

Trabajo Fin de Máster

MODELOS MICROFLUÍDICOS PARA EL ESTUDIO DE LA METÁSTASIS EN CÁNCER

MICROFLUIDIC MODELS TO STUDY CANCER METASTASIS

Autor/es

Laura Morato Concejero

Director/es

Dra. Estela Solanas Villacampa y Dr. Ignacio Ochoa Garrido

Facultad de Ciencias / Universidad de Zaragoza

Máster en Biología Molecular y Celular

2020-2021

ÍNDICE

Resumen/Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1 Justificación y pertinencia del trabajo	5
1.2 Marco teórico	8
1.2.1. Modelos animales	9
1.2.2. Modelos tumorales <i>in vitro</i>	10
1.2.2.1. Modelos tumorales en 2D	10
1.2.2.2. Modelos tumorales en 3D	10
1.2.2.3. Modelos en 3D basados en plataformas microfluídicas.....	11
1.2.3. Modelos <i>in silico</i>	13
2. Objetivos.....	13
3. Metodología.....	14
3.1. Diseño del estudio	14
3.2. Bases de datos consultadas y estrategias de búsqueda	15
4. Desarrollo	19
4.1. Eventos de la cascada metastásica	19
4.2. Modelos de migración e invasión local.....	21
4.2.1. Modelos de migración e invasión tumoral bajo estímulos bioquímicos.....	22
4.2.2. Estudios de la interacción de las células tumorales con la ECM	25
4.2.3. Simulación del flujo intersticial y efecto de la tensión cortante (<i>shear stress</i>)...	28
4.3. Migración transendotelial	30
4.3.1. Modelos de intravasación y extravasación	31
4.3.2. Modelado del sistema linfático	39
4.4. Participación del sistema inmunitario en modelos de metástasis tumoral	40
4.5. Modelos de metástasis órgano-específica	43
4.6. Aplicación de la tecnología microfluídica en el aislamiento de las CTCs.....	49
5. Retos actuales y perspectivas futuras.....	51
5.1. Aplicación de los modelos MoC en medicina personalizada	51
5.2. Oportunidades de mercado: limitaciones y direcciones futuras.....	51
6. Conclusiones/Conclusions	53
7. Bibliografía.....	56
Anexo I.....	62
Anexo II.....	65

Resumen

En el proceso de **metástasis**, las células tumorales son capaces de separarse del tumor primario, invadir el tejido circundante y acceder a través de la circulación a otros órganos del cuerpo. Esto incrementa enormemente la **morbilidad y mortalidad** de los pacientes con cáncer, por lo que el conocimiento de los **mecanismos** que participan en dicho proceso y determinan su evolución es fundamental a la hora de prevenir la metástasis y diseñar terapias más efectivas. Sin embargo, los modelos *in vitro* e *in vivo* usados tradicionalmente presentan importantes limitaciones, como un escaso poder de predicción en relación con la efectividad de los tratamientos en fase preclínica e incapacidad para estudiar el papel que el **microentorno tumoral** juega en el comportamiento de las células cancerosas. De esta forma, los esfuerzos se centran actualmente en el desarrollo de una nueva generación de modelos tumorales haciendo uso de nuevas tecnologías como la **microfluídica**. Los sistemas **organ-on-chip** constituyen una herramienta prometedora para el estudio del cáncer, tanto en **investigación** básica como en investigación traslacional y en **clínica**. Se trata de dispositivos a escala micrométrica que son capaces de modelar los eventos que ocurren en la cascada metastásica de una forma **dinámica**; imposible de simular en modelos tridimensionales estáticos. Así, en el presente proyecto se destaca la aplicación de esta tecnología en la investigación oncológica, mediante la realización de una **revisión** de la literatura desde la que abordar el **estado del arte** de los modelos desarrollados para el estudio de la metástasis en cáncer.

Palabras clave: cáncer, microfluídica, metástasis, modelos 3D, *organ-on-chip*, microentorno tumoral.

ABSTRACT

During **metastasis**, tumor cells can separate from the primary tumor, invade the surrounding tissue and access other organs through the circulation, increasing **morbidity** and **mortality** of patients with cancer. Therefore, knowing the **mechanisms** that participate in **metastatic cascade** is essential to prevent metastasis and develop effective therapies. Nevertheless, the *in vitro* and *in vivo* models traditionally used in cancer research have important limitations, such as low predictive power for drug efficacy studies and the inability to determine the role of **tumor microenvironment** in cell behaviour and metastatic potential. For this reason, efforts are currently focused on the development of a new generation of tumor models, using new technologies such as **microfluidics**. **Organ-on-chip** systems are a promising tool for the study of cancer, both in **basic research** and in translational and **clinical research**. These systems are micrometric scale devices that can model the **dynamics** of metastatic events, which are impossible to simulate in three-dimensional static models. Thus, this project highlights the application of this technology in cancer research by conducting a **state-of -the- art review** of models developed for the study of metastasis in cancer.

Key words: cancer, microfluidics, metastasis, 3D models, organ-on-chip, tumor microenvironment.

1. Introducción

1.1 Justificación y pertinencia del trabajo.

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de **morbi-mortalidad** a nivel global, pese a todos los esfuerzos puestos en investigación para comprender mejor sus mecanismos y desarrollar nuevas terapias. De acuerdo con los datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2018 se habrían producido 9,6 millones de muertes relacionadas con tumores a nivel global¹.

Las proyecciones realizadas con los datos de los que se dispone a nivel de los registros de cáncer establecen que el número de casos crecerá de forma destacada en las próximas dos décadas, alcanzando una incidencia estimada en la población mundial de **30,2 millones** de casos al año en 2040². En la Figura 1 se muestran las estimaciones de **incidencia y mortalidad** a nivel mundial realizadas para el año 2020 (datos extraídos del **Global Cancer Observatory** (GCO) elaborado por la **International Agency for Research on Cancer** (IARC) perteneciente a la OMS). En ambos diagramas de sectores, los datos se presentan distribuidos en función del tipo de tumor, siendo los más frecuentemente diagnosticados **mama** (11,7 %), **pulmón** (11,4 %) y **colorrectal** (10%) y los más letales **pulmón** (18%), **colorrectal** (9,4 %) e **hígado** (8,3).

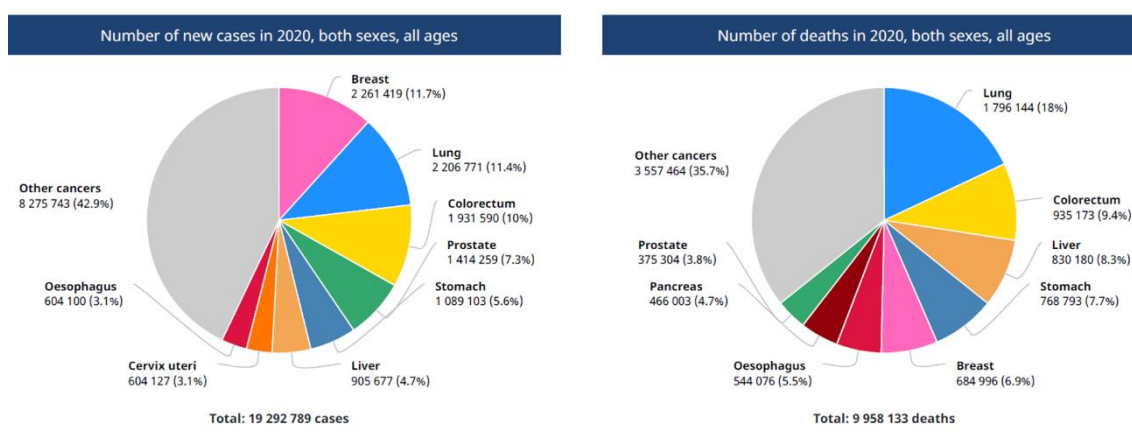


Figura 1. Estimaciones de la incidencia y mortalidad del cáncer a nivel global para el año 2020. Se engloban ambos sexos y todas las edades, siguiendo una distribución en función del tipo de tumor. Fuente: GLOBOCAN 2020, disponible en <https://gco.iarc.fr/>.

En **España**, el cáncer es igualmente uno de los grupos de enfermedad de mayor relevancia e impacto en salud pública. El número total de casos incidentes estimados para 2021 es de 276.239, siendo los tumores de colon y recto los más frecuentes a nivel

del conjunto de la población, seguidos de próstata, mama y pulmón^{2,3}. En España la supervivencia de los pacientes con cáncer es similar a la que muestran los países de nuestro entorno, y parece haberse duplicado en los últimos 40 años^{1,2}. Sin embargo, sigue siendo una de las principales causas de muerte, por lo que uno de los **grandes retos** actuales en la lucha contra el cáncer es potenciar la **investigación oncológica**.

Cuando se habla de cáncer, es importante tener en cuenta que dicho término engloba a un grupo **heterogéneo** de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal y descontrolado de las células de un tejido. Todas estas enfermedades tienen en común el desarrollo de **neoplasias malignas**, con la capacidad de invadir tejidos cercanos. Cuando las células cancerosas se diseminan a través de los sistemas sanguíneo y linfático pueden formar **nuevos focos neoplásicos** en otros órganos dando lugar a la **metástasis**. De esta forma, hablar de tumor maligno o neoplasia maligna es sinónimo de hablar de cáncer.

En el proceso de **carcinogénesis**, no sólo son importantes las células tumorales, sino que el **microentorno tumoral** (TME, *tumor microenvironment*)^{4,5} juega un papel fundamental en la evolución de la enfermedad. Este microentorno se compone de **células no estromales**, como adipocitos, células endoteliales, células del sistema inmunitario y células nerviosas, así como de todos aquellos componentes que constituyen el **compartimento estromal**: matriz extracelular, fibroblastos asociados a tumor (CAFs, *cancer-associated fibroblasts*) y células mesenquimales. La interacción y comunicación entre las células tumorales y el entorno que las rodea condiciona el inicio de la enfermedad, su progresión y el pronóstico del paciente⁵.

Cuando las células tumorales se desprenden de la masa tumoral adquiriendo capacidad de **migración e invasión**, pueden entrar en la circulación y diseminarse en forma de células tumorales circulantes (CTCs, *circulated tumor cells*). Solo una pequeña fracción de esas células, entre un 0.001-0.02% ⁴, logran extravasarse e infiltrar y colonizar órganos distantes, en la medida en que se verán expuestas, entre otros factores, a la acción de las células del sistema inmunitario. Si se forman **tumores secundarios**, la morbilidad y mortalidad de los pacientes aumenta considerablemente. Así, la **metástasis** es la principal responsable de la muerte en pacientes con cáncer, pues dificulta el tratamiento de la enfermedad y expone al paciente a sucesivas recaídas⁴⁻⁶,

ya que en el momento del diagnóstico del tumor primario las células han podido metastatizar otros órganos⁶.

Dado que el proceso de metástasis complica gravemente el tratamiento de los pacientes, es necesario ahondar en el conocimiento de los mecanismos, no sólo a nivel genético y bioquímico, sino también biofísico, que participan en la **cascada metastásica** y conducen a la progresión del proceso tumoral. Para ello, es necesario el desarrollo de modelos que sean capaces de reproducir la capacidad migratoria y el comportamiento que las células muestran *in vivo*, simulando a su vez el microentorno fisiológico en el que se encuentran y con la posibilidad de monitorizar y cuantificar los cambios producidos.

Hasta la fecha, se han desarrollado una gran variedad de modelos experimentales para el estudio de la metástasis, generalmente **modelos *in vitro*** en 2D o 3D, así como **modelos animales**. Sin embargo, dichos modelos presentan múltiples limitaciones que les otorgan de un escaso poder predictivo y dificultan la transferencia de los resultados de la investigación a humanos⁴⁻⁷. En este contexto, el desarrollo de la **microfluídica** ha permitido la obtención de dispositivos con los que poder estudiar el proceso de metástasis de una forma dinámica, considerando los eventos de la cascada metastásica que incluyen invasión celular, intravasación y extravasación, colonización, además del proceso de angiogénesis tumoral y el estudio de las CTCs, de gran importancia para el pronóstico. Frente a los modelos convencionales, dichos sistemas ofrecen la capacidad de medir cuantitativamente parámetros celulares relevantes y reproducir el microambiente del tumor mediante el control de temperatura, gradientes, flujo... dentro del dispositivo⁷.

De esta forma, el presente trabajo se centra en elaborar una revisión sobre los modelos microfluídicos que se están desarrollando para el estudio de la metástasis en cáncer, contemplando las características más relevantes de dichos sistemas y los aspectos que abordan.

Dada la complejidad de los mecanismos que participan en la cascada metastásica y la heterogeneidad en las formas de estudiar *in vitro* un mismo evento de este proceso, las revisiones realizadas en base a la literatura actualmente publicada pueden ofrecer una visión global de las direcciones más prometedoras, sin perder de vista las

limitaciones a las que se enfrenta actualmente esta tecnología y que dificultan su traslación a la clínica.

No cabe duda de que el desarrollo de la tecnología **organ-on-chip** está permitiendo la obtención de modelos tumorales más sofisticados, capaces de recapitular tanto las propiedades biomoleculares como estructurales del **nicho tumoral**, así como los eventos dinámicos observados en la diseminación del cáncer⁵. Esto permite estudiar eventos que hasta ahora no se habían podido definir debido a las carencias de los modelos tradicionalmente empleados en investigación. Los **modelos de metástasis en chip (MoC, metastasis-on-chip)** ofrecen la posibilidad de mejorar el conocimiento sobre los tratamientos que se emplean actualmente, así como encontrar nuevas dianas terapéuticas y evolucionar hacia una **medicina** mucho más **personalizada**, siendo de gran interés para la industria farmacéutica y la **práctica clínica**^{4,5}.

1.2. Marco teórico

En términos generales, un **modelo ideal** de tumor sería aquel que proporcionase una **visión dinámica** de la forma en la que dicho tumor evoluciona⁸. En los últimos años, se han descrito una gran cantidad de modelos, ya sean *in vitro*, *in vivo* o *in silico*, para el estudio de la metástasis. Estos han sido de gran importancia para estudiar la diseminación tumoral, el cribado de fármacos anticancerosos o la prueba de nuevas estrategias terapéuticas⁵.

A la hora de desarrollar un modelo, es importante definir una serie de variables, entre las que se distinguen⁹:

- La **fente celular**: células obtenidas de paciente, líneas celulares establecidas, células del estroma, células inmunitarias, etc.
- Las **propiedades biofísicas** consideradas en el modelo: presión parcial de oxígeno, pH, parámetros de flujo, etc.
- Características de la **matriz extracelular**: rigidez, arquitectura y composición.
- **Señales bioquímicas**: factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, etc.

La **complejidad** del modelo dependerá de qué fenómenos se deseen estudiar y las pruebas que se pretendan realizar. Es decir, estas características han de ser

establecidas acorde a los **objetivos** buscados. A continuación se describen las características más relevantes de los modelos utilizados en investigación oncológica, así como sus principales **aplicaciones, ventajas y limitaciones**.

1.2.1 Modelos animales

Los modelos animales ofrecen un mayor nivel de **complejidad**, en la medida en que se trata de un sistema vivo donde existe una comunicación e interacción entre los diferentes órganos y tejidos, muy difícil de reproducir en un modelo *in vitro*.

En investigación oncológica y ensayos preclínicos, el modelo más empleado es el de **xenoinjerto**, basado en la inyección de células tumorales por vía subcutánea o en los órganos de origen del tumor (**modelo ortotópico**) en ratones **inmunodeprimidos**^{5,8}, de forma que no hay un sistema inmunitario que monte una respuesta efectiva frente a las mismas.

Sin embargo, se trata de un modelo **caro**, de **difícil mantenimiento** y manipulación. Por otro lado, pese a la proximidad que presentan a nivel fisiológico y genético con los humanos, el uso del modelo de xenoinjerto para el estudio de la metástasis del cáncer puede no representar la respuesta que se da en los pacientes, en la medida en que carecen de un sistema inmune activo, el cual influye en el desarrollo, evolución y respuesta terapéutica del tumor. Las diferencias existentes entre el modelo animal de xenoinjerto y el TME humano provocan que la efectividad de los medicamentos contra el cáncer probados en los ensayos preclínicos sea insatisfactoria cuando se trasladan a pacientes⁸. Esta limitación se ha abordado recientemente mediante el desarrollo de modelos de ratón **“humanizados”**, obtenidos mediante modificación genética, mediante la inyección de células inmunitarias extraídas de sangre periférica humana o mediante la implantación de tejido estromal humano junto con el tejido tumoral¹⁰.

Pese a ser uno de los modelos más empleados en investigación biomédica, no permite hacer estudios a gran escala, debido al coste asociado a su mantenimiento, la necesidad de disponer de personal especializado y los **problemas éticos** que plantea la experimentación animal. El **principio de las 3Rs** (reducción, reemplazo y refinamiento) que rige la utilización de animales en investigación, es uno de los principales impulsores en la búsqueda de nuevos modelos que los sustituyan.

1.2.2. Modelos tumorales *in vitro*

1.2.2.1. Modelos tumorales en 2D

Estos modelos han sido tradicionalmente empleados debido a su **fácil disponibilidad, manejo y bajo costo**. En ellos, las células son cultivadas en **monocapa**, creciendo adheridas a un sustrato de plástico. Así, han permitido extraer información relevante acerca de los mecanismos de adhesión y migración de las células tumorales, mediante el establecimiento de gradientes que condicionan la direccionalidad de las células y las interacciones que establecen con la matriz (fenómenos de quimiotaxis, haptotaxis y durotaxis)⁵.

Sin embargo, este tipo de modelos no pueden reproducir la arquitectura tridimensional que caracteriza a los tejidos o estudiar el comportamiento de células que crecen en suspensión^{4,5}. Generalmente carecen de las interacciones **célula-matriz** y **célula-célula**, y se basan en el cultivo de una única población celular, lo que se opone a la heterogeneidad que caracteriza a los tumores. Por otro lado, la estructura y el comportamiento que muestran las células crecidas en monocapa son diferentes a las observadas en el tejido, lo que influye en la transducción de señales, funciones celulares como proliferación o diferenciación, así como en la respuesta a estímulos externos y en la resistencia a fármacos⁸. Estas limitaciones reducen considerablemente la confianza de los resultados obtenidos en los ensayos preclínicos^{5,8,9}.

1.2.2.2. Modelos tumorales en 3D

En estos modelos es posible reproducir la **arquitectura y propiedades mecánicas** de los tejidos, imitando las **características fenotípicas** presentadas por el tumor y las interacciones entre células y de estas con el estroma. Frente a los modelos en 2D, las células muestran una polaridad y expresión génica próximas a las observadas *in vivo*⁵.

Se han desarrollado una importante variedad de sistemas tridimensionales para el estudio de los eventos que ocurren en el proceso de metástasis, y que difieren en composición, métodos de fabricación y complejidad. Los modelos basados en la siembra de células en placas **transwell** han sido ampliamente utilizados para el estudio de migración, invasión y migración transendotelial. En ellos, las células se cultivan en la superficie de una membrana porosa, la cual puede estar cubierta de matriz extracelular e incluso de una monocapa de células endoteliales en los estudios de migración

transendotelial. Las células tumorales son capaces de pasar de uno a otro lado de la membrana impulsadas por el establecimiento de un gradiente quimioatractivo¹¹.

Otro de los modelos comúnmente empleados son los **esferoides**: agregados celulares crecidos en suspensión o embebidos en matriz extracelular generando estructuras tridimensionales. En ellos es posible reproducir las regiones centrales de tumores mal vascularizados, donde se genera un gradiente de nutrientes y oxígeno que produce un **core necrótico**, dividiéndose la estructura en capas en las que las células muestran diferente capacidad proliferativa. Estos modelos 3D se han utilizado con frecuencia en *screening* de fármacos, estudios de crecimiento y proliferación, estudios de invasión, remodelación de la matriz y angiogénesis^{8,9}.

Sin embargo, es necesario destacar que los modelos en *transwell* o los esferoides no consideran los efectos sobre el comportamiento celular de las **fuerzas mecánicas** ejercidas por la presión hidrostática, la tensión cortante producida por el paso de flujo o la deformación celular⁸. Estos inconvenientes pueden ser abordados mediante la introducción de la tecnología microfluídica en combinación con los modelos tridimensionales.

Por otro lado, se han desarrollado varias técnicas que incluyen bioimpresión 3D, generación de andamios celulares mediante el uso de hidrogeles y andamios poliméricos para generar sistemas de cultivo 3D *in vitro*⁸. El uso de tejidos extraídos de biopsias y la generación de organoides también se incluirían dentro de esta categoría.

A la hora de abordar este tipo de modelos es necesario considerar la **falta de reproducibilidad** debido a las dificultades técnicas asociadas a la generación de la arquitectura 3D.

1.2.2.3. Modelos en 3D basados en plataformas microfluídicas

El desarrollo de la tecnología microfluídica ha permitido el diseño de dispositivos a **escala micrométrica** con los que es posible ejercer un control preciso sobre pequeños volúmenes de fluido, mediante el uso de canales cuyas dimensiones abarcan desde decenas a cientos de micras. El comportamiento de estos fluidos a escala micrométrica es diferente al que presentan a escala macrométrica. Por ejemplo, las fuerzas viscosas dominan sobre las inerciales (causantes de turbulencia), de manera que el flujo es **laminar** si el diámetro del microcanal es menor de aproximadamente un milímetro¹¹, lo

que hace posible la generación de **gradientes físicos y químicos** en el dispositivo. Por otro lado, es posible controlar las tensiones de cizallamiento ocasionadas por el fluido regulando los índices de flujo y las dimensiones del canal. Incluso se pueden aplicar modelos computacionales que ayuden a optimizar la geometría de los canales microfluídicos y el suministro de oxígeno y nutrientes¹¹.

Estas características han despertado el interés de campos como el de la ingeniería de tejidos, desarrollo de biomateriales y medicina de precisión, desarrollando los sistemas conocidos como **organ-on-chip**. Se trata de dispositivos de cultivo celular fabricados con las técnicas habitualmente utilizadas en la tecnología de microchips, constituidos por cámaras continuamente perfundidas donde se trata de reproducir *in vitro* las características del entorno tisular¹¹. Estos chips permiten cultivar tipos celulares diferentes creando **interfaces tejido-tejido**, como aquellas establecidas entre el endotelio vascular y los tejidos parenquimatosos y que definen la mayoría de los órganos. También permiten recapitular *in vitro* el complejo microambiente mecánico de los tejidos vivos, mediante cámaras laterales flexibles donde se aplica succión de forma cíclica. Estas y otras funciones se han ido desarrollando progresivamente, desde sistemas más simples hasta adquirir mayores niveles de complejidad, llegando a incorporar **microsensores** que informan sobre el comportamiento celular y las condiciones del microambiente (integridad de la barrera tisular, migración celular, presión del fluido...) ¹¹.

En el contexto de la investigación oncológica, las plataformas microfluídicas permiten recapitular eventos de la cascada metastásica, considerando la complejidad del TME, así como la participación del sistema inmunitario. La presencia de flujo permite el estudio de la influencia de estas fuerzas mecánicas en el comportamiento celular, frente a los modelos tridimensionales estáticos^{8,11}.

Dentro del estudio de la metástasis, estos dispositivos permiten la visualización de los movimientos celulares, su monitorización a tiempo real y la realización de **análisis single-cell** o de célula única que permiten capturar la heterogeneidad tumoral, esencial para el desarrollo de agentes antimetastásicos eficaces⁸.

Dado que estos modelos constituyen el objeto de estudio del proyecto presentado, se describirán con mayor profundidad en el apartado de desarrollo, donde

se aborda la aplicación de plataformas microfluídicas empleadas en el modelado de la metástasis del cáncer.

1.2.3. Modelos *in silico*

Los modelos *in silico* para el estudio de la metástasis en cáncer son capaces de representar de forma matemática factores implicados en la progresión de la enfermedad. Esto es de gran relevancia, dada la gran cantidad de datos experimentales que se producen. Los modelos matemáticos son capaces de **simplificar** la complejidad biológica de estos procesos, permitiendo comprobar hipótesis y plantear nuevos problemas que han de ser abordados desde la parte experimental. Además, pueden contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas, pues es frecuente su uso en el estudio y predicción del efecto de ciertos fármacos frente al cáncer⁵. Sin embargo, es necesario puntualizar que las predicciones de los modelos *in silico* se basan en algoritmos generados para describir fenómenos naturalmente complejos, de manera que la precisión que adquieran estará limitada por el número de parámetros experimentales que se puedan incluir en el modelo⁵.

2. Objetivos

Como se ha expuesto con anterioridad, la tecnología de *organ-on-chip* ha supuesto un gran avance a la hora de simular *in vitro* las condiciones ambientales que se dan en los tejidos y órganos humanos, dando lugar a una herramienta de gran potencial para la investigación. El presente proyecto se centra concretamente en el uso de esta tecnología para el estudio del cáncer. Así, se plantea como **objetivo general** la realización de una **revisión** de la literatura para determinar el **estado del arte** de los modelos microfluídicos desarrollados para el estudio de la metástasis. Como **objetivos parciales**, se especifican:

- Describir los **avances** realizados en plataformas microfluídicas para el estudio de la metástasis en sus diferentes etapas, considerando las características físicas adoptadas en el microentorno tisular simulado.
- Determinar las **limitaciones** que actualmente presenta esta tecnología y los modelos desarrollados en investigación oncológica.

- Plantear las **perspectivas y retos futuros** de los modelos microfluídicos dentro del campo de investigación expuesto.

3. Metodología

3.1. Diseño del estudio

La revisión de la literatura se centró en la búsqueda de estudios que describiesen el desarrollo de modelos microfluídicos para la simulación de los eventos que ocurren en la cascada metastásica. En este caso, para encontrar los descriptores más adecuados, se hizo una primera búsqueda de los términos comúnmente aceptados, que son aquellos que forman parte de un lenguaje controlado, empleado para la indización de los artículos y resto de documentos registrados en bases de datos. Para ello, se hizo uso del **vocabulario estructurado** y multilingüe **DeCS** (Descriptores en Ciencias de la Salud) y el **tesauro** de *MEDLINE* (**MeSH**). En la base de datos *Pubmed*, los términos MeSH empleados fueron: *neoplasm metastasis; microfluidics; lab-on-a-chip devices; tumor microenvironment* y *tissue engineering*. En el resto de las bases de datos consultadas, se llevó a cabo una estrategia de búsqueda similar, haciendo uso del vocabulario estructurado DeCS, donde se incorporan los términos ya descritos con el tesauro de *MEDLINE*, y a partir del cual se emplearon otros términos como: *neoplasm invasiveness; cell migration; circulating tumor cells; neovascularization, pathologic*. Por otro lado, se utilizaron términos del lenguaje natural para recuperar las referencias más recientes que no tienen todavía asignación de descriptores considerados entre los términos de los tesauros: *cancer metastasis; organ-on-a-chip; tissue modeling; extravasation; intravasation; angiogenesis; tumor heterogeneity*. Finalmente, para relacionar los términos de la búsqueda se emplearon los **operadores booleanos**.

- Criterios de inclusión

- Artículos y revisiones enfocados en la descripción de modelos microfluídicos para el estudio de los aspectos centrales de la cascada metastásica, como:
 - Simulación del microentorno tumoral. Estudio de la influencia de las señales bioquímicas y mecánicas.
 - Estudio de la migración y capacidad invasiva de las células tumorales.

- Influencia del endotelio vascular e interacción con las células cancerosas (adhesión, intravasación y extravasación).
- Análisis de las células tumorales circulantes y la heterogeneidad celular a nivel tumoral.
- Documentos publicados en los últimos 5 años.
- Textos escritos en español o inglés.
- Acceso a texto completo.

- Criterios de exclusión

- Publicaciones en las que:
 - No se aborde el estudio de la metástasis de manera que no respondan a los objetivos planteados en este proyecto.
 - Traten el tema de forma secundaria sin formar parte de los objetivos principales.
 - No empleen modelos microfluídicos *organ-on-chip*, centrándose en la aplicación de otras técnicas desarrolladas en ingeniería tisular.
 - No hagan una descripción adecuada o suficiente del modelo desarrollado para el estudio.
- Libros, capítulos de libros, ponencias o artículos de opinión.
- Publicaciones anteriores a 2017.
- Artículos duplicados en los resultados de las búsquedas.
- Sin acceso a texto completo.

3.2. Bases de datos consultadas y estrategias de búsqueda

Las bases de datos consultadas fueron:

- ***Scopus***
- ***Pubmed***
- ***Web of Science (WOS)***

En la Tabla 1, se recogen los **descriptores** empleados, los **filtros** aplicados en las correspondientes búsquedas, así como el número de **resultados** obtenidos. En las bases de datos en las que era posible, como *Scopus* y *WOS*, se refinó la búsqueda mediante la selección de áreas o **categorías**, para enriquecer los resultados en referencias que

englobasen fundamentalmente áreas relacionadas con la **ingeniería**, **biofísica**, **instrumentación** e **ingeniería tisular**. Ya que el objeto de revisión son los modelos *in vitro* de metástasis mediante el uso de dispositivos microfluídicos, adquieren especial interés los aspectos estructurales y de diseño de dichos dispositivos.

Tras lanzar la búsqueda en las diferentes bases de datos, se obtuvieron un total de **148 artículos**. De los 69 artículos extraídos de la base de datos *WOS*, se eliminaron 4 de los que no se encontraron registros en el gestor de referencias bibliográficas Mendeley. De los 65 restantes, obtenidos de las diferentes búsquedas realizadas en esta base, se eliminaron 13 por encontrarse duplicados. Posteriormente, estos resultados se enfrentaron a los obtenidos en *Scopus* y *Pubmed* para obtener el conjunto final de artículos que se sometería a *screening* de título y resumen, eliminándose 38 duplicados y quedando un total de **93 artículos**.

Tabla 1. Resumen de las estrategias de búsqueda por base de datos consultada.

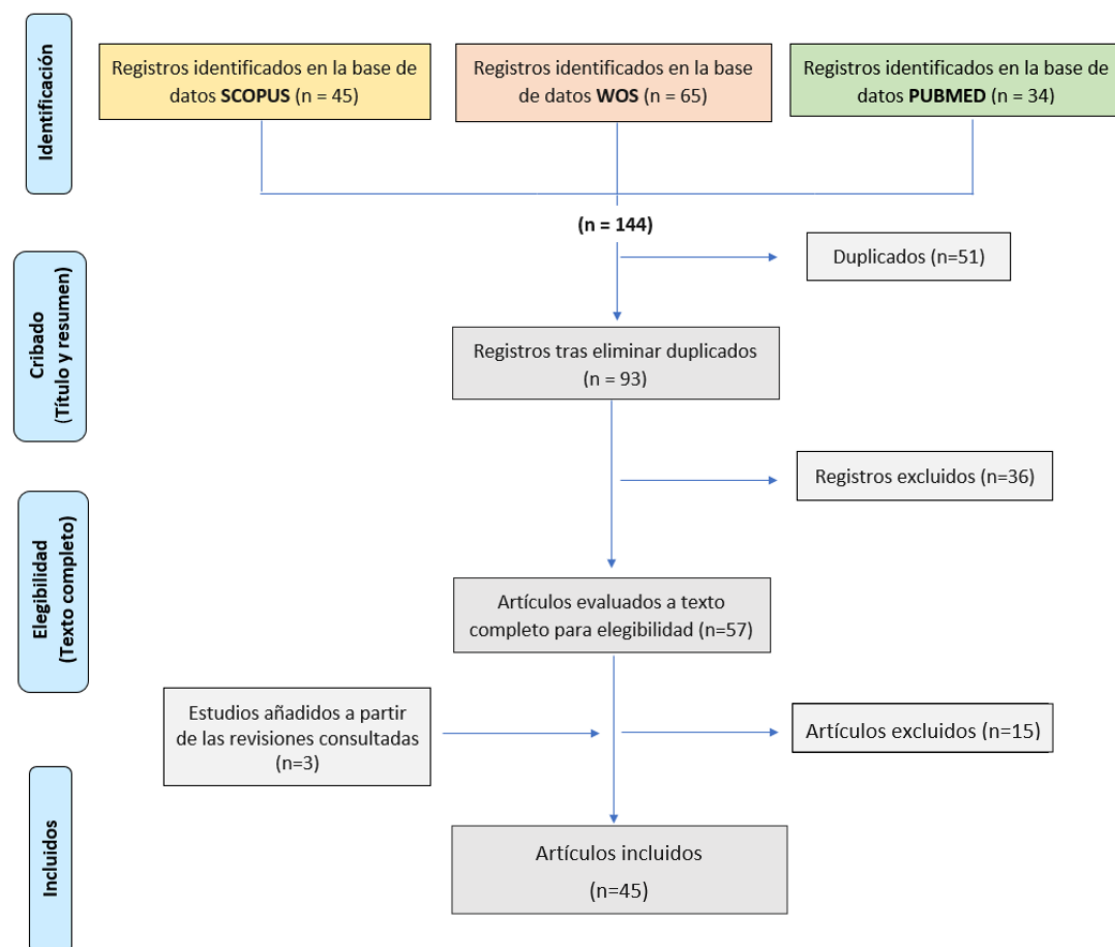
<i>BASE DE DATOS</i>	<i>ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA</i>	<i>FILTROS</i>	<i>RESULTADOS</i>
SCOPUS	("cancer metastasis" OR "neoplasm metastasis") AND ("microfluidic devices" OR "lab-on-a-chip devices" OR "organ-on-a-chip")	Year: 2021-2017 Document Type: Article; Review Language: English; Spanish Source type: Journal Subject area: Engineering; Materials science multidisciplinary; Medicine; Immunology and microbiology	45
	("cancer metastasis") AND (microfluidic OR "organ-on-a-chip") AND ("tumor microenvironment" OR "tissue modeling" OR "tissue engineering")	Year: 2021-2017 Document Type: Article; Review Language: English WOS category: Oncology; Biochemical research methods; Biophysics; Cell tissue engineering; Instruments instrumentation; Engineering biomedical; Materials science biomaterials; Materials science multidisciplinary	14

WOS	<p>("cancer metastasis") AND (microfluidic OR "organ-on-a-chip") AND ("cancer invasion" OR "neoplasm invasiveness" OR "cell migration" OR extravasation OR intravasation)</p>	<p>Year: 2021-2017</p> <p>Document Type: Article; Review</p> <p>Language: English</p> <p>WOS category: Engineering biomedical; Biochemical research methods; Multidisciplinary sciences; Cell biology; Oncology; Instruments instrumentation; Materials science biomaterials; Biophysics</p>	32
	<p>("cancer metastasis") AND (microfluidic OR "organ-on-a-chip") AND ("circulating tumor cells" OR "tumor heterogeneity") AND (analysis)</p>	<p>Year: 2021-2017</p> <p>Document Type: Article; Review</p> <p>Language: English</p> <p>WOS category: Oncology; Instruments instrumentation; Biochemical research methods; Materials science multidisciplinary; Medicine research experimental; Biophysics</p>	11
	<p>("cancer metastasis") AND (microfluidic OR "organ-on-a-chip") AND ("angiogenesis" OR "neovascularization, pathologic")</p>	<p>Year: 2021-2017</p> <p>Document Type: Article; Review</p> <p>Language: English</p> <p>WOS category: Instruments instrumentation; Cell biology; Cell tissue engineering; Materials science biomaterials; Materials science multidisciplinary; Multidisciplinary sciences; Biophysics; Biochemical research methods; Engineering biomedical</p>	12
PUBMED	<p>("cancer metastasis" OR "neoplasm metastasis") AND (microfluidics OR "lab-on-a-chip devices") AND ("tumor microenvironment" OR "tissue engineering")</p>	<p>Year: 2021-2017</p> <p>Document Type: Journal article; Review; Systematic review</p> <p>Language: English; Spanish</p> <p>Text availability: Full text</p>	34

Tras la lectura de título y *abstract* se rechazaron aquellos que no abordaban de forma principal los aspectos buscados y que, por tanto, no cumplían los criterios de inclusión. Una vez seleccionados y revisados los artículos para la lectura completa, se excluyeron un total de 15 estudios: 6 artículos y 9 revisiones. Por otro lado, a partir de la bibliografía referenciada en las revisiones consultadas, se incluyeron tres estudios considerados adecuados para los aspectos abordados y que cumplían con los criterios de inclusión establecidos. La información extraída de los artículos completos revisados se organizó en bloques temáticos desde los que abordar el estudio de la metástasis.

A continuación se recogen en un diagrama de flujo (Figura 2) los diferentes pasos seguidos en el proceso de selección de los artículos revisados, partiendo de los registros extraídos tras la búsqueda en las bases de datos, e indicando el número de estudios excluidos en cada una de las etapas.

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de selección de los artículos abordados en la revisión



4. Desarrollo

4.1. Eventos de la cascada metastásica

Como se ha mencionado con anterioridad, la metástasis es un proceso complejo que evoluciona a través de una **cascada de eventos**, reflejados de forma esquemática en la Figura 3. El tumor primario crece y las células malignas, que han adquirido un fenotipo invasivo, son capaces de dispersarse e **invadir el estroma**. Posteriormente, tiene lugar la migración transendotelial de las células cancerosas entrando en la circulación sanguínea o linfática (**intravasación**) en forma de célula única (**single-cell**) o formando agrupaciones (**clusters**). Si estas células tumorales circulantes sobreviven en la circulación, pueden **adherirse** a la pared de la microvasculatura de una zona distal con respecto al tejido donde se originó el tumor primario. En este punto, se produce de nuevo la migración transendotelial, de manera que abandonan el lumen del vaso entrando en el tejido circundante (**extravasación**). Si consiguen adaptarse al nuevo microentorno, proliferan y **colonizan** el tejido formando un **tumor secundario** ^{12,13}.

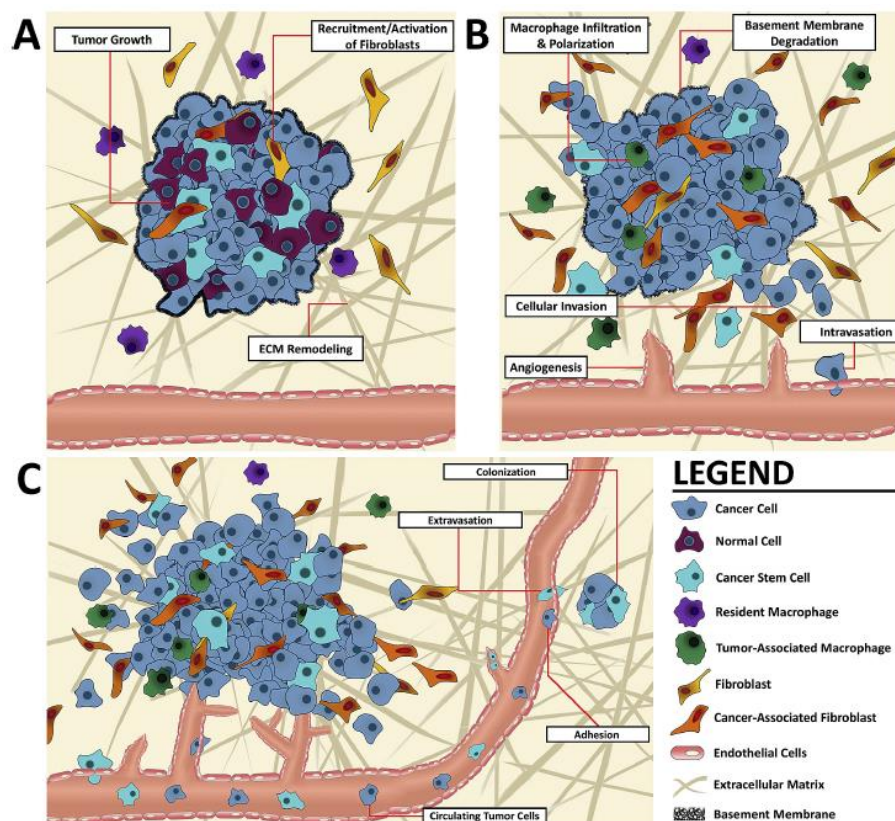


Figura 3. Representación esquemática de los eventos que ocurren en la cascada metastásica. El crecimiento del tumor afecta a la homeostasis del tejido y produce el remodelado de la ECM (**A**). Las señales liberadas por las células cancerosas reclutan a componentes del compartimento estromal como

los fibroblastos, los cuales se activan y diferencian dando lugar a fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). Estas células son capaces de estimular la angiogénesis mediante la liberación de factores pro-angiogénicos. Las células tumorales migran e invaden los vasos circundantes **(B)**. Aquellas células tumorales y células madre cancerosas que sobrevivan, se pueden adherir a la pared de los vasos en otra localización y extravasarse en el parénquima del órgano diana iniciando la colonización **(C)**. [12]

La iniciación del proceso tumoral y la progresión de este, dependen de alteraciones genéticas y epigenéticas que otorgan a las células malignas características como una capacidad proliferativa descontrolada, insensibilidad a factores supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, capacidad de migración o regulación de la formación de nuevos vasos (angiogénesis tumoral), etc^{12,13}. Sin embargo, estos factores no son los únicos responsables de la heterogeneidad observada en los diferentes tipos de cáncer, sino que las señales procedentes del microambiente tumoral hacen que este sea único y que la progresión del cáncer sea muy heterogénea.

En un tejido sano, las células epiteliales se organizan espacialmente manteniendo las interacciones entre sí gracias a la formación de **uniones estrechas** (*tight junctions*) y se caracterizan por presentar **polaridad apico-basal**. Cuando se produce el crecimiento del tumor, la estructura del parénquima se ve alterada y las células que sufren esta transformación maligna pierden la polaridad y las uniones intercelulares que mantienen la arquitectura normal del tejido. Se produce una regulación a la baja de marcadores epiteliales, como por ejemplo la E-cadherina, y un aumento de la expresión de marcadores mesenquimales como la N-cadherina, dando lugar a un cambio de fenotipo conocido como **transición epitelio-mesénquima** (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*)¹³. Este proceso contribuye a la agresividad de las células cancerosas en la medida en que adquieren mayor capacidad migratoria, potenciándose las interacciones célula-matriz a través de la formación de uniones focales, en detrimento de las interacciones célula-célula. La reversión de este estado tras la extravasación (**MET, mesenchymal-epithelial transition**) facilita la etapa de colonización en la metástasis.

Los componentes del estroma también experimentan cambios como consecuencia del crecimiento del tumor y la interacción con las células cancerosas. Se inicia una cascada de señales bioquímicas y biofísicas que termina generando un microambiente favorecedor de la expansión del tumor. Dentro de los componentes del estroma destacan los fibroblastos, los cuales pasan a convertirse en **fibroblastos**

asociados al cáncer (CAFs, *cancer associated fibroblasts*), caracterizados por una mayor tasa proliferativa y mayor depósito de colágeno en la matriz. Se ha observado que en tumores, los CAFs potencian la proliferación, invasión y angiogénesis lo que indica un **papel sinérgico** en la metástasis del cáncer¹³.

Por otro lado, otro componente importante que se encuentra presente en el TME es el **sistema inmunitario**. Las células inmunes impactan de formas muy diversas en la progresión del cáncer: pueden atacar a las células cancerosas, limitando el crecimiento y la expansión del tumor, pero su actividad también puede verse modulada por las señales liberadas por parte de las células tumorales y del estroma, generando un ambiente inmunosupresor que favorece la supervivencia de las mismas.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el TME juega un papel fundamental en la progresión de la metástasis en cáncer. Hay diferentes factores que definen dicho microentorno: **señales bioquímicas** (ej. factores solubles), **señales mecánicas** (ej. flujo intersticial), los **tipos celulares** co-cultivados y las características de la **matriz**.

Por lo tanto, uno de los principales desafíos actuales es comprender el papel, a nivel individual, que tienen los diferentes componentes que constituyen el TME y la forma en la que condicionan los pasos que ocurren en la metástasis^{12,13}. En este campo, los modelos microfluídicos junto con otras tecnologías de la microingeniería, se han empleado para modelar aspectos biológicos decisivos en la cascada metastásica.

4.2. Modelos de migración e invasión local

La malignidad de un tumor está estrechamente relacionada con la capacidad que presentan las células tumorales para migrar e invadir el tejido que las rodea. El primer paso que tiene lugar en la cascada metastásica es la **invasión** del tejido donde se origina el tumor primario. Uno de los principales desafíos es entender cómo las **señales bioquímicas y biomecánicas** que proceden del microentorno potencian o condicionan el **fenotipo invasivo** y la forma en que las células invaden el tejido intersticial. Estímulos como la **hipoxia** o la producción de enzimas como las **metaloproteinasas** (MMPs) por parte de las células tumorales, conducen a un **remodelado** de la matriz que rodea a las células, desencadenando cambios en sus propiedades físicas como la rigidez, densidad o la disposición de las fibras que la constituyen, lo que ha demostrado tener un efecto en la morfología celular, y en la velocidad y modo de migración de las células

cancerosas^{13,14}. Los cambios sufridos por la matriz a su vez afectan a la accesibilidad a factores de crecimiento, la disponibilidad de ligandos, etc., y a la transmisión indirecta de señales mecánicas, por lo que las alteraciones en su estructura también cambian la forma en la que las diferentes señales afectan al tumor^{13,14}.

4.2.1. Modelos de migración e invasión tumoral bajo estímulos bioquímicos

Generalmente, los ensayos realizados para estudiar la migración direccional de las células bajo el establecimiento de gradientes bioquímicos se han basado en el uso de la **cámara de Boyden (transwell)**. Sin embargo, este tipo de diseño presenta inconvenientes como la fluctuación de los gradientes generados y la incompatibilidad con técnicas de microscopía que hacen imposible un seguimiento de las trayectorias celulares en tiempo real a través de la membrana¹⁴.

En comparación con estos ensayos usados tradicionalmente en quimiotaxis y migración, la tecnología microfluídica permite establecer unas condiciones de gradientes mucho más **controladas**, así como hacer un **análisis cuantitativo y seguimiento a tiempo real** de los eventos celulares. Se han desarrollado multitud de dispositivos en los que el gradiente se establece mediante diferentes técnicas (estáticas o basadas en la aplicación de flujo), y en los que es posible hacer múltiples condiciones de forma simultánea. Esta versatilidad se observa en el dispositivo desarrollado por Wu y colaboradores¹⁵. La plataforma consta de 8 unidades generadoras de gradiente debido a su estructura radial (Figura 4A), permitiendo establecer diferentes configuraciones de gradiente químico a las que someter a diferentes tipos celulares. Su estructura de PDMS (polidimetilsiloxano), compatible con técnicas tradicionales de microscopía, hace posible obtener datos cuantificables y monitorizar la migración celular mediante la técnica de cámara rápida *time-lapse*. Cada unidad presenta un canal de gradiente principal separado del canal de carga por donde se introducen las células a través de un delgado canal de barrera. Este permite alinear las células en el área donde la concentración del agente quimioatrayente es menor. (Figura 4A, B).

La validación del dispositivo para el estudio de la quimiotaxis se efectuó mediante el análisis de la migración de dos líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231 y MCF7, bajo el efecto de un gradiente de factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) (Figura 4D). La migración celular se cuantificó midiendo

la distancia recorrida por las células partiendo del canal de acoplamiento que las separa del canal de gradiente.

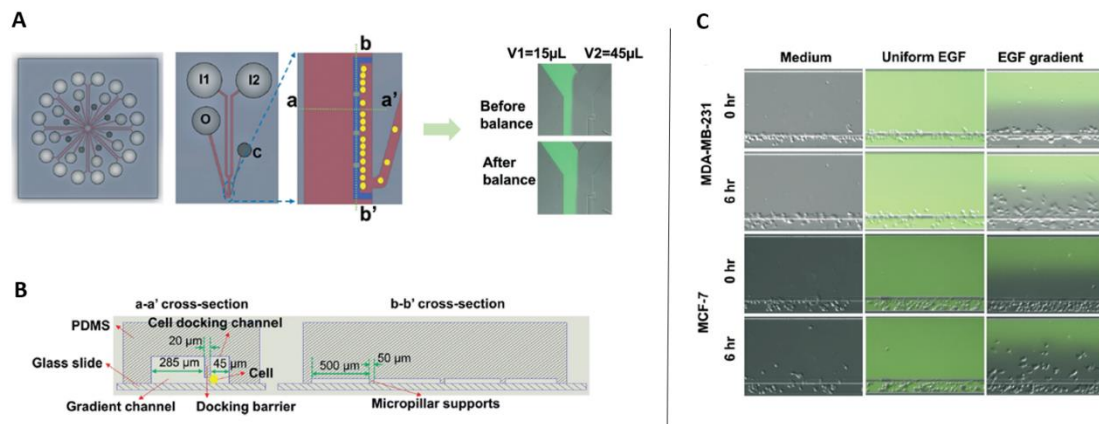


Figura 4. Representación del dispositivo de estructura radial y resultados del ensayo de migración. **A.** Se observa la estructura completa del chip, y la visión de una sola unidad de gradiente. I1 e I2: entradas, O: salida de desechos, C: canal de carga. A la derecha se observa la estabilización de la interfaz de gradiente, tras equilibrar la diferencia de presiones entre los canales colocando una gota de aceite que conecta ambas entradas. **B.** Sección trasversal de las regiones marcadas en A. El canal de barrera o acoplamiento (*cell docking channel*) permite alinear las células antes de entrar en el canal de gradiente. **C.** Imágenes capturadas con microscopio de fluorescencia invertido de la distribución de las células MDA-MB-231 y MCF7 a lo largo de seis horas. Las células migraron bajo el establecimiento de un gradiente de EGF. [15]

A la hora de diseñar estudios de quimiotaxis, es necesario considerar que en el TME existe una **comunicación paracrina** establecida entre las células cancerosas y otros tipos celulares, lo que conduce a una mayor capacidad invasiva.

A continuación se muestra un dispositivo para la visualización y cuantificación del desplazamiento de las células tumorales en un entorno 3D (Figura 5A, B) bajo diferentes estímulos extracelulares¹⁶: gradiente de nutrientes (medios con diferente porcentaje de FBS, suero fetal bovino), de citoquinas (IL-6) y co-cultivo con **fibroblastos**. En los diferentes ensayos realizados en este dispositivo con una línea celular de HeLa se observó una correlación positiva entre la capacidad migratoria y velocidad de migración de las células tumorales y el gradiente de concentración establecido. A mayor densidad de fibroblastos co-cultivados (HEL299), mayor era el número de células tumorales que invadían el canal lleno de Matrigel en dirección a la segunda cámara, y mayor la distancia recorrida (Figura 5C), observándose también un incremento destacado de la velocidad de migración.

Estos resultados ponen de manifiesto la comunicación existente entre las células tumorales y los fibroblastos. En este proceso intervienen ciertos factores como TGFβ1

(factor de crecimiento transformante beta 1), que participa en el proceso de EMT y en la activación de los fibroblastos y cuyas concentraciones se elevaron en el medio celular en condiciones de co-cultivo¹⁶.

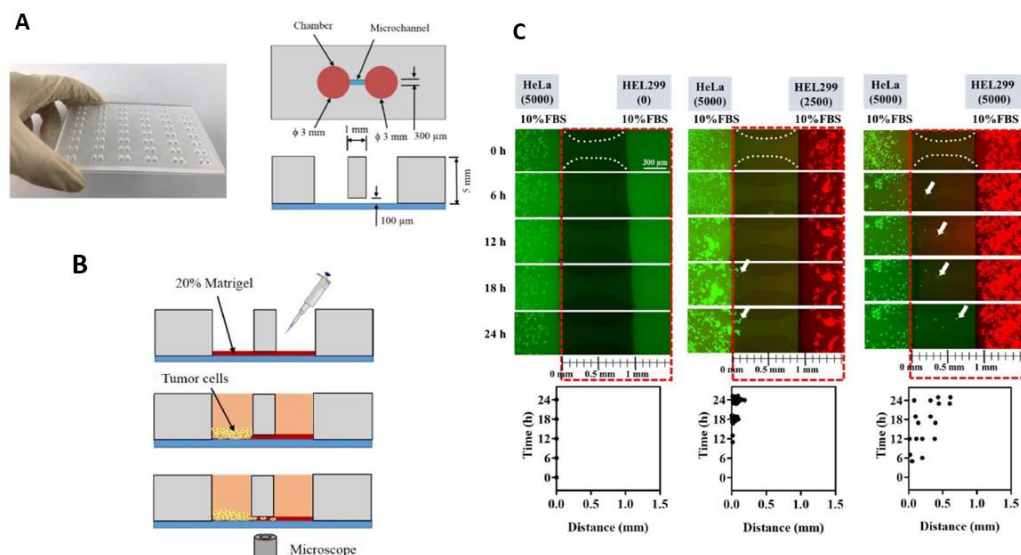


Figura 5. Dispositivo desarrollado por Goh y colaboradores para el estudio de migración celular. **A.** La placa microfluídica está constituida por 96 cámaras, conectadas de dos en dos por un microcanal. **B.** Esquema del procedimiento para el ensayo de migración, en el que se cultivan las células tras cargar el Matrigel. **C.** Resultados del ensayo de migración celular (línea celular HeLa) inducida por el co-cultivo con fibroblastos (HEL299), cultivados a diferentes densidades celulares. [16]

Por otro lado, estos sistemas de cultivo 3D también permiten el estudio de los **modos de migración celular**. Como se explicó anteriormente, la invasión del estroma no sólo es llevada a cabo por células que migran de forma individual, sino que también pueden migrar de forma **colectiva**, creando *clusters* liderados por aquellas con mayor capacidad invasiva (*leader cells*). Cuando se da esta migración, las células permanecen conectadas entre sí mediante las uniones intercelulares, el citoesqueleto se organiza para generar fuerzas de tracción y la matriz extracelular sufre una degradación o remodelación en la trayectoria de migración, permitiendo el avance.¹⁷

En la Figura 6A, a-i se observa el diseño de un dispositivo microfluídico aplicado en el estudio de la **invasión colectiva** del estroma por parte de células de cáncer de mama inducida bajo la generación de un gradiente de FBS¹⁷. La cámara central del dispositivo se cargó con Matrigel al 50% y la suspensión celular se introdujo por uno de los canales laterales. Las células se depositaron sobre la superficie del hidrogel generada en la interfase entre el canal y la cámara central. En este modelo, las células MDA-MB-

231 invadieron de forma colectiva la matriz a favor del gradiente de FBS generado por difusión (Figura 6A, a-ii).

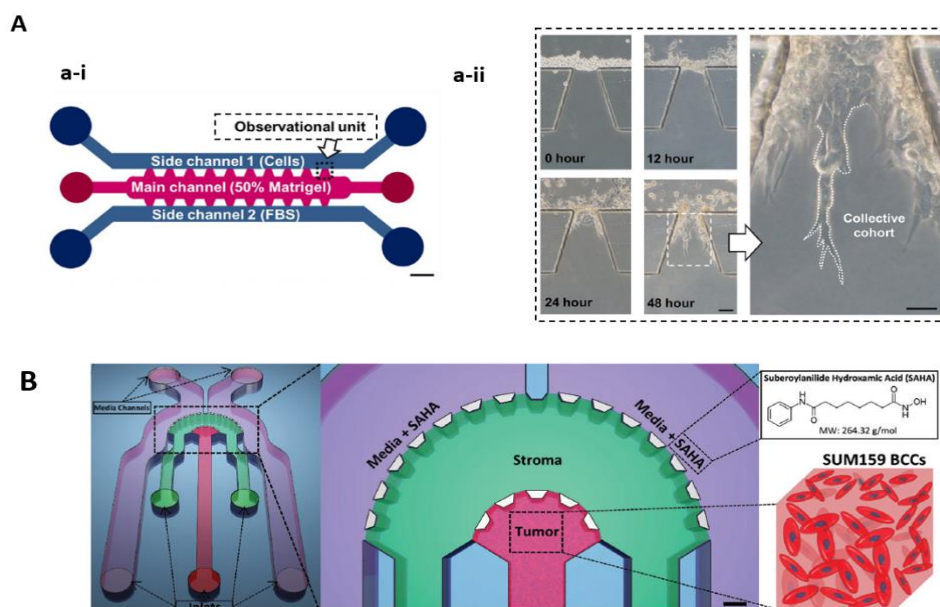


Figura 6. Plataformas microfluídicas desarrolladas para el estudio de la invasión local. **A.** Modelo de Xia y colaboradores. **(a-i).** Está constituido por dos microcanales laterales y una cámara central, conectados por galerías de forma trapezoidal. (Escala: 500μm). **(a-ii).** Las imágenes de microscopía mostraron un patrón de invasión colectiva de las células MDA-MB-231 a 2 días de cultivo. (Escala:50 μm). *Adaptado de Xia et al. [17].* **B.** Plataforma microfluídica desarrollada para ensayos de invasión celular bajo la acción de fármacos anticancerígenos. Permite la compartimentalización de las células tumorales embebidas en matriz y el estroma, manteniendo la interconectividad entre las regiones. (Escala 125 μm). [18].

Como se deduce a partir de los modelos anteriores, la matriz extracelular actúa como una **barrera** que dificulta la difusión, no sólo de nutrientes y otros factores solubles, sino también de los fármacos afectando a la **farmacocinética** y **farmacodinamia**. De esta forma, la tecnología microfluídica permite generar modelos 3D como el representado en la Figura 6B¹⁸, donde es posible simular la difusión de las moléculas del fármaco hasta la región tumoral y los gradientes generados en la matriz, para estudiar el efecto en la invasión celular.

4.2.2. Estudios de la interacción de las células tumorales con la ECM

La introducción de la matriz extracelular en los modelos *in vitro* es esencial para obtener modelos más realistas en los que poder estudiar la **biomecánica** de la invasión celular. Las células tumorales muestran una gran **plasticidad**, no sólo en la forma en la que remodelan la ECM para poder avanzar, sino también en los **modos de migración** que adoptan. Se ha observado que existe una relación entre las propiedades mecánicas

y morfológicas de la matriz, como pueden ser la rigidez y el tamaño de poro, con la dinámica de migración celular¹⁴.

Con el objetivo de estudiar el efecto que la composición y las características físicas de la matriz parece tener en la dinámica de migración de las células tumorales, Anguiano y colaboradores¹⁹ realizaron un ensayo de migración con células de adenocarcinoma de pulmón (H1299) en hidrogeles con diferente proporción de Matrigel:colágeno, reproduciendo de esta forma la interfase entre una membrana basal desorganizada debida a la invasión y el tejido conectivo subyacente. Las células se cultivaron en la cámara central del dispositivo microfluídico mostrado en la Figura 7A, a-i embebidas en tres tipos de hidrogeles: sólo colágeno tipo I (C), misma concentración de colágeno y Matrigel (CM, 1:1), y doble concentración de Matrigel (CM+, 1:2). El incremento en la concentración de Matrigel aumentó la rigidez, el espesor de las fibras y disminuyó el número de poros (Figura 7A, a-ii), de mayor tamaño que en los hidrogeles de colágeno¹⁹.

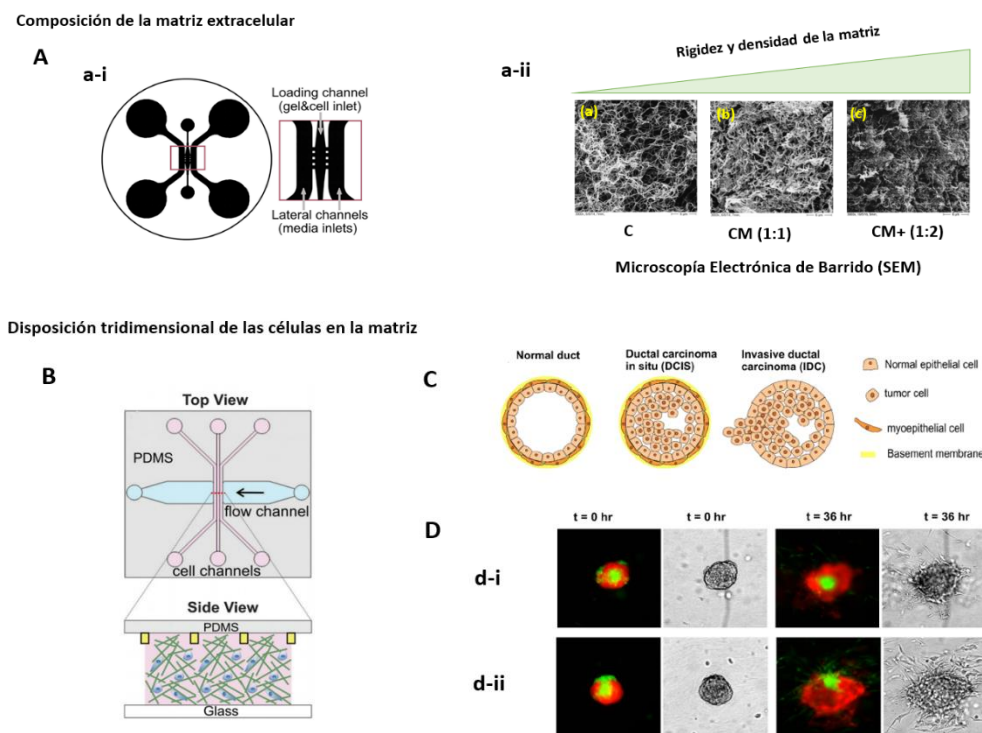


Figura 7. Modelos para el estudio de la interacción con la matriz extracelular. **A.** Chip desarrollado por Anguiano y colaboradores. **(a-i).** La estructura del chip presenta dos canales por donde se introduce el medio y uno central donde queda retenido el gel. **(a-ii).** La caracterización de los diferentes tipos de hidrogeles (en estado deshidratado) se hizo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). *Adaptado de Anguiano et al. [19]* **B.** Estructura del dispositivo desarrollado previamente por el grupo de Huang. Los canales se cargaron con esferoides embebidos en matrices de colágeno. *[21]* **C.** Evolución temporal del cáncer de mama ductal donde se observa la salida de las células malignas dando lugar a la

forma invasiva (IDC). [20] **D.** Imágenes de fluorescencia (MDA-MB-231, verde; MCF10A, rojo) y campo claro de dos tipos de arquitectura observadas en los esferoides dentro del microdispositivo, a diferentes tiempos (0h y 36h). *Adaptado de Huang et al. [20].*

Los resultados mostraron que las células presentaban mayor velocidad de migración en los hidrogeles de tipo CM. Por otro lado, frente a una migración de tipo **mesenquimal** en los geles de sólo colágeno (donde las células emiten protuberancias o **lamelipodios**), en aquellos hidrogeles donde se había añadido Matrigel, la migración pasó a ser de tipo **lobopodial**. Este tipo de migración se caracteriza por la aparición en el cuerpo celular de protuberancias cilíndricas de extremos romos¹⁹ y parecía ser más efectiva para las características de tamaño de poro del hidrogel. El cambio en el modo de migración se asoció al aumento de rigidez de la matriz y a los factores aportados por el Matrigel.

Las células tumorales también se pueden organizar espacialmente dentro de la matriz formando estructuras tridimensionales como los esferoides, en los que se establecen interacciones célula-célula y célula- matriz más próximas a las observadas *in vivo*. En un estudio realizado con una línea de tumor mamario, se estableció una relación entre la **arquitectura tridimensional** adoptada por la masa tumoral y la invasión celular²⁰. Para ello se cultivaron esferoides con una relación 1:1 de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-10A (epiteliales no tumorigénicas), los cuales se introdujeron embebidos en colágeno tipo I, creando por tanto una matriz tridimensional en el interior de la plataforma microfluídica representada en la Figura 7B.

Los autores observaron una heterogeneidad en la organización espacial de las células tumorales con respecto a las epiteliales sanas dentro de los esferoides a diferentes tiempos de cultivo. La invasión de las células tumorales se encontraba bloqueada en aquellas estructuras donde las células no tumorigénicas ocupaban la periferia del esferoide, recluyendo en el interior a las células cancerosas. Por el contrario, cuando las células malignas tenían acceso a la matriz extracelular, las células desprendidas de la masa tumoral mostraron mayor capacidad invasiva²⁰, especialmente en aquellos esferoides que presentaban la arquitectura representada en la Figura 7D, d-ii. Esta forma de organización de las células cancerosas con respecto a las no tumorigénicas, en la que las células tumorales acceden al estroma por una abertura en la periferia, muestra una cierta similitud con la disposición observada en la **forma**

invasiva del carcinoma ductal (IDC, carcinoma ductal invasivo) y representada en el esquema de la Figura 7C. En este caso, las células malignas recluidas en el interior del ducto mamario acceden al tejido circundante. De esta forma, ya que los cambios en la arquitectura del tumor tienen importancia diagnóstica, el uso de esferoides tumorales podría facilitar el estudio de los diferentes estadios del cáncer mamario²⁰.

Como se observa en los modelos descritos, el cultivo de las células tumorales embebidas en matrices permite que estas adopten una organización acorde con la **tridimensionalidad** que caracteriza al entorno tumoral. Por otro lado, dada la influencia que presenta la composición y estructura de la ECM en la migración e invasión celular, es fundamental considerar las características que dicha matriz presenta en un tipo de cáncer concreto para desarrollar modelos con **relevancia fisiológica**^{12,14}.

4.2.3. Simulación del flujo intersticial y efecto de la tensión cortante (*shear stress*)

El flujo intersticial es el movimiento de líquido a través de la matriz extracelular de los tejidos. Dicho transporte de líquido genera **gradientes de presión** que pueden potenciar la metástasis, favoreciendo el desprendimiento celular de la masa tumoral¹⁴. El paso directo de este flujo intersticial sobre las células, así como del flujo que circula por el torrente sanguíneo o linfático, produce un estrés conocido como ***shear stress* o tensión cortante**, el cual puede alterar los patrones de señalización celular conduciendo a cambios en la proliferación y en la migración¹⁴.

El efecto del flujo aplicado no sólo puede influir de forma directa en las células tumorales, sino que también afecta a las células endoteliales. Se ha observado que cambios en la tensión cortante ejercida por el flujo, así como en la composición de la ECM, pueden conducir a una **transformación endotelio-mesénquima** (EndMT, *endothelial to mesenchymal transformation*), lo que permite que las células migren e invadan el tejido. Dicha invasión influye a su vez en el microentorno tumoral activando a los fibroblastos (CAFs)^{22,23}. Para estudiar el efecto que la tensión provocada por el flujo y la alteración del microentorno tumoral tienen en la interacción entre las células tumorales y el endotelio vascular, Mina y colaboradores²³ desarrollaron un dispositivo microfluídico (Figura 8A) en el que esferoides de cáncer de mama, embebidos en matrices tridimensionales de colágeno y glicosaminoglicanos (GAGs), se co-cultivaron

con **células endoteliales de cordón umbilical** (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), adheridas directamente sobre la superficie del gel. La estructura de este dispositivo se compone de un sustrato de vidrio sobre el que se dispone una capa de PDMS con una cámara central y un microcanal superior. El medio recircula a través del canal formando un circuito cerrado, gracias a la acción de una bomba peristáltica²². La tensión cortante inducida por el flujo, sumada a la presencia de GAGs en la matriz, provocó un incremento en el número de células tumorales que migraban hacia el endotelio vascular, así como en el número de células HUVECs que invadían la matriz²³ potenciándose la interacción entre ambos tipos celulares.

A diferencia de este estudio, en el dispositivo presentado en la Figura 8B²⁴, el fluido se hizo circular directamente a través de un modelo de tumor contenido en la cámara central gracias al gradiente de presión generado entre el canal de entrada y el canal de salida de flujo. Esta aproximación permitió estudiar el efecto del flujo intersticial como promotor de la metástasis²⁴. El aumento de líquido en el tumor debido a procesos como la angiogénesis, ejerce una presión que impacta en la adhesión celular. En este caso en concreto, se emplearon agregados de tipo esférico usando la línea celular de cáncer de mama MCF7.

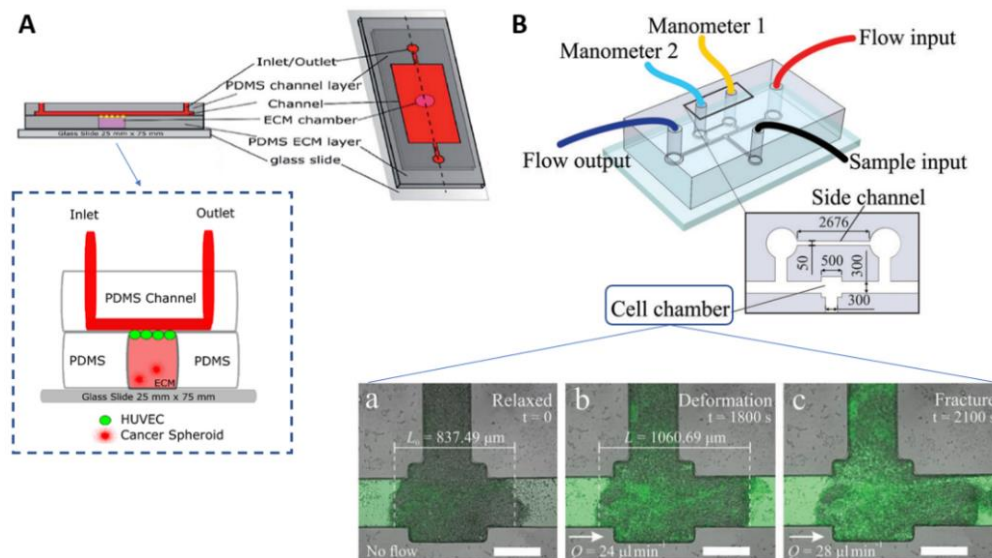


Figura 8. Dispositivos microfluídicos desarrollados para el estudio de los efectos del flujo en el TME. **A.** Modelo diseñado por Mina y colaboradores para el estudio de la interacción entre las células endoteliales y los agregados tumorales embebidos en la ECM. *Adaptado de Mina et al. [22],[23].* **B.** Plataforma microfluídica en la que se establece el flujo intersticial a través de los agregados celulares cultivados en la cámara central. Debajo se muestra la deformación observada a medida que se incrementa el flujo, hasta que la masa tumoral se fractura. (Escala 300 μm). *Adaptado de Tran et al. [24].*

Un aspecto importante en el diseño de esta plataforma microfluídica, es la incorporación de un canal paralelo que permite la descarga de fluido, desempeñando por tanto una función de drenaje para evitar que la presión ejercida en la muestra sea excesiva. Para medir la diferencia de presión establecida a través de la muestra, los puertos de entrada y salida del canal lateral se conectaron a un manómetro (Figura 8B).

El uso de este modelo mostró un aumento de la **permeabilidad** y deformación de la masa tumoral a medida que se aumentaba la presión ejercida por el flujo (Figura 8B, a-c). Presiones elevadas, indujeron la fractura y desprendimiento de las células, lo que podría contribuir en un proceso tumoral a la diseminación del tumor²⁴.

4.3. Migración transendotelial

Un aspecto fundamental a la hora de simular los eventos de la cascada metastásica y realizar tareas de *screening* de fármacos en dispositivos microfluídicos es la **vascularización**. Además de simular la función de la barrera vascular, puede resultar de interés crear estructuras tridimensionales funcionales que reproduzcan la **geometría tubular** y la **polaridad** a lo largo del eje apico-basal de los vasos²⁵. En este contexto, la tecnología microfluídica responde a estos requerimientos, permitiendo además el establecimiento de fuerzas físicas como el **flujo vascular** que, como ya se ha descrito en la sección anterior, influye en la integridad del endotelio.

Se han desarrollado multitud de estrategias para la vascularización en modelos microfluídicos²⁵. Algunas de ellas se basan en emplear un **molde** que es la propia estructura de los microcanales, fabricados con PDMS o generados a partir del hidrogel, dejando que las células endoteliales revistan el vaso. De esta forma, la geometría y las dimensiones están mucho más controladas. Otras técnicas se basan por el contrario, en dejar que las células endoteliales se organicen de forma espontánea dentro de la ECM, formando una **red microvascular** cuya estructura es más próxima a la que se da de forma natural mediante **vasculogénesis**²⁵, formando redes capilares.

A continuación se tratan algunos modelos que ponen de manifiesto el papel fundamental que desempeña la vasculatura en el modelado de la metástasis.

4.3.1. Modelos de intravasación y extravasación

La red microvascular establece una **comunicación bidireccional** con las células que constituyen el tumor y dicha interacción parece tener un papel importante en procesos como la invasión y la intravasación tumoral. Para estudiar la mecánica de esta interacción y los cambios estructurales y funcionales que tienen lugar en la vasculatura, Nagaraju y colaboradores²⁶, desarrollaron un dispositivo microfluídico de PDMS constituido por tres capas concéntricas. Estas capas corresponden a la región tumoral, al estroma y a la región vascular, separadas espacialmente por postes de estructura trapezoidal (Figura 9A, a-i). De esta forma, se mantiene la **interconectividad** entre compartimentos, para que exista un movimiento de biomoléculas y células a lo largo de la plataforma²⁶. Las células endoteliales (HUVECs) se introdujeron embebidas en hidrogel de fibrina en la región vascular, dejando que se organizaran de forma espontánea, mientras que en el compartimento estromal y tumoral se empleó colágeno tipo I.

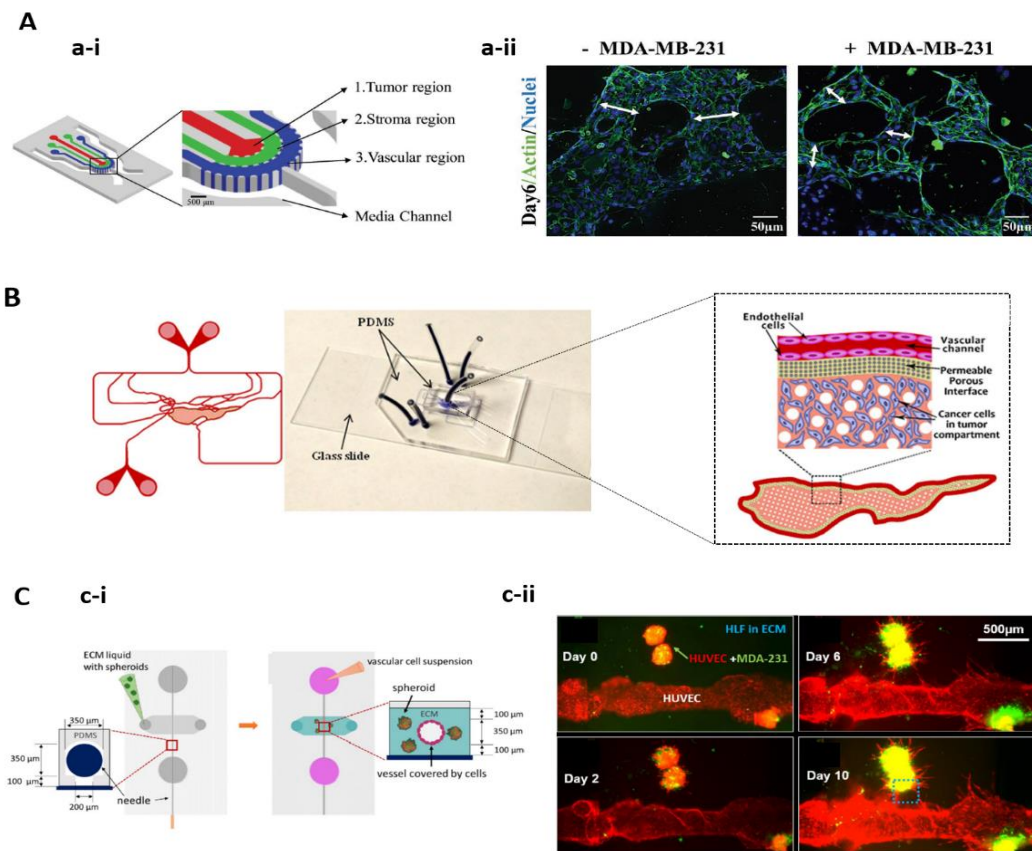


Figura 9. Modelos microfluídicos utilizados en el estudio de interacción con el endotelio vascular y la intravasación. **A.** Plataforma microfluídica empleada por Nagaraju y colaboradores. **(a-i).** La estructura de PDMS se compone de tres capas correspondientes a la región del tumor, la región del estroma y la región

vascular. El medio se introduce por el canal exterior. (Escala: 500 μ m). **(a-ii)**. Imágenes de fluorescencia para la caracterización morfológica de la red vascular a 6 días de cultivo. (Escala:50 μ m). *Adaptado de Nagaraju et al. [26]*. **B.** Modelo microfluídico bMTM (*biomimetic microfluidic tumor microenvironment*) desarrollado por Tang y colaboradores. A la izquierda se observa un esquema del compartimento vascular, y a la derecha una visión ampliada de la región tumoral, donde se distingue la interfaz porosa que separa las células tumorales del canal vascular formado por las células HBTAEC. *Adaptado de Tang et al. [27]*. **C.** Esquema del modelo empleado por Kwak y Lee. **(c-i)**. La estructura del vaso se obtiene tras polimerizar el hidrogel en la cámara central y retirar la aguja de PDMS. **(c-ii)** . Imágenes de confocal donde se observa la angiogénesis inducida por los esferoides de MDA-MB-231 (verde) y HUVECs (rojo) a lo largo de 10 días de cultivo. A día 6, se comienza a observar la invasión de las células tumorales y los brotes vasculares. *Adaptado de Kwak et al. [28]*.

Se observó que las células tumorales MDA-MB-231 aumentaban su capacidad invasiva y sufrían cambios en su morfología, presentando un mayor número de protrusiones en presencia de la red vascular. Por su parte, la liberación de factores producidos por las células tumorales indujo cambios en la morfología vascular, reduciendo el diámetro de los vasos (Figura 9A, a-ii) y aumentando la permeabilidad²⁶.

Estos cambios en la permeabilidad vascular también fueron abordados por Tang y colaboradores²⁷, para el estudio del **efecto de permeabilidad y retención aumentada** (EPR, *enhanced permeability and retention effect*) observado en el microentorno tumoral y de especial relevancia en el desarrollo de estrategias terapéuticas. En este caso, las células MDA-MB-231 se co-cultivaron con células endoteliales asociadas a tumor mamario humano (HBTAEC, *human breast tumor associated endothelial cells*), las cuales formaron **estructuras tubulares** guiadas por la superficie de los microcanales y bajo la aplicación de flujo. De esta forma, emplearon una **matriz específica de tumor**, lo que permitió recapitular con mayor fidelidad las características del microentorno tumoral. El compartimento celular se separó del vascular mediante una red de micropilares, creando una interfaz porosa que permite la comunicación (Figura 9B). Los resultados mostraron un incremento significativo de la permeabilidad vascular en el co-cultivo con MDA-MB-231 frente a aquel con una línea menos invasiva (MCF7), incluso cuando el endotelio se expuso a medio condicionado por las células tumorales.

A la hora de simular procesos como la intravasación o la angiogénesis tumoral, es necesario considerar su **carácter multifactorial** y la complejidad del TME. Kwak y Lee²⁸ trataron de optimizar un modelo que permitiese determinar los factores biológicos que condicionan una interacción óptima entre el tumor y los vasos sanguíneos, variando la composición celular de los esferoides cultivados y de la matriz. En el sistema *organ-on-chip* desarrollado, los esferoides tumorales se co-cultivaron con fibroblastos de

pulmón humano (HLFs, *human lung fibroblasts*), embebidos en una matriz que se dejó polimerizar alrededor de una estructura extraíble, como se observa en la Figura 9C, c-i. Tras retirar dicha estructura, la cavidad se revistió con células HUVECs formando el canal vascular en el que se estableció un flujo laminar.

El uso de matriz de fibrina, sumado a los **factores pro-angiogénicos** liberados por los HLFs co-cultivados, preservó la integridad del lumen vascular, y promovió la angiogénesis. Con respecto a la composición de los esferoides, aquellos formados con células MDA-MB-231 y células HUVECs consiguieron recapitular de forma óptima la migración de las células tumorales a partir de los esferoides y la angiogénesis, observándose la invasión de los brotes y de la propia estructura vascular a los 6 días de cultivo²⁸ (Figura 9C, c-ii).

Como ya se ha descrito con anterioridad, para que las células tumorales se diseminen, han de entrar en la circulación atravesando la barrera vascular. Dicha capacidad de **migración transendotelial** se asocia a un mayor **potencial metastásico**. Por lo tanto, determinar las **características celulares** que otorgan mayor capacidad de migración daría información sobre la mecánica de la metástasis, permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias. Para ello, es necesario optimizar el aislamiento de estas células. Con este objetivo, Cui y colaboradores²⁹ desarrollaron un ensayo de migración transendotelial, utilizando un dispositivo con dos cámaras de flujo separadas por una membrana biocompatible. La parte inferior dispone de microcámaras controladas de forma independiente. Este diseño permitió a los autores recolectar y cuantificar específicamente las células tumorales que habían migrado, sometidas a diferentes condiciones de estrés cortante, a través de las regiones de la membrana que habían sido endotelizadas. La caracterización a nivel del citoesqueleto de las células MDA-MB-231 recolectadas mostró diferencias significativas con respecto a aquellas que no habían migrado.

Siguiendo con la secuencia de eventos de la cascada metastásica, uno de los pasos limitantes es la **extravasación**. La formación del tumor secundario requiere de una serie de pasos, que comienzan con el arresto de las CTCs en el endotelio, en zonas por ejemplo de bifurcación donde las células pueden quedar ocluidas, o bien mediante la unión a sitios de fuerte adhesión celular¹². Posteriormente, tiene lugar la **migración**

transendotelial y la invasión del tejido. Para estudiar las diferentes señales y los mecanismos que participan en este proceso, se requieren modelos que permitan visualizar la dinámica de extravasación con una buena **resolución espacio-temporal**³⁰.

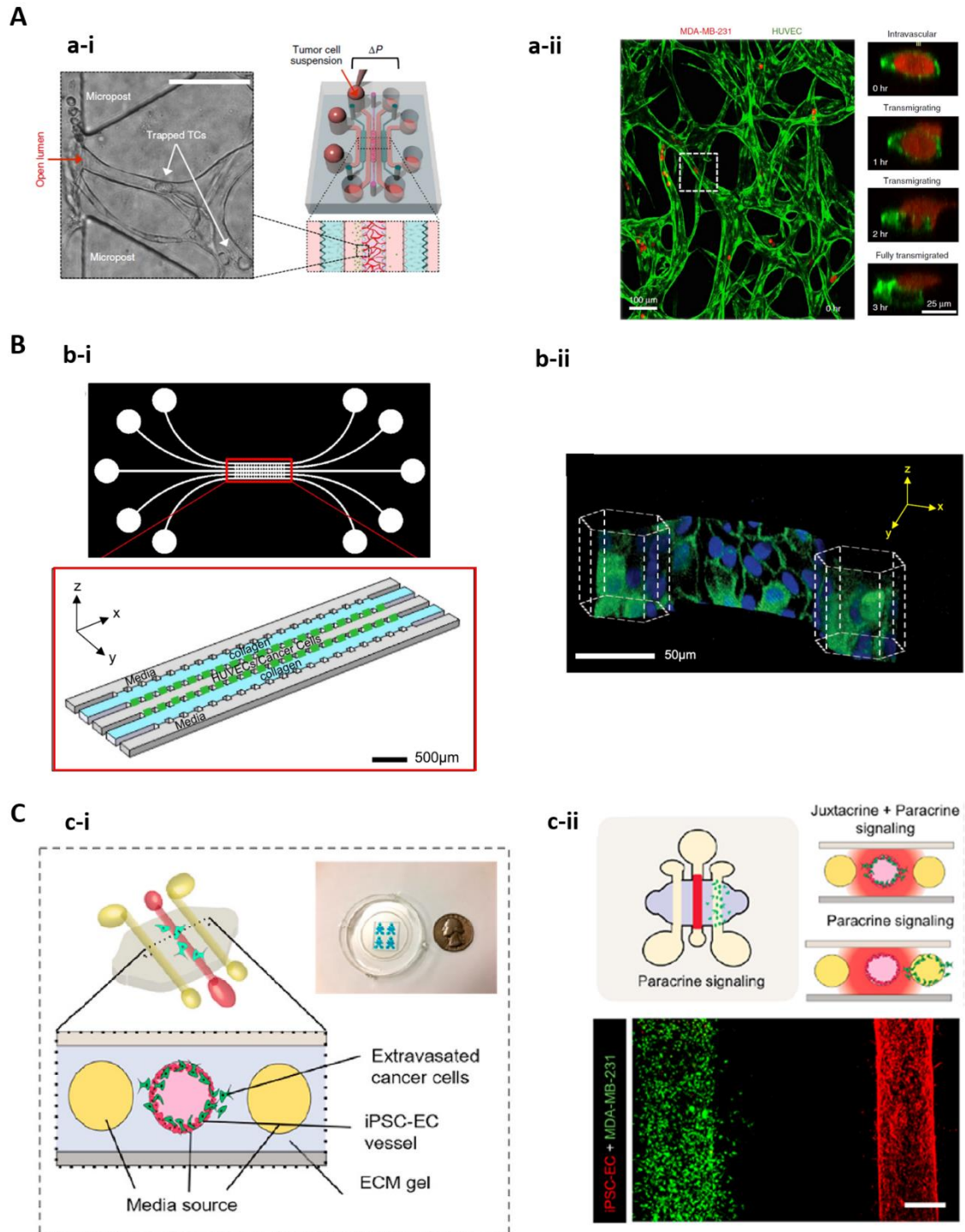


Figura 10. Modelos microfluídicos empleados en el estudio de la extravasación tumoral. **A.** Dispositivo microfluídico utilizado por Chen y colaboradores para la formación de una red microvascular. **(a-i).** Esquema del dispositivo de PDMS donde se distingue un canal central, en el que se introducen las células HUVECs, separado por canales de medio de aquellos donde se incorporan los fibroblastos de pulmón embebidos en geles de fibrina (laterales, marcados en azul). La caída de presión hidrostática aplicada a

través de la red vascular conduce la entrada de las células tumorales (TCs, *tumor cells*). **(a-ii)**. Imagen de confocal donde se marcan las células MDA-MB-231 (rojo) y las células HUVECs (verde). (Escala 100µm). A la derecha se observa la sección transversal de la región seleccionada, para el seguimiento de la migración transendotelial a nivel de célula única. (Escala:25µm). [30] **B.** Plataforma microfluídica desarrollada por Blaha y colaboradores para el estudio de la invasión de la matriz. **(b-i)**. Se observan los cinco puertos de entrada y salida que corresponden a cada uno de los canales, los cuales se separan entre sí por postes hexagonales. **(b-ii)**. Reconstrucción de los cortes de confocal que muestra la integridad de la capa de endotelio formada en la pared lateral del canal central. *Adaptado de Blaha et al. [32]*. **C.** Modelo organotípico vascularizado para el estudio de la extravasación de células de cáncer de mama. **(c-i)**. Esquema de la sección transversal del modelo, donde se generan tres lúmenes en la matriz a partir de la extracción de las varillas suspendidas dentro de la cámara central. **(c-ii)**. Representación de las estrategias empleadas en el estudio de la comunicación yuxtacrina y paracrina entre las células tumorales y el endotelio vascular. Debajo se muestra una imagen de fluorescencia donde se observa el vaso formado por las células endoteliales (*iPSC-EC*, rojo) y las células MDA-MB-231 (verde) co-cultivadas en el canal adyacente. (Escala: 200µm). *Adaptado de Humayun et al. [33]*.

Con este objetivo, Chen y colaboradores³⁰ llevaron a cabo un protocolo basado en la generación de una **red microvascular** (µVN, *microvascular networks*), mediante la inyección en el canal central de células HUVECs embebidas en **hidrogel de fibrina**. Las células se organizaron formando lúmenes permeables en contacto directo con los canales del dispositivo por los que se hizo circular el medio (Figura 10A, a-i). De esta forma, las células tumorales se perfundieron en el interior de la red, manteniendo a su vez el **flujo intravascular**. El diseño del dispositivo permitió el seguimiento del proceso de transmigración mediante microscopía confocal (Figura 10A, a-ii), extrayendo datos sobre la **cinética de extravasación** y los cambios morfológicos que ocurren a nivel celular.

Este mismo diseño fue utilizado posteriormente por Song y colaboradores³¹ para estudiar el efecto de la **hipoxia** y la expresión de **HIF-1α** (factor 1 α inducible por hipoxia) en el potencial de extravasación de líneas celulares de epitelio mamario (MCF-10A) y cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7). Las células se incubaron, previo a la introducción en el dispositivo, en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno (hipoxia y normoxia). Los resultados mostraron un incremento en el ratio de extravasación de las células expuestas a hipoxia³¹, alcanzando sin embargo los niveles observados en normoxia cuando la expresión de HIF-1α se encontraba disminuida.

Por otro lado, en este proceso de migración transendotelial, es importante destacar las **interacciones físicas** que se establecen entre las células tumorales y el endotelio vascular y que pueden facilitar la salida del vaso. En la Figura 10B, se muestra un sistema empleado en el estudio de dichas interacciones célula-célula y célula-matriz, que dirigen la invasión en ausencia de gradientes quimioatrayentes³².

El dispositivo consta de cinco microcanales (Figura 10B, b-i). En el canal central, se sembraron las células HUVECs, las cuales formaron una monocapa en las paredes laterales sobre el hidrogel de colágeno inyectado en los canales flanqueantes (Figura 10B, b-ii). La línea celular de cáncer de mama empleada (MDA-MB-231), se cultivó en el canal central sobre las paredes laterales, en diferentes condiciones: directamente sobre el colágeno, sobre la capa de endotelio activo o sobre los cuerpos celulares del endotelio inactivado, así como sobre la matriz rica en fibronectina producida por las células endoteliales y que queda tras la descelularización de las mismas³². Este diseño paralelo de los canales facilitó la aplicación de **protocolos inmunohistoquímicos** para el marcaje de las interacciones físicas. Se observó que la invasión de la matriz de colágeno por parte de las células tumorales estaba facilitada por la interacción con la monocapa de endotelio vascular, incluso cuando no había una comunicación recíproca, debido a la inactivación energética de las células endoteliales³².

Como ya se ha mencionado con anterioridad, las células tumorales interactúan con el microentorno que las rodea. En el proceso de extravasación, la comunicación tanto directa (**comunicación yuxtacrina**) como indirecta (mediante **señalización paracrina**) de las células tumorales con el endotelio, puede facilitar la migración transendotelial como resultado de las alteraciones que se producen en la ECM y en las funciones de la barrera vascular. El estudio de los mediadores moleculares sobreexpresados en el microentorno como consecuencia de dicha interacción, podría suponer una fuente de nuevas dianas terapéuticas. En este contexto, Humayun y colaboradores³³ emplearon un **modelo organotípico vascularizado** mostrado en la Figura 10C, para el estudio de la extravasación de células de cáncer mamario con diferente capacidad invasiva y el análisis de la **señalización molecular** entre las células cancerosas y el endotelio vascular.

En el dispositivo de PDMS empleado por los autores, se observa una cámara con tