Importancia del CO_2 en el desarrollo de cultivos celulares y características de una instalación de suministro a conjunto de incubadoras del CEPROTEA del Hospital de Clínicas (Agosto 2019)

María del Pilar García, Cristina Touriño, Lourdes Echarte, Juan Francisco Juli, Marcos Trinidad

***Resumen*— En la presente monografía se analiza la importancia del tampón CO_2/bicarbonato para mantener el pH fisiológico en los cultivos celulares, se describe el sistema de control interno de la concentración de dióxido de carbono en incubadoras de CO_2 y se presenta una solución de alimentación ininterrumpida de CO_2 a un conjunto de incubadoras del Centro de Producción de Terapias Avanzadas (CEPROTEA) del Hospital de Clínicas. La red a instalar consiste de un varal con dos bancos ("en uso" y "de reserva") compuestos de tres balones de CO_2 cada uno. La fuente de gas se alternará entre los bancos una vez consumidos mediante un *manifold* semiautomático. Este dispositivo permite realizar el cambio de banco por diferencia de presiones. Cuando la presión del banco en uso cae por debajo de la presión de *seteo* del banco de reserva ocurre el cambio de ramal. El reemplazo de los balones debe realizarse de forma manual, indicando cuál es el banco que pasó a quedar en uso. Mediante un presóstato de alta presión que mide la presión de alta dentro del *manifold* se enviará una señal a un panel ubicado en la central de control, que disparará las alarmas visual y sonora, avisando de próxima conmutación del varal.**

***Palabras clave*—tampón, incubadoras de CO_2, *manifold* semiautomático, medicina regenerativa, pH, terapia celular**

I. Introducción

El concepto de medicina regenerativa surge a finales del siglo XX como una nueva disciplina médica, impulsada fundamentalmente por los nuevos conocimientos sobre las células madres o troncales y su capacidad de diferenciación permitiendo la regeneración de tejidos; aunque el término célula madre se remonta a la segunda mitad del siglo XIX, a la luz de la teoría de la evolución y luego su paso por embriología y hematología (Apablaza, 2017).

Ésta disciplina requiere de la integración de principios de la ingeniería y ciencias de la vida para la obtención de sustitutos biológicos que permitan restaurar y mantener la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano. Se relaciona con la Ingeniería de Tejidos que abarca la generación y reconstrucción de tejidos u órganos, empleando matrices biodegradables producidas in vitro y colocadas en el tejido dañado, para promover la proliferación celular y lograr la regeneración tisular. El descubrimiento de las células madre y los avances en las técnicas de cultivos celulares han permitido desarrollar nuevas formas de terapia celular que desde fines del siglo XX se están estudiando para el tratamiento de diversas enfermedades (ATCYMR, 2019).

En lo que respecta a Uruguay, en 1978 se creó el Banco Nacional de Órganos y Tejidos (BNOT) como un proyecto conjunto del Poder Ejecutivo y la Universidad de la República. En el 2005, por el decreto 248/005, adquiere la nueva denominación de Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Células, Tejidos y Órganos. Su función es autorizar los programas con fines terapéuticos y científicos y las actividades que utilizan células, tejidos y órganos de origen humano, provenientes de donaciones, incluyendo medicina regenerativa a toda la población, de conformidad a los principios legales y éticos y a los conocimientos científicos vigentes (INDT, 2019). En el año 2006, el Consejo de Ministros de Estado aprobó el decreto 160/2006 que establece normas de control, calidad y seguridad para el trasplante de las células y tejidos humanos (IMPO, 2006). Asimismo, para desarrollar esta área el INDT propone la creación del Laboratorio de Ingeniería Tisular y

Enviado para su revisión el 5 de agosto de 2019. Este trabajo fue apoyado en parte por el Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Hospital de Clínicas.

María del Pilar García Mendy, estudiante del Seminario de Ingeniería Biomédica de la Facultad de Ingeniería UdelaR, colaborador en definición de especificaciones de proyecto de instalación de CO_2 para la Unidad de Tecnología y Terapia Celular del Hospital de Clínicas (e-mail: pgarciamendy@gmail.com).

