

FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA CÁMARA CLIMÁTICA PARA EL DESARROLLO DE TÉCNICAS DE BIOIMPRESIÓN 3D

Manuel Matamoros Pacheco
Universidad de Extremadura, manuelmp@unex.es

Álvaro Sánchez Ortega
Universidad de Extremadura, ajs@unex.es

José Luis Canito Lobo
Universidad de Extremadura, jlcanito@unex.es

Alfonso Carlos Marcos Romero
Universidad de Extremadura, acmarcos@unex.es

Juan Pablo Carrasco Amador
Universidad de Extremadura, jpcarrasco@unex.es

Juan Carlos Gómez Blanco
Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, jcgomez@ccmijesususon.com

Enrique Mancha Sánchez
Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, emancha@ccmijesususon.com

Francisco Miguel Sánchez Margallo
Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, msanchez@ccmijesususon.com

José Blas Pagador Carrasco
Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, jpagador@ccmijesususon.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo es la optimización de las técnicas de bioimpresión en el campo de la regeneración tisular de cartílago y la generación de prótesis vasculares. En este trabajo se ha realizado el diseño, fabricación y evaluación de un prototipo de cámara climática. El diseño final de la cámara será capaz de albergar en su interior una bioimpresora 3D. El control de temperatura, humedad y CO₂ generará una atmósfera controlada, estéril y estanca, para el perfecto desarrollo del proceso de bioimpresión y maduración de tejidos celulares.

Palabras clave: bioingeniería, bioimpresión, cartílago, prótesis, biocámara.

1 INTRODUCCIÓN

La aplicación de la tecnología de impresión 3D al campo de la ingeniería tisular, a través de la bioimpresión, nace de la necesidad de mejorar las técnicas tradicionales de cultivo de tejidos (cultivos 2D) generando estructuras tridimensionales más

complejas y solventando otra serie de problemas de esta disciplina, como disminuir la complejidad de los procesos (menos pasos de fabricación), aumentar la viabilidad y funcionalidad celular; y la posibilidad de generación de matrices extracelulares [10].

Las investigaciones actuales se centran en recrear de manera más automática y reproducible estructuras celulares que reproduzcan de forma fidedigna las características físicas y químicas del tejido base. Estos tejidos bioimpresos se pueden utilizar en la evaluación de fármacos y químicos [6], para la integración de sistemas de control para diagnóstico (microfluidics) [10], o en la creación de órganos para trasplantes [3], [5], [2].

España es país líder en trasplante a nivel mundial, alcanzando 39,7 donantes por millón de población (pmp), muy por encima de la media europea, situada en 19.6 donantes pmp u otros países como Estados Unidos (26.6 donantes pmp) o Australia (16.1 donantes pmp) y un total de 4.769 pacientes trasplantados en 2015 [9]. No obstante, estas buenas cifras no son suficientes para cubrir las necesidades de los pacientes que esperan un órgano para

trasplante, situación que se ve aún más comprometida en el resto de países con una tasa de donación inferior. En el caso concreto del trasplante de riñón, sería necesario realizar 150-160 trasplantes pmp en España, tasa que triplica el ratio actual de 50 trasplantes de riñón pmp.

Además, alrededor de 6-8% de pacientes esperando un trasplante mueren en España cada año, cifra que además puede estar estimada a la baja, ya que hay pacientes que, debido al deterioro de su situación clínica, son descartados como posibles receptores de un trasplante [6], [8]. La impresión 3D de órganos funcionales sería una solución al problema presentado, reduciendo las listas de espera y, en caso de usar las propias células del paciente, minimizando las complicaciones derivadas del rechazo y las terapias inmunosupresoras.

Puesto que la bioimpresión 3D de órganos funcionales es un objetivo a largo plazo, el presente estudio va a focalizar los esfuerzos en dos aplicaciones que permitan el avance de la tecnología y que sienten las bases para desarrollos posteriores. Dentro de la medicina regenerativa, mercado que se espera que llegue a los 67.000 millones de dólares en 2020 [1], nos centraremos en la regeneración del cartílago y en la generación de prótesis vasculares.

