

Desarrollo de un Sistema de Cultivo Tisular Híbrido y Multicomponente Usando Polímeros de Soporte Impresos 3D

C. A. Romero Zepeda^{1*}, E. Solorio González¹, M. A. Yépiz Rodríguez¹,
Alejandro García¹ e Isaac Chairez¹

¹Estudiante, Institución de Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Guadalajara, México.

*isaac.chairez@tec.mx

Abstract— The development of different types of *Organ on a Chip* has attract the attention of pharmaceutical industry to develop alternative methods for ensuring the efficiency of drugs before approval. A dual bioprinting-culturing system was developed to construct the needed elements needed for creating three dimensional tissues including the corresponding instrumented device that may keep the environment conditions that may reinforce the cells' growth. The proposed 3D printing platform considering the principles of an *Organ on a Chip* for the creation of a hybrid system of scaffolds for tissue engineering using polylactic acid. The usage of the 3D printing method allows the modification and creation of a flexible platform with different structures to a low cost, including the possibility of introducing the structural elements to create multi component tissues. The developed system was tested using a traditional fibroblasts culture.

Palabras clave— Bio-impresión, impresión en 3D, micro-fluídica, órgano en chip, PLA

I. INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica, la producción de medicamentos validados tiende a tomar años de prueba para la aprobación de las autoridades sanitarias de los diferentes países como la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios en México o la Food and Drugs Administration (FDA) en Estados Unidos entre muchos otros, antes de ser llamado a revisión por toxicidad no anticipada para los pacientes [1]. Dadas estas circunstancias, han existido las intenciones de desarrollar un sistema multi-tejido que permita mimetizar la función fisiológica de los órganos humanos y su reacción ante los medicamentos y/o tratamientos. El principal problema reside en la forma en la que los órganos y tejidos tienen una respuesta integrada y dinámicamente en el ambiente al que son sometidos, dado que son actividades que afectan uno al otro [2].

Para la realización de dispositivos que puedan ser utilizados en la evaluación de nuevos productos farmacéuticos, se requiere utilizar cultivos multicomponentes que puedan tener interacción a través de los fluidos que buscarían reproducir el ambiente tradicional que ocurre dentro del organismo. En este sentido, se requieren estructuras que puedan trabajar con los fundamentos de la técnica conocida como microfluidica, donde se pueden generar los principios de intercambio de

nutrientes y subproductos entre los diferentes tipos de tejidos.

Es importante considerar que tradicionalmente estos prototipos de un sistema multi-tejido involucran cultivos celulares en segunda dimensión (2D). Los cultivos de tejidos 2D tienen una variedad de diferencias con respecto al microambiente del tejido nativo: topografía del sustrato, rigidez del sustrato y, lo más relevante de todo, una arquitectura tridimensional (3D) [3]. El cultivo 2D ejerce una presión selectiva sobre las células, lo que bloquearía la capacidad de las células para funcionar de forma natural; altera sus propiedades fenotípicas originales y naturales. Por esta razón se considera el uso de estructuras que puedan generar el soporte para la creación de tejidos tridimensionales que puedan ser utilizados como plataformas válidas de evaluación de interacción de tejidos a través de la estructura de microfluidos. Este tipo de estructuras se pueden desarrollar a partir de las nuevas tecnologías de manufactura aditiva basadas en los métodos de impresión tridimensional utilizando polímeros que puedan a la vez se biocompatibles pero que, al mismo tiempo, puedan dar lugar a dispositivos sanitizables e incluso esterilizables.

La intención de este trabajo de investigación es abordar la problemática presentada mediante el desarrollo de un modelo ingenieril que permita el cultivo celular de órganos al integrarlos en una plataforma de perfusión circulatoria cerrada; de esta manera se puede facilitar la respuesta entre órganos y la interacción dependiente. Esta plataforma tendrá en consideración los principios y conceptos de un sistema "organ-on-a-chip"; integrando micro-ingeniería, tecnología de microfluidica, principios de bio-mimetización, microarquitectura, interacción espacio-temporal célula a célula y, a su vez, el microambiente extracelular [4-5]. Por las razones anteriores, se muestra el desarrollo de un esquema integral de producción por métodos de manufactura aditiva de dispositivos para el cultivo de tejidos, basado en un método de integración multicomponentes [6-8].