Dra. Cristina Touriño, MD, PhD, co-tutora de la presente monografía, Coordinadora del Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Hospital de Clínicas, UdelaR (e-mail: cltourino@gmail.com).

MSc. Lourdes Echarte, co-tutora de la presente monografía, asistente del Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Hospital de Clínicas, UdelaR (e-mail: lecharte@gmail.com).

Juan Francisco Juli, colaborador en definición de especificaciones de proyecto de instalación de CO_2 para la Unidad de Tecnología y Terapia Celular del Hospital de Clínicas (e-mail: juanfco.juli@gmail.com).

Marcos Trinidad, colaborador en definición de especificaciones de proyecto de instalación de CO_2 para la Unidad de Tecnología y Terapia Celular del Hospital de Clínicas (e-mail: m.alfredotrinidad@gmail.com).

Celular (LITYC-MSP) con financiación del Ministerio de Salud Pública. Por otro lado, en el año 2007 se elaboró un proyecto institucional por parte del Hospital de Clínicas: "Creación y Desarrollo del Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa en el Hospital de Clínicas", el cual fue presentado a la Comisión Directiva del Hospital, a la Comisión de Investigación Científica de la Facultad de Medicina y al Consejo de Facultad, los cuales brindaron el apoyo al mismo y lo declararon de interés institucional (ATCYMR, 2019). Este proyecto universitario fue seleccionado para su financiación por la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República (UR) en el marco del "Programa para el Fomento de la Investigación de Calidad en la UR".

El proyecto propone la instalación de una Unidad de Tecnología y Terapia Celular (UTTC-HC) para la producción de células de uso clínico. Con la finalidad de aunar esfuerzos y trabajar en sinergia para optimizar el uso de equipamiento y la formación de recursos humanos se establece un convenio con el INDT para conformar el Centro de Producción de Terapias Avanzadas (CEPROTEA), cuyas instalaciones se han construido en el piso 5 del Hospital de Clínicas. Dichas instalaciones contarán con una serie de salas blancas, una de ellas provista de un conjunto de incubadoras de CO_2 donde los cultivos celulares serán almacenados bajo una atmósfera controlada, manteniendo ciertos parámetros constantes, que simulan condiciones naturales, permitiendo así su sustentabilidad y desarrollo. Uno de los parámetros a controlar es el porcentaje de dióxido de carbono (% v/v) en la atmósfera de las incubadoras, determinante en la estabilidad del pH de los cultivos celulares.

.

En este documento se describirán las características de la red de dióxido de carbono a instalar para abastecer de forma ininterrumpida al conjunto de incubadoras del laboratorio de la UTTC en construcción en el Hospital de Clínicas.

II. CONTROL DE PH EN INCUBADORAS DE CO_2

La mayoría de las líneas celulares crecen adecuadamente a pH 7,4. Aunque el pH óptimo para la proliferación celular varía relativamente poco entre diferentes cepas celulares, algunas líneas normales de fibroblastos se desarrollan mejor en rangos de pH de 7,4 - 7,7, mientras que las células modificadas pueden hacerlo mejor a pH entre 7,0 y 7,4. (Freshney, 2010)

El pH del medio está íntimamente relacionado con la concentración de CO_2. Esto se debe a que el CO_2 juega un papel fundamental en el sistema tampón natural CO_2 /HCO_3^-. Este sistema permite mantener el pH del medio dentro del intervalo fisiológico mediante la siguiente serie de reacciones en equilibrio:

$$CO_2 + H_2O \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \quad (1)$$

Dado que el metabolismo celular tiende a acidificar el medio, el aumento de la concentración de hidrogeniones desplaza el equilibrio de la ecuación (1) hacia la izquierda, causando el consumo de bicarbonato disponible. Si la concentración de bicarbonato no es suficiente para contrarrestar el efecto del aumento de la concentración de hidrogeniones, el pH del medio disminuirá por debajo del requerido para el crecimiento o mantenimiento celular causando su muerte. Por el contrario, si se trata de un sistema abierto y hay suficiente bicarbonato, el medio se tornará alcalino, dado que el CO_2 formado se perderá a la atmósfera y el metabolismo celular no será suficiente para contrarrestar la concentración de bicarbonato.