Las tecnologías de bioimpresión suelen utilizar dos tipos de biomaterial principalmente: polímeros curables, que establecen sus enlaces entre sí mediante diferentes tipos de activación como puede ser la exposición a fuentes de luz específicas o la adición de alguna otra sustancia; e hidrogeles, que están formados por una red de cadenas flexibles, poliméricas e hidrofílicas [14], [3]. El primer tipo se suele denominar scaffolds y se imprimen con técnicas de extrusión térmica tradicionales en impresión 3D (FDM) para posteriormente, en otro proceso, colocar las células en dicho andamiaje. Por otro lado, el segundo tipo suele curarse usando técnicas de photo cross-linking, ionic/chemical cross-linking o thermal cross-linking y las células se encuentran ya en el hidrogel cuando se realiza el proceso de impresión.

Actualmente el reto científico en la generación de biomateriales para bioimpresión se encuentra en lograr un equilibrio entre las condiciones para imprimir células altamente viables (bajas tasas de mortalidad celular) y la generación de estructuras de soporte lo suficientemente fuertes (gelificación para obtener estructuras 3D), ambas características presentes en el mismo hidrogel [14].

En el presente trabajo se aborda la solución a uno de los problemas planteados, concretamente lograr bajas tasas de mortalidad celular, y para ello toman

especial relevancia los aspectos de esterilidad, estanqueidad e incubación durante el proceso de bioimpresión.

Por cuestiones de bioseguridad, un laboratorio y todo su equipamiento debe estar libre de contaminaciones y contaminantes antes de ser utilizado, por lo que es necesario realizar una limpieza y desinfección de todo el equipamiento y utillaje utilizado [15]. Por tanto, la esterilización es un procedimiento necesario para la correcta utilización de la tecnología de bioimpresión [12]. Entre los procedimientos que se pueden aplicar para mantener material de laboratorio en condiciones óptimas de bioseguridad se incluye la aplicación de aire caliente, vapor, radiación, alcoholes, aldehídos o fenoles. Las bioimpresoras, por su construcción y componentes, son elementos difíciles de limpiar y esterilizar [4], aunque bioimpresoras como la Aether 1 ha abordado este problema mediante la implantación de un sistema de limpieza y cambio de cabezales extrusores.

Las cabinas de flujo laminar son recintos o dispositivos especialmente diseñados para impedir que entre aire o partículas en su interior sin antes ser filtrados y se emplean para evitar la posible contaminación de los tejidos durante su manipulación, de tal manera que se trabaje en condiciones de estanqueidad [12]. Es en estas cabinas donde se lleva a cabo la preparación de las células, hidrogeles y medios de cultivo y donde se sitúan las bioimpresoras para llevar a cabo las impresiones de material biológico.

Por otro lado, las incubadoras son los sistemas que mantienen la temperatura, la presión, la humedad y el pH en los valores idóneos para promover el desarrollo celular [4], [11]. Actualmente las incubadoras más utilizadas son las llamadas húmedas de CO₂. Puesto que la correcta maduración de las células en una incubadora depende de la obtención de las condiciones de cultivo óptimas de cada línea celular, es importante disponer de un sistema de incubación preciso y rápido, que actúe ante cambios mínimos en las condiciones ambientales del entorno. Esta última será la solución que se desarrollará en el presente trabajo.

2 MÉTODOS

Los requisitos a alcanzar para la funcionalidad de la cámara climática que albergará las técnicas de bioimpresión son los siguientes: estabilizar la temperatura en 37°C, humedad relativa del 95% y 5000 ppm de CO₂.

Para cumplir las exigencias anteriores se han utilizado las siguientes técnicas e instrumentos:

2.1 CONTROL DE TEMPERATURA, HUMEDAD Y CO₂

Para el control de todos los parámetros climáticos fundamentales del interior de la cámara se ha empleado: Arduino® Mega y Raspberry Pi 3.

Se ha desarrollado una aplicación mediante Python® que permite controlar mediante un entorno gráfico los valores de temperatura, humedad y CO₂, indicando de forma gráfica los valores numéricos a tiempo real, así como sus zonas de tolerancia. La medición de dichos parámetros se lleva a cabo desde una base de sensores colocados en el punto (0,20,30) cm.