Las principales contribuciones de este trabajo se pueden listar como sigue: a) el desarrollo de una plataforma integral de cultivo de tejidos multicomponente, b) el desarrollo de un sistema de microfluidica que permite realizar la integración de los diferentes componentes tisulares soportados en las diferentes secciones de cultivo y c) un sistema digital que

regula la interacción a través de los fluidos de los componentes de cultivo.

II. METODOLOGÍA

A. Diseño de cada componente de cultivo

Con la ayuda de SolidWorks® se inició el proceso de diseño de un soporte que permitiera el cultivo celular (modelo CAD, *computed assisted design*). Dicho soporte fue diseñado tomando en consideración las especificaciones de cultivo previamente mencionadas en la introducción (soporte, estructura tridimensional bioinspirada, biocompatibilidad y acoplamiento simple al sistema de microfluídica); permitiendo la entrada y distribución homogénea del medio, conectores de entrada para la alimentación del circuito controlado por una micro válvula que permite el intercambio de fluidos de manera unidireccional, un sistema de cierre dado por una estructura que permite el ensamblaje de las piezas como se muestra en la **Figura 1**. En este diseño se incluyeron las estructuras que permiten soportar el cultivo celular de tal forma que se puedan generar un dispositivo que dé lugar no solo a la transferencia de fluidos sino también de gases como el oxígeno y el dióxido de carbono, dependiendo del tipo de tejido que se necesite cultivar.

B. Desarrollo del molde polimérico

La construcción del dispositivo basado en el modelo diseñado se realizó utilizando ácido poliláctico (PLA) de color translucido con la impresora 3D Creality Ender 3 Pro. Como parámetros de impresión se manejó una densidad de relleno del 50%, una temperatura de 200 °C, se agregó una estructura de soporte y una plataforma de adhesión tipo brim. El extrusor utilizado para la construcción fue de 4mm.

Se realizó una etapa de post-procesamiento para mejorar la calidad de la impresión, de tal forma que se generara una superficie que fuera adecuada para facilitar el cultivo celular. En este procedimiento se limaron las piezas para permitir un ensamblaje adecuado, además se agregó una resina translúcida en el área de cultivo celular y el canal para el medio, esto con la finalidad de evitar filtraciones, así como de crear un medio de soporte para el cultivo.

Para una explicación más detallada del modelo, en la **Figura 1** se presenta a manera de bloques de colores los componentes que integran el dispositivo polimérico. En el diseño se puede representar de color verde una estructura tipo *socket* para mejorar el sellado de la pieza, así como en color azul un seguro de sellado con el apoyo de la colocación de imanes. En el caso de los bloques de color rosa se representa el espacio de cultivo, el cual cuenta con pilares soporte para un mejor medio de filtrado para el flujo de entrada y salida. Esta estructura puede ser modificada para facilitar el desarrollo de soportes tridimensionales que den lugar a la forma de tejido esperada. La flecha de color naranja representa el micro-fluido unidireccional definido por el sistema de micro bombas que pueden generar un flujo controlado de 0 a 100 ml por hora. Este sistema de bombas fue regulado utilizando un sistema digital conectado por un

esquema de comunicación serial I2C. El dispositivo de control fue una tarjeta digital de 8 bits.

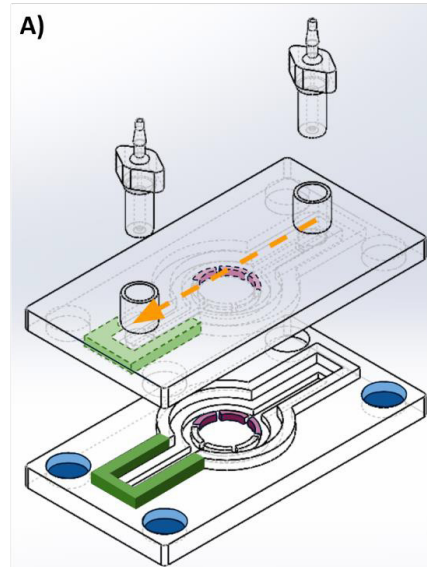


Fig. 1. Molde polimérico. A) Diseño en CAD del molde con diferentes secciones identificadas con diferentes colores. B) Armado del molde impreso en PLA con las entradas para las mangueras de la microfluídica. C) Piezas impresas por separado en PLA. D) Elementos y componentes del sistema de microfluídica.