Es por esto que, para mantener el pH en el rango adecuado para el crecimiento celular, los cultivos celulares deben disponer de concentraciones de CO_2 disuelto y bicarbonato determinadas que permitan al sistema tampón poder amortiguar los cambios. El HCO_3^-, en general, es proporcionado por el medio de cultivo como $NaHCO_3$ y el suministro de CO_2 varía según el tipo de células y recipiente de cultivo. Los cultivos en recipientes abiertos necesitan ser incubados en una atmósfera de CO_2, cuya concentración está en equilibrio con el $NaHCO_3$ del medio (ver Figura 1). Las células en concentraciones moderadamente altas ($\geq 1 \times 10^5$ células / ml) y cultivadas en matraces sellados no necesitan de la adición de CO_2 a la fase gaseosa, siempre que la concentración de bicarbonato se mantenga baja (~4 mM), particularmente si las células son altamente productoras de ácidos. Sin embargo, a bajas concentraciones celulares (por ejemplo, durante la clonación) y con algunos cultivos primarios, es necesario agregar CO_2 a la fase gaseosa de los matraces sellados. Cuando se requiere ventilación, para permitir el equilibrio del CO_2 o su escape en los cultivos de células altamente productoras de ácidos, es necesario dejar la tapa floja o usar una tapa permeable al CO_2 (Freshney, 2010).

Compound	Eagle's MEM Hanks's salts	Low HCO_3^- + buffer	Eagle's MEM Earle's salts	DMEM
$NaHCO_3$	4 mM	10 mM	26 mM	44 mM
CO_2	Atmospheric and evolved from culture	2%	5%	10%
HEPES[a] (if required)	10 mM	20 mM	50 mM	—

[a]If HEPES is used, the equivalent molarity of NaCl must be omitted and osmolality must be checked.

Figura 1. Relaciones entre $NaHCO_3$ y CO_2 para diferentes medios de cultivo (Freshney, 2010).

Se puede incorporar un tampón en el medio de cultivo para estabilizar el pH, pero en el caso de cultivos en platos abiertos algunas líneas celulares, particularmente a bajas concentraciones, aún pueden requerir una atmósfera de CO_2 para prevenir la pérdida total de CO_2 disuelto y HCO_3^- del medio. A pesar de su pobre capacidad amortiguadora a pH fisiológico (pK=6,2), el tampón CO_2 /HCO_3^- es empleado con mayor frecuencia que cualquier otro debido a su baja toxicidad, bajo costo y beneficio nutricional para el cultivo (Freshney, 2010).

Aunque los cultivos se pueden incubar en matraces sellados en una incubadora seca regular o habitación caliente, algunos recipientes, como placas de Petri o placas de pozos múltiples, requieren una atmósfera controlada con alta humedad y concentración elevada de CO_2 (Freshney, 2010).

Las incubadoras de CO_2 son los equipos recomendados para el desarrollo de cultivos de células eucariotas ya que, a diferencia de las incubadoras de uso común, controlan la humedad y concentración de CO_2 creando una atmósfera natural para el crecimiento celular. Estos equipos están compuestos principalmente por una cámara de acero inoxidable, bandejas también de acero inoxidable dónde se colocan los recipientes con cultivos celulares, y aperturas para la entrada de aire, CO_2 y para la toma de muestras. Cuentan con un panel de control que permite la selección de las distintas funciones, entre las que se encuentran los ajustes de temperatura de incubación, de

concentración de CO_2, de humedad relativa, tiempos de arranque, incubación y parada, así como los respectivos valores de *seteo* de alarmas visual y sonora. Para el control de la humedad relativa las grandes incubadoras de CO_2 emplean generadores de vapor o atomizadores, pero la mayoría de las incubadoras de pequeña y mediana escala utilizan bandejas de humidificación para generar humedad mediante evaporación, y algunos modelos utilizan sistemas de humidificación activos como es el caso de las incubadoras del Hospital de Clínicas (Cepero, Rosales, & Vicens, 2011).