Se implementaron todos los controles en una caja de plástico sin condiciones rigurosas de estanqueidad con el objetivo de utilizar un primer prototipo donde realizar pruebas. se realizaron varias perforaciones para dotar a la caja de todos los cables eléctricos para el funcionamiento de los accionadores que gobiernan el sistema, sin necesidad de derrochar material ni cometer errores en el prototipo definitivo.

Temperatura: El control de temperatura fue el primer sistema en implementarse dentro del prototipo, el cual consta de los siguientes componentes: resistencia eléctrica cerámica, termistor DS18B20 y relé TONGLING JQC-3FF-S-Z.

Se ha utilizado la placa Arduino® Mega para controlar la apertura o cierre del paso de corriente mediante el relé que acciona el encendido o apagado de la resistencia eléctrica. Mediante el termistor se realizó la medición de temperatura en el interior del habitáculo, el cual mandará la lectura a la placa Arduino® para que esta la interprete y mande la orden al relé de nuevo.

Para el correcto control de temperatura en el interior del habitáculo (de dimensiones 40x60x40 cm tal y como se muestra en la Figura 2) fue necesario realizar un procedimiento de evaluación de la temperatura en distintos puntos del interior de la cámara. Se utilizó un termómetro de calibración tipo MicroLite USB Temperature Logger (8K Memory).

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente forma: 1) Posicionar el sensor de temperatura DS18B20 en un lugar fijo de la cámara y 2) realizar mediciones de temperatura con el termómetro de calibración. En cada punto de estudio se adquirieron datos durante 656 segundos por parte del sensor de temperatura y del termómetro de calibración. El tiempo de muestreo ha sido calculado para que la temperatura haya quedado durante varios minutos dentro de las tolerancias del sistema.

Para realizar las mediciones se fijó una temperatura ambiente (en laboratorio) de 22 °C. Una vez fijada la condición, y sin añadir humedad extra ni CO₂, se procedió a asignar en el interior de la cámara una temperatura de consigna de 37 °C.

Dichas mediciones se realizaron en 6 puntos distintos del volumen, tal y como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1: Puntos de medida.

Puntos	Coordenadas (x,y,z) cm
1	15,20,0
2	30,20,0
3	45,20,0
4	15,20,40
5	30,20,40
6	45,20,40

, ,

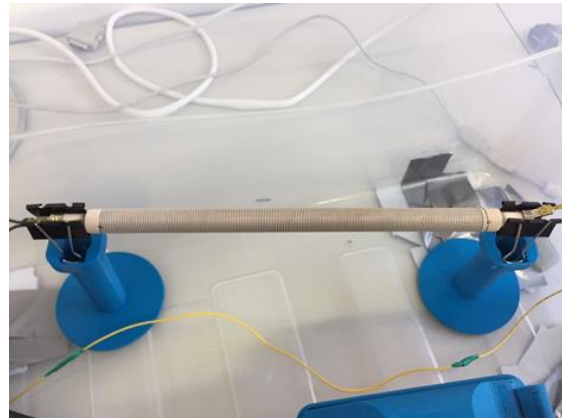


Figura 1: Resistencia eléctrica cerámica sobre soportes impresos en 3D.

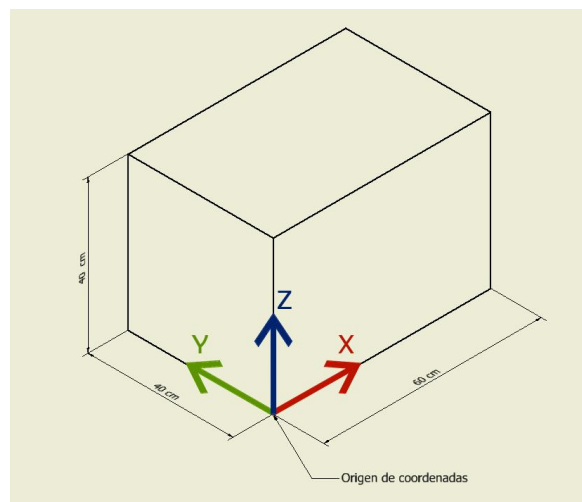


Figura 2: Dimensiones de la cámara.