Para el sistema de micro-fluídica presentado en la **Figura 1**, se utilizó como dispositivo de control digital un microcontrolador Arduino NANO® conectado a un circuito integrado para la regulación del flujo, mangueras de micro-calibre y un set de 6 micro bombas, lo que permite la regulación entre siete dispositivos de cultivo desarrollados. Dicho sistema permite el control adecuado de la frecuencia de flujo, a base de un continuo goteo del fluido; dicho control es modulado a partir de un programa diseñado para fines de mantener el suministro de los fluidos de forma controlada. Con estas especificaciones de la microfluídica desarrollada, el dispositivo es capaz de regular la cantidad de nutrientes en el sistema para que se puedan soportar las necesidades fisiológicas del tejido y/u órgano. El goteo, junto con las condiciones arquitectónicas diseñadas en el molde, permiten de manera uniforme que el cultivo reciba la alimentación necesaria de nutrientes u otros componentes que sean necesarios para dicho tipo de célula.

C. Evaluación del molde

Para la evaluación del sistema desarrollado, se desarrollaron grupos de dos moldes, los cuales fueron esterilizados de diferente manera. El prototipo 1 fue desinfectado usando alcohol y luz UV, mientras que el prototipo 2 solo usando luz UV; esto con la finalidad de prevenir la disolución del esmalte resínico colocado. Ambos modelos se trataron con fibronectina para promover la adhesión celular, colocando 200 uL en cada uno, y se realizó un cultivo de aproximadamente 10,000 células de fibroblastos en cada uno y se dejó el molde con las entradas cerradas en la incubadora a 37°C. La contabilización celular se realizó utilizando el método de conteo de células muertas por tinción.

D. Sistema de dispensado

Se realizó un sistema de micro-fluídica regulado por micro válvulas y una tarjeta digital de 8 bits, al cual se le cargo un código que permite controlar el flujo unidireccional por goteo de entrada adecuado para el dispensado de los nutrientes que son requeridos para cada tipo de cultivo celular, esto con la finalidad de brindar un ambiente mejor para la proliferación celular. La integración de los elementos previamente descritos da como resultado un circuito hidráulico como el que se muestra en la **Figura 2**, que tiene la finalidad de que el chip funcione de manera autónoma.

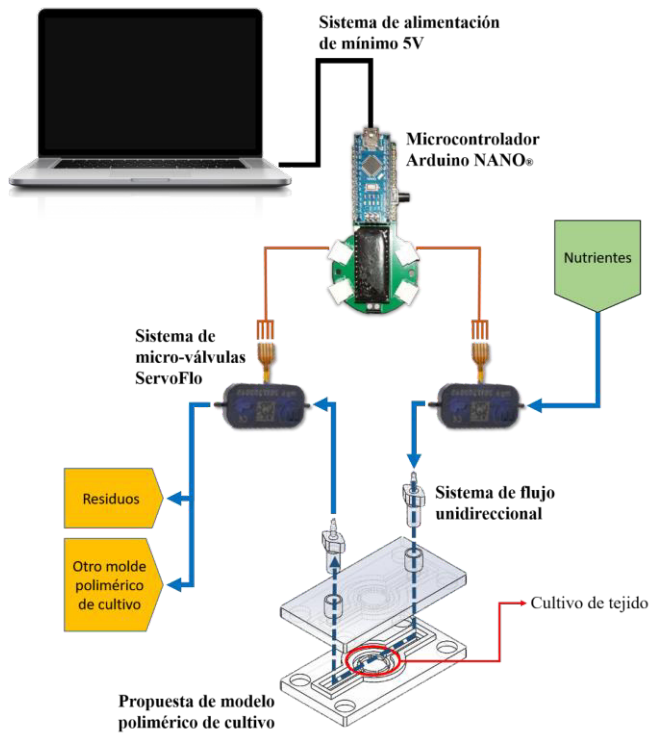


Fig. 2. Diseño del circuito final para la aportación de nutrientes, así como el deshecho de residuos, y que además permita la interconexión de múltiples chips.

El sistema propuesto puede ser alimentado por una fuente de mínimo de 5V, lo que genera una versatilidad en su aplicación técnica en un ambiente de laboratorio estándar. El sistema de microfluídica muestra en recuadros amarillos en la **Figura 2**, como dicho sistema puede ser considerado para un solo molde polimérico de cultivo donde la salida del flujo iría directamente a un contenedor de residuos o, como se muestra en el segundo recuadro del mismo color, conectado a otro molde de un cultivo distinto asemejando la relación en cascada que los tejidos y/u órganos tienen en el cuerpo. De esta manera aseguramos que la integridad del sistema mimetice las reacciones que el cuerpo pueda tener de manera indirecta de una estructura sobre la otra. Considerando la versatilidad del dispositivo, se desarrolló una interfaz gráfica de usuario simplificada que permite fijar los flujos regulados por cada una de las microbombas, considerando las estimaciones de volumen en cada uno de ellos contenedores. Se debe considerar que esta característica permite asegurar la integración del sistema sin

riesgo para cada uno de los tipos de tejidos diferenciados en el arreglo sugerido.