La concentración de CO_2 dentro de la cámara se mantiene mediante un sistema de control que ajusta según concentración de *seteo*. Cuando se abre la puerta, se libera CO_2 al ambiente exterior y un sensor detecta las variaciones en el nivel de éste dentro de la incubadora. Automáticamente se inyecta CO_2 puro para compensar la pérdida hasta alcanzar el valor de *seteo*. El sistema de control generalmente corresponde a un algoritmo PID, controlando éste por ancho de pulso la posición del elemento final de control, es decir, cuanto mayor sea la diferencia entre el valor de *seteo* y el valor real, más tiempo durará la inyección del gas, a medida que se va aproximando al punto de ajuste, más se irá acortando el tiempo de inyección. Generalmente, solamente con la inyección no se logra el punto de ajuste dado que el volumen de CO_2 suministrado puede variar (por ejemplo, por cambios en la presión de suministro). Para compensar este efecto, si la concentración de CO_2 dentro de la incubadora excede el valor de *seteo*, existe un compresor de aire que suministra un pequeño volumen para compensar el exceso de CO_2. Cada cierto tiempo también se suministra una pequeña cantidad de aire por este compresor para eliminar el exceso de CO_2 causado por la generación de este gas en el metabolismo celular, por la variación de la resistencia al flujo de la línea de suministro, así como por la obstrucción de los filtros HEPA. En cuanto al método de control existen sistemas de conductividad térmica (que tienen en cuenta la menor conductividad térmica del CO_2 frente a la del aire atmosférico) y sensores infrarrojos, estos últimos empleados por las incubadoras de la UTTC del Hospital de Clínicas (Cepero et al., 2011).

El sensor infrarrojo es más preciso que el sensor de conductividad térmica, dado que la medición se ve menos afectada frente a variaciones de temperatura y humedad. Este sistema detecta los niveles de CO_2 con un sensor óptico; al pasar una muestra de aire de la cámara entre un emisor infrarrojo y el sensor, éste detecta la variación en el infrarrojo causada por la absorción por parte del CO_2 contenido en la muestra de aire. La cantidad absorbida se relaciona con la concentración de CO_2 presente en la muestra de aire (Cepero et al., 2011).

III. CARACTERÍSTICAS DE LA INSTALACIÓN DE CO_2

La red de dióxido de carbono a instalar para abastecer de forma ininterrumpida al conjunto de incubadoras del laboratorio de la UTTC en el Hospital de Clínicas presenta ciertos requerimientos. El CO_2 debe proveerse de forma continua a ocho incubadoras situadas en paralelo cuya capacidad es de 232 L cada una, de modo de mantener en su interior una atmósfera con una concentración de CO_2 de 5%. La presión de entrada a las incubadoras no debe superar los 15 psig para evitar daños en los filtros, según fabricante. El sistema y todos los materiales involucrados deben garantizar una pureza del CO_2 en el interior de las incubadoras ≥99,5% según Farmacopea Europea (Air Liquide, 2016).

Para que el sistema sea capaz de proveer CO_2 ininterrumpidamente, la fuente de CO_2 deberá distribuirse en dos bancos de balones de CO_2, de modo que cuando se acaba el banco en uso pueda cambiar al de reserva sin detener el suministro. Para determinar el tamaño de los bancos se realizó un cálculo estimado del consumo diario de CO_2. Para la estimación del consumo de CO_2 de las incubadoras, se tomó como referencia la información proporcionada por manual de incubadora Panasonic modelo MCO-80IC-PE (Panasonic, 2018). Para el cálculo se consideraron las peores condiciones (dos aperturas de puerta diarias de 60 segundos cada una), es decir, un consumo de CO_2 de 752 L/día. Como la incubadora del manual es de 851 L y las del laboratorio son 8 de 232 L cada una, se aplica un factor de corrección y, considerando que la densidad de CO_2 a 1 atm y 25°C es de 1,52 kg/m^3, se obtiene lo siguiente:

$$\text{Consumo de } CO_2 = 752\frac{L}{dia} * \frac{8 * 232\ L}{851\ L} * \frac{1{,}52\frac{kg}{m^3} * 1m^3}{1000\ L} = 2{,}5\ kg/día$$

Este consumo fue validado con información proporcionada por el Centro de Tecnología Celular de la Pontificia Universidad Católica de Paraná, Curitiba (Brasil).