Humedad: El control de humedad fue el segundo sistema en implementarse dentro del prototipo, el cual consta de los siguientes componentes: sensor de humedad DHT22, relé TONGLING JQC-3FF-S-Z y humidificador de fabricación propia con evaporación mediante transductor piezoeléctrico.

Se ha utilizado la placa Arduino® Mega para controlar la apertura o cierre del paso de corriente mediante el relé que acciona el encendido o apagado del sistema de humidificación. Mediante el sensor de humedad se realiza la medición del porcentaje de humedad en el interior del habitáculo, el cual mandará la lectura a la placa Arduino® para que ésta la interprete y mande la orden al relé de nuevo.

CO₂: Se ha implementado el control para gobernar la cantidad de dióxido de carbono que se introduce en el interior de la cámara. El sistema está equipado de una botella de CO₂ de aluminio de 500 gramos, marca AquaMedic®, un manoreductor de dos esferas de marca Blau®, un cuentaburbujas y una electroválvula marca Blau® (3VA, 14mA, IP 85) para regular la apertura o cierre de CO₂ al interior de la cámara.

Se ha utilizado la placa Arduino® Mega para controlar la apertura o cierre de la electroválvula que lleva incorporada la botella de CO₂. Mediante el sensor de CO₂ tipo Telaire® T6713, se realiza la medición de las partes por millón (ppm) que hay de CO₂ en el interior del habitáculo. Dicho sensor mandará la lectura a la placa Arduino® para que ésta la interprete y mande la orden a la electroválvula de nuevo.

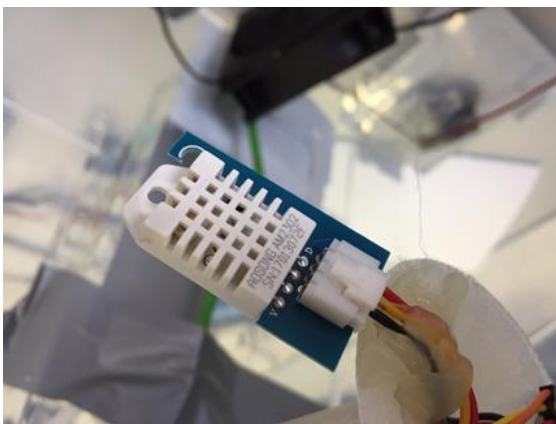


Figura 3: Sensor de humedad.



Figura 4: Dispositivo humidificador impreso en 3D.



Figura 5: Vista del alojamiento del transductor piezoeléctrico en el humidificador.

2.2 INTERFAZ DE CONTROL

La aplicación desarrollada mediante Python® para el control de los parámetros climáticos del habitáculo está implementada en una Raspberry® Pi 3 con salida a un monitor donde se muestran los controles que el usuario podrá cambiar en función de las condiciones que desee en el interior de la cámara. Consta de una pantalla con tres gráficos que muestran la evolución a lo largo del tiempo de la temperatura, humedad y concentración de CO₂, y ligado a éstos, dos botones por cada gráfico para que el usuario pueda aumentar o disminuir los parámetros que desee.

3 RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente estudio se ha analizado de manera rigurosa todo lo relacionado con el control de la temperatura, quedando el resto de parámetros con resultados iniciales y sistemas.

Se ha desarrollado una interfaz que permite un control total del sistema al usuario con una aplicación sencilla y visualmente informativa. En la figura 6 se aprecia cómo se han alcanzado dichos requisitos además de estabilizarse a lo largo del tiempo.

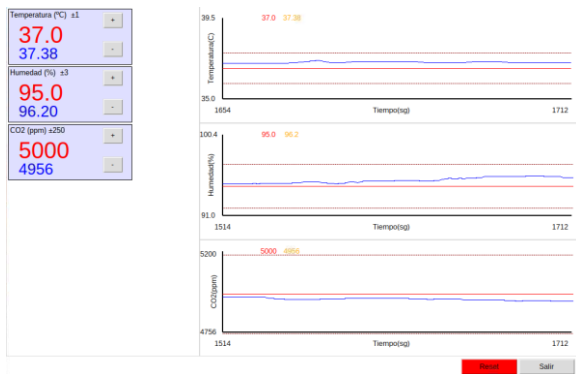


Figura 6: Pantalla de lectura de variables de control.

