento

Año	RR.HH.	Bienes de Consumo	Equipamiento	Servicios no personales	Bibliografía	Software	Total
1	\$1.572.462,00	\$40.000,00	\$0,00	\$72.500,00	\$0,00	\$0,00	\$1.684.962,00
2	\$1.572.462,00	\$40.000,00	\$0,00	\$72.500,00	\$0,00	\$0,00	\$1.684.962,00
3	\$1.572.462,00	\$40.000,00	\$0,00	\$72.500,00	\$0,00	\$0,00	\$1.684.962,00
Total del Proyecto	\$4.717.386,00	\$120.000,00	\$0,00	\$217.500,00	\$0,00	\$0,00	\$5.054.886,00

Financiamiento de la Universidad

Universidad Tecnológica Nacional - SCyT	\$ 337.500,00
Facultad Regional	\$ 501.462,00

Financiamiento de Terceros

Organismos públicos nacionales (CONICET, Agencia, INTI, CONEA, etc.)	\$ 4.215.924,00
Organismos / Empresas Internacionales / Extranjeros	\$ 0,00
Entidades privadas nacionales (Empresas, Fundaciones, etc.)	\$ 0,00
Otros	\$ 0,00
Total	\$ 5.054.886,00

Avales de aprobación, Financiamiento y Otros

	Orden	Nombre de archivo	Tamaño
Descargar	1	AvaldeptoelctricaPIDMLmicrofluidica.pdf	631325
Descargar	2	Formulario-Comite-EticaPIDMLmicrofluidica.pdf	116903
Descargar	3	Plan_de_Gestion_de_DatosPIDMLmicrofluidica.pdf	93394
Descargar	4	Resolución534-200K.pdf	76275
Descargar	5	RES584-OK.pdf	219030

Curriculums (Curriculums de los integrantes cargados en el sistema)