Considerando este consumo es necesario instalar un varal con dos ramales (uno será el banco "En uso" y el otro "De reserva"), alimentados por 3 balones de aprox. 20 kg cada uno. Cada ramal consistirá de un tubo de cobre con 3 conectores flexibles ("pigtails"), cada uno conectado a un balón de CO_2. Esta disposición permite que, funcionando a máxima capacidad (8 incubadoras simultáneamente), cada banco tenga una durabilidad de 24 días.

Dado que no se dispone de personal para realizar el cambio de banco de forma manual, será necesario instalar un *manifold* semiautomático que cambie de modo automático el suministro de CO_2 desde el banco en uso al de reserva. El *manifold* semiautomático es un arreglo de válvulas y reguladores de presión que permite realizar el cambio de banco por diferencia de presiones. Cuando la presión del banco en uso cae por debajo de la presión de *seteo* del banco de reserva ocurre el cambio de ramal.

El *manifold* deberá entregar una presión de suministro que en la entrada a las incubadoras sea ≤15 psig, contemplando que la cantidad de incubadoras en uso puede variar desde 1 a 8 funcionando simultáneamente. Por seguridad el *manifold* deberá contar con válvulas reguladoras de presión que reduzcan la presión de alta inmediatamente a la salida de cada ramal y válvulas de retención que impidan retroflujo a cada ramal.

Mediante un presóstato de alta presión que mida la presión de alta dentro del *manifold* se enviará una señal a un panel ubicado en la central de control (ubicada en el piso 4 del Hospital), que disparará las alarmas visual y sonora próximo a la conmutación del varal. También deberán dispararse las alarmas visual y sonora avisando de baja presión en el sistema. El *manifold* deberá contar con un panel que indique la presión de cada ramal y la presión de descarga, así como el ramal que está en uso para poder realizar un control diario de la instalación.

La descarga del *manifold* estará conectada a un tubo de cobre de ¾" que en el piso inferior del edificio reduce su diámetro a 1/2" (ambos ya instalados). Este tubo, dentro de la sala de las incubadoras, presenta cuatro conexiones, cada una destinada a un par de incubadoras. Cada conexión es de 3/8" y deberá contar con un manómetro que permita controlar presión de entrada ≤15 psig. A cada conexión, incorporar una unión T y llaves de paso para habilitar/deshabilitar entrada del gas a cada una de las incubadoras. Los materiales y equipos ubicados dentro de la sala de las incubadoras deben cumplir con los requerimientos de la normativa ISO 14644 o GMP para Salas Blancas.

En caso de que el *manifold* no pueda asegurar una presión de suministro que en la entrada a las incubadoras sea ≤15 psig, independientemente de la cantidad de incubadoras en funcionamiento, deberá colocarse un regulador de presión de una etapa en cada una de las cuatro conexiones ubicadas en la sala de las incubadoras. Estos reguladores también deben cumplir con los requerimientos de normativa para Salas Blancas.

La conexión a cada incubadora debe ser mediante manguera de grado alimentario y esterilizable, para que cumplan con los requisitos de limpieza y desinfección de una sala blanca.

En la Figura 2 un esquema de la instalación.

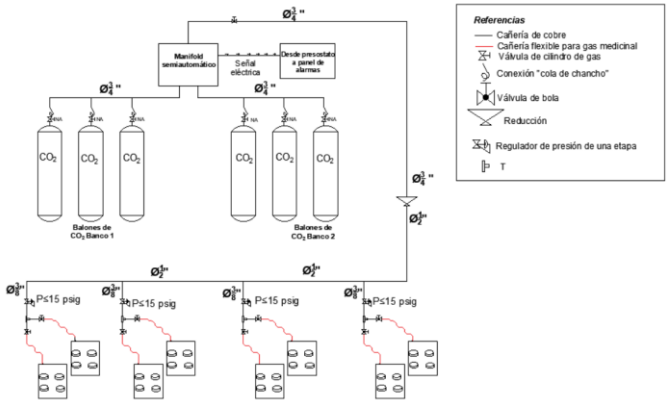

Figura 2. Esquema de la instalación de CO_2 de la UTTC del Hospital de Clínicas.