A continuación, se muestran tres gráficos con la evolución de la temperatura, humedad y CO₂ registrados por los sensores posicionados en (0,20,30) cm desde valores de partida en función de las condiciones en las que se encontraba el laboratorio en el momento de realizar el ensayo (temperatura de 29,12 °C, 66,9 % de humedad y 740 ppm de CO₂) hasta el tiempo en el que consiguieron estabilizar los valores.

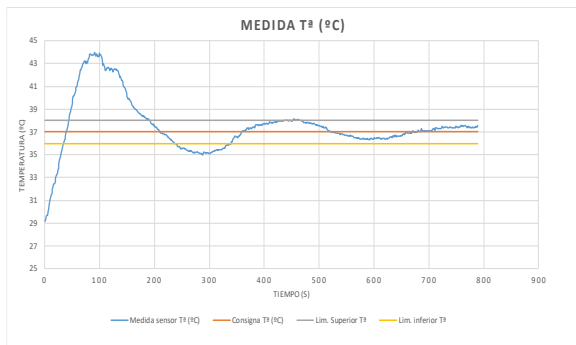


Figura 7: Evolución de la temperatura.

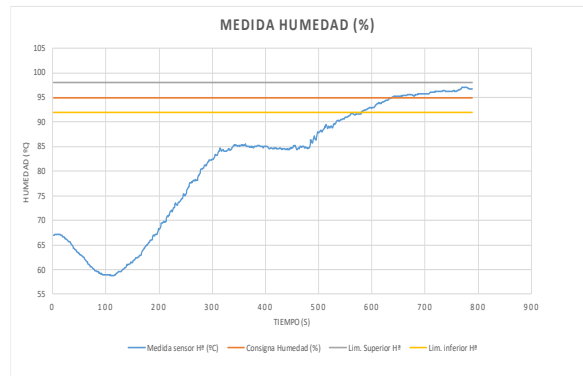


Figura 8: Evolución de la humedad.

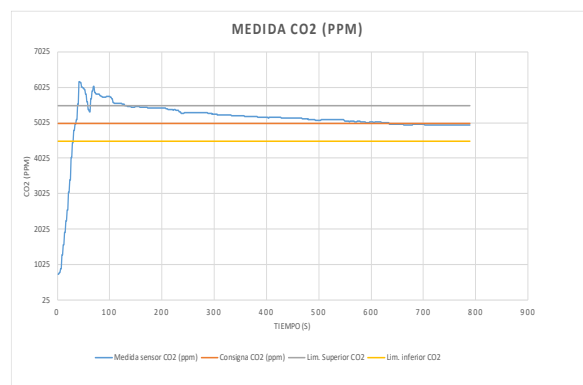


Figura 9: Evolución del CO₂.

Tabla 2: Tiempo de estabilización.

Valores	Tiempo (s)
Temperatura	478
Humedad	590
CO ₂	180



Figura 10: Recipiente estanco utilizado para las pruebas.

Los resultados obtenidos en las mediciones registran la evolución de la temperatura del sensor DS18B20 y el termómetro de calibración. El registro comienza en el momento en el que se asigna el valor de 37°C como consigna hasta que se produce la correcta estabilización de la temperatura en función de las medidas del sensor.

La Figura 8 muestra la evolución de la temperatura a lo largo del tiempo registrada por el sensor (línea azul) y por el termómetro de calibración (línea naranja) en el punto 1.



Figura 11: Evolución de la temperatura en el punto 1.