III. RESULTADOS

Para evaluar el funcionamiento como un sistema microfluídico efectivo, se realizó una simulación numérica previa para evaluar el funcionamiento en términos del flujo generado y las variaciones de presiones obtenidas en el dispositivo. Esta evaluación se realizó considerando el uso de fluidics de SlodiWorks, considerando los rangos de flujo que las microbombas utilizadas pueden proveer al arreglo de sistemas de cultivo basados en manufactura aditiva. Los resultados demostraron que para un fluido de la densidad del medio de cultivo sugerido, se mantiene un flujo constante a lo largo del arreglo de soportes de cultivo (**Figura 3**).

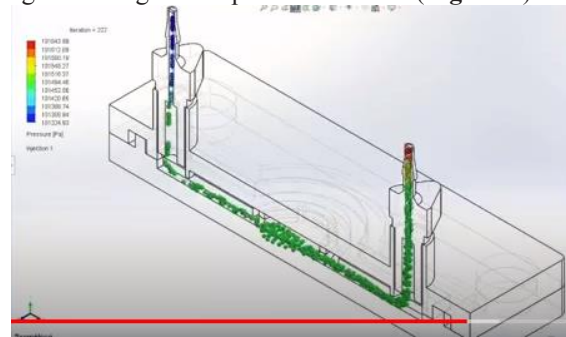


Fig. 3. Evaluación numérica de flujo en el dispositivo de soporte de cultivo.

El dispositivo desarrollado fue evaluado desarrollando el cultivo de un tejido específico con requerimientos nutricionales definidos (**Figura 4**). Pevio al proceso de cultivo celular, se colocó fibronectina durante 24 horas. Del prototipo 1 no se pudo extraer nada de fibronectina, mientras que del prototipo 2 fueron aproximadamente 50 uL. El retiro del cultivo se realizó 3 días después, en este se abrió el molde y utilizando el método de tinción por azul de tripano de células muertas. Durante este proceso se observó que el cultivo salió de la zona designada para el mismo en el molde y paso a los canales para medio, finalmente se contabilizó alrededor de 7 mil células. Al momento de colocar la muestra en el microscopio se visualizaron hifas.

IV. DISCUSIÓN

El diseño del sistema de soporte celular, su posterior impresión y su post-procesamiento permitieron trabajar adecuadamente con el sistema de microfluídica, cuya estructura central fue realizada en PLA semitransparente. Esto evita que el usuario pueda apreciar de manera fácil el crecimiento celular del cultivo; es decir, no es factible apreciar las células y su ambiente en un microscopio para su posterior cuantificación celular por medio del método de conteo. Esta es una de las áreas consideradas como de oportunidad en el desarrollo del dispositivo construido.

Se logró la evaluación funcional del dispositivo considerando que se desarrolló un cultivo estable de células con un conteo final considerado suficiente en términos del porcentaje de supervivencia del mismo. En cuanto a los resultados obtenidos en el cultivo celular, la falta de

fibronectina en uno de los prototipos pudo deberse a la filtración de la misma en el dispositivo o a su evaporación en la incubadora; así mismo se obtuvo una adhesión limitada de las células al molde; esto puede deberse al proceso implementado para el post-procesamiento de las piezas impresas (el quiebre estructural molecular dado por el esmalte de uñas) o a un cambio en el pH producto de una contaminación dentro de la incubadora.

Para resolver estos problemas se propone como solución, aplicar una mejor calidad de impresión asegurando que el componente es impreso de una manera más compacta a la propuesta. De igual manera, se considera la posibilidad de agregar un espacio para la colocación de un hidrogel sobre el cual hacer el cultivo; asegurando un mayor nivel de adhesión en las células.