IV. Conclusión

La proliferación celular in vitro necesita de un entorno que se aproxime en la mayor medida posible al fisiológico in vivo. Para lograrlo es necesario controlar un importante conjunto de variables del ambiente. El sistema de alimentación ininterrumpida de CO_2 descrito constituye una solución para el control de una de estas variables del ambiente, el pH. La capacidad de mantener las variables como ésta dentro del rango adecuado de forma confiable y segura validan la elaboración de productos celulares de medicina regenerativa para su aplicación clínica terapéutica, en el marco de ensayos clínicos o de indicaciones terapéuticas validadas.

REFERENCIAS

Air Liquide. (2016). *CO_2 Medicinal*. 2.

Apablaza, F. (2017). Antecedentes Históricos Y Conceptos Básicos En El Estudio De Las Células Madre : Células Troncales , O La Madre De Todas Las Células. *Actualizaciones Clínica Meds*, *1*, 6–16. Retrieved from https://www.meds.cl/wp-content/uploads/6.-Art-1.-Apablaza.pdf

ATCYMR, H. de C. "Dr. M. Q. (2019). Área Terapia Celular y Medicina Regenerativa HOSPITAL DE CLÍNICAS "Dr. Manuel Quintela" - FACULTAD DE MEDICINA - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. Retrieved from https://www.areatcmr.hc.edu.uy/index.php/es/que-es-tc-y-mr

Cepero, M. A. A., Rosales, Y. P., & Vicens, Y. H. (2011). Análisis de tecnologías más utilizadas en incubadoras de CO2. *IFMBE Proceedings*, *33*, *1*, 429–432. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21198-0_110

Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells* (Sixth). Glasgow: John Wiley & Sons, Inc.

IMPO. (2006). *Decreto N° 160/006 Marco regulatorio referente al transplante de células y tejidos humanos*. *1*, 1068. Retrieved from https://www.impo.com.uy/bases/decretos/160-2006

INDT. (2019). Instituto nacional de donación y transplante de células, tejidos y órganos. Retrieved from http://www.indt.gub.uy/?S=mvo

Panasonic. (2018). *MCO-80IC REACH-IN INCUBATOR* (p. 4). p. 4. Retrieved from https://www.phchd.com/eu/biomedical/incubation/CO2incubators/mco-80ic

María del Pilar García nacida en Montevideo, Uruguay en 1992. Obtuvo el título de grado en Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería UdelaR, en Montevideo, Uruguay, en 2018.Desde agosto de 2018 hasta febrero de 2019 fue Técnico de Calidad en Coca-Cola FEMSA Uruguay. Desde febrero de 2019 se desempeña como Coordinadora de Calidad en Coca-Cola FEMSA Uruguay.

Cristina Touriño Doctora en Medicina y Especialista en Hematología-Facultad de Medicina-UdelaR (Uruguay). Doctorado en Ciencias y Diplôme de Thérapie Cellulaire - Université Paris VII Denis Diderot (Francia). Profesora Agregada del Departamento Básico de Medicina y Coordinadora del Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Hospital de Clínicas (ATCMR-HC) de la Facultad de Medicina de la UdelaR

Lourdes Echarte nacida en Montevideo, Uruguay en 1980. Licenciada en Ciencias Biológicas en la UdelaR y Magister en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM). Desde el 2012 trabaja como Asistente del Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina, UdelaR.

Juan Francisco Juli nacido en Montevideo, Uruguay en 1992. Recibió el título de grado en Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería UdelaR, en Montevideo, Uruguay, en 2018.
De 2017 al 2018 trabajó en el Instituto de Ingeniería Química en la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Desde 2018 trabaja en el Grupo Marfrig en Tacuarembó, Uruguay.