De la gráfica mostrada en la Figura 8 se puede destacar que la velocidad de registro de temperatura por parte del sensor DS18B20 es más rápida que la del termómetro de calibración. En primer lugar, se observa que existe una primera zona de partida donde se asigna manualmente una temperatura de consigna al sistema de 37 °C y se registra como los valores de temperatura empiezan a crecer. El sensor consigue sobrepasar la temperatura de consigna mientras que, al mismo tiempo, el termómetro registra valores lejanos a las temperaturas del sensor. Más tarde, el sensor registra una zona de máxima temperatura cercana a los 41 °C donde inmediatamente el sistema corrige la temperatura. Finalmente, se aprecia una zona de estabilización de las temperaturas registradas por ambos dispositivos, que va desde el segundo 600 hasta el final. Se aprecia claramente que los valores finales de temperatura registrados por los dispositivos son distintos, mientras el sensor registra valores en torno a los 37 °C, el termómetro registra valores en torno a los 34 °C, dándose una diferencia de 3 °C. Esto puede ser debido a dos cosas: 1) que el sensor no esté correctamente calibrado y registra valores de temperatura que no son reales, y 2) que la temperatura no es homogénea en todo el habitáculo.

Las figuras 9 y 10 muestran, los valores de temperatura en los puntos 2 y 5 respectivamente. Se aprecia que la evolución de la temperatura en dichos puntos es similar a la gráfica de la Figura 8.

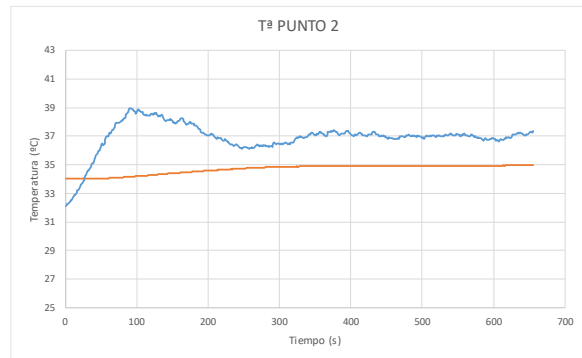


Figura 12: Evolución de la temperatura en el punto 2.

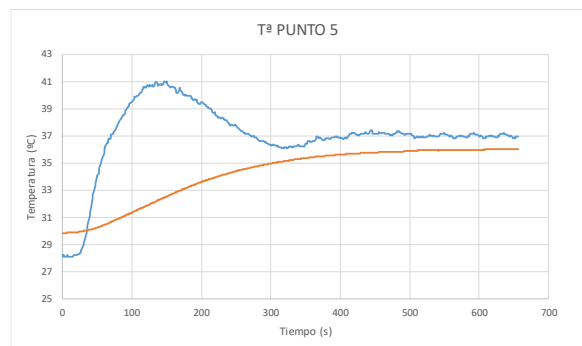


Figura 13: Evolución de la temperatura en el punto 5.

La Tabla 2 muestra todos los valores finales de temperatura que se han obtenido en los 6 puntos donde se ha posicionado el termómetro de calibración.

Tabla 3: Registros de temperatura.

Puntos	Coordenadas (x,y,z) cm	T ^a (°C) termómetro	Diferencia con valores de consigna (°C)
1	15,20,0	34,26	2,74
2	30,20,0	34,97	2,03
3	45,20,0	33,37	3,63
4	15,20,40	38,12	1,12
5	30,20,40	36,05	0,95
6	45,20,40	34,06	2,94

De la Tabla 2 se puede decir que existe una diferencia de temperatura media de los valores registrados de 2,23 °C con respecto al valor de consigna de 37 °C. Se puede apreciar que los valores de temperatura en las zonas más altas de la cámara (puntos 4 y 5) están más próximos al valor de consigna fijado por el sistema de 37 °C.

Además de los resultados obtenidos de las temperaturas, se obtuvieron los valores basales de los

otros sistemas de control. Los valores medios con sus respectivas tolerancias son:

Control de temperatura: $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Humedad relativa: $95\% \pm 3\%$
CO₂: $5\% \pm 0,5\%$

4 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha conseguido desarrollar un habitáculo con un control preciso de las condiciones de temperatura, humedad y CO₂. Es importante destacar que los estudios realizados se han centrado en el sistema de generación y control de temperatura. Se ha comprobado que el sistema desarrollado no consigue una temperatura homogénea en todo el habitáculo y que la inclusión de humedad al sistema afecta a la estabilización de la temperatura.

En futuros trabajos se actuará sobre la homogeneización de la temperatura mediante la inclusión de más sensores y un estudio de regulación más exhaustivo. De la misma forma, se realizarán los mismos estudios para las demás variables que entran en juego: humedad y CO₂. Por último, se incluirán variables que no se han tenido en cuenta en el presente trabajo como el control del pH, extracción y recirculación de aire y sistemas de esterilización

Agradecimientos (10 ptos, negrita)

Este trabajo está financiado por la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura mediante el proyecto IB16200 "Optimización y mejora de técnicas de bioimpresión para regeneración de cartílago y prótesis vasculares".

English summary

MANUFACTURE AND EVALUATION OF A CLIMATIC CHAMBER FOR THE DEVELOPMENT OF 3D BIOPRINTING TECHNIQUES

Abstract

The objective of this work is the optimization of bioprinting techniques in the field of cartilage tissue regeneration and the generation of vascular grafts. In this work, the design, manufacture and evaluation of a climatic chamber for a 3D bioprinter has been carried out. The control of temperature, humidity and CO₂ generate a controlled, sterile and watertight

atmosphere, for the perfect development of the process of bioprinting and maturation of bioprinted cellular tissues.

Keywords: bioengineering, bioprinting, cartilage, prosthesis, biocamera.

Referencias

- [1] Allied Market Research. World Regenerative Medicines Market - Opportunities and Forecasts, 2013 – 2020. Disponible en <http://www.alliedmarketresearch.com/regenerative-medicines-market>. Consultado 19 de julio de 2016.
- [2] Colasante C, Sanford Z, Garfein E, Tepper O. Current Trends in 3D Printing, Bioprosthesis, and Tissue Engineering in Plastic and Reconstructive Surgery. *Current Surgery Reports*, 2016. 4(2)1-14.
- [3] DababnehAB, Ozbolat IT. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 2014. 136(6):061016-061016.
- [4] Franciskovich PP, Cregger TA, Vodkin P. Combined sterilization indicator incubator and reader system, 2013, Patente: US 9.303.283B2.
- [5] LewisPL, Shah RN. 3D Printing for Liver Tissue Engineering: Current Approaches and Future Challenges. *Current Transplantation Reports*, 2016. 3(1):100-108.
- [6] Matesanz R, Domínguez-Gil B, Coll E, de la Rosa G, Marazuela Spanish experience as a leading country: what kind of measures were taken? *R. Transpl Int*. 2011 Apr;24(4):333-43. doi: 10.1111/j.1432-2277.2010.01204.x. Epub 2011 Jan 6.
- [7] Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug;32(8):773-85. doi: 10.1038/nbt.2958. PubMed PMID: 25093879.
- [8] Organización Nacional de Trasplantes. Actividad de donación y trasplante en España 2015. Disponible en: http://www.ont.es/Documents/Balance_Actividad_ad_2015.pdf. Consultado 18 de julio de 2016.
- [9] Organización Nacional de Trasplantes. Newsletter Transplant. International figures on donation and transplantation 2014. Disponible en: <http://www.ont.es/publicaciones/Documents/NE>

WSLETTER_2015_CE.pdf. Consultado 18 de julio de 2016.

- [10] Pati F, Gantelius J, Svahn HA. 3D Bioprinting of Tissue Organ/Models. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(15):4650-65.
- [11] Phelan K, May KM. Mammalian Cell Tissue Culture Techniques. *Curr Protoc Pharmacol.* 2016 Jun 1;73:12.1.1-12.1.23. doi: 10.1002/cpph.1.
- [12] Rutala WA, Weber DJ. Disinfection and sterilization in health care facilities: what clinicians need to know. *Clin Infect Dis.* 2004;39(5):702-9. Epub 2004 Aug 12.
- [13] Skardal A. Chapter 1 - Bioprinting Essentials of Cell and Protein Viability. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*, J.J. Yoo, Editor 2015, Academic Press: Boston. p. 1-17.

[14] Tabriz AG, Hermida MA, Leslie NR, Shu W. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication.* 2015 Dec 21;7(4):045012. doi: 10.1088/1758-5090/7/4/045012.

[15] World Health Organization, Laboratory biosafety manual. Third Edition 2006, Geneva.



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution CC-BY-NC 3.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>).