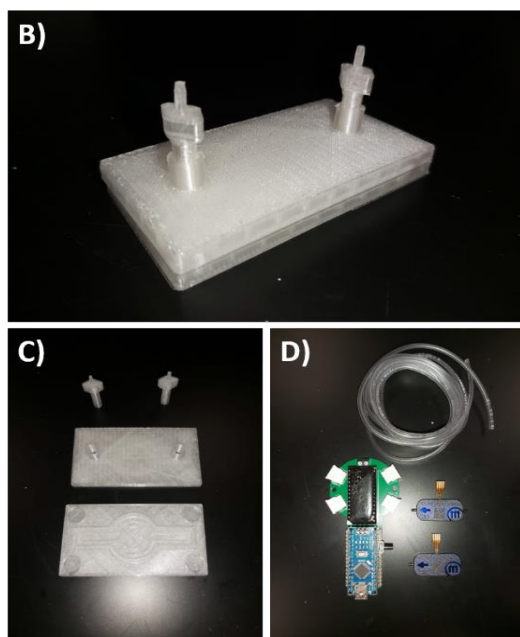


Fig. 4. Fotografía de los elementos incluidos en el dispositivo de cultivo celular basado en el sistema de microfluidica incluyendo el soporte, los puntos de conexión para las bombas, así como el sistema digital asociado.

V. CONCLUSIONES

Con este método de solución, se tiene como intención el poder proporcionar un método de manufactura de moldes poliméricos que permitan reducir el tiempo de prueba de medicamentos y otras soluciones ante los procesos de validación de la FDA y otras organizaciones. Dado que es un método de desarrollo de corto plazo, permite que cada molde sea ajustable en diseño con base a las necesidades que se presenten en el tejido deseado, proporcionando las condiciones y características estructurales que lo requieran, así como de modificaciones recomendadas por el usuario.

Es un proceso más rápido, dado que el molde polimérico es manufacturado de manera más sencilla y rápida; al ser una impresión 3D por PLA, el tiempo de impresión se reduce a horas dado las dimensiones del molde a imprimir.

En general, la propuesta de solución permite que el usuario pueda realizar sugerencias, comentarios y modificaciones en el molde de manera abierta para un mejor

desarrollo del cultivo. Dado que es un material comercial y de bajo costo, relativamente, su disponibilidad y manipulación se amplía al mercado; lo cual asegura una posible producción en masa al tener el sistema completo con las condiciones adecuadas.

REFERENCIAS

- [1] Baudoin, R., Corlu, A., Griscom, L., Legallais, C., & Leclerc, E. (2007). Trends in the development of microfluidic cell biochips for in vitro hepatotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 21(4), 535-544.
- [2] Webster, A., Greenman, J., & Haswell, S. J. (2011). Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(1), 10-17. Zheng, F., Fanfan, F., Cheng, Y. and Zhao, Y. "Organ-on-a-Chip Systems: Microengineering to Biomimic Living Systems". Research Gate. (2016).
- [3] Skardal, A., Murphy, S.V., Devarasetty, M. et al. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Sci Rep* 7, 8837 (2017).
- [4] Farina, M., Chua, C. Y. X., Ballerini, A., Thekkedath, U., Alexander, J. F., Rhudy, J. R., Torchio, G., Fraga, D., Pathak, R. R., Villanueva, M., Shin, C. S., Niles, J. A., Sesana, R., Demarchi, D., Sikora, A. G., Acharya, G. S., Gaber, A. O., Nichols, J. E., & Grattoni, A. (2018). "Transcutaneously refillable, 3D-printed biopolymeric encapsulation system for the transplantation of endocrine cells". *Biomaterials*, 177, 125-138.
- [5] Juan Eduardo Sosa-Hernández, Angel M. Villalba-Rodríguez, Kenya D. Romero-Castillo, Mauricio A. Aguilar-Aguila-Isaías, Isaac E. García-Reyes, Arturo Hernández-Antonio, Ishtiaq Ahmed, Ashutosh Sharma, Roberto Parra-Saldívar y Hafiz M. N. Iqbal. (2018). "Organs-on-a-Chip Module: A Review from the Development and Applications Perspective". NCBI.
- [6] Wen, Y., & Yang, S. T. (2008). The future of microfluidic assays in drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(10), 1237-1253.
- [7] Yeo, L. Y., Chang, H. C., Chan, P. P., & Friend, J. R. (2011). Microfluidic devices for bioapplications. *small*, 7(1), 12-48.
- [8] Chen, H., Yu, Z., Bai, S., Lu, H., Xu, D., Chen, C., ... & Zhu, Y. (2019). Microfluidic models of physiological or pathological flow shear stress for cell biology, disease modeling and drug development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117, 186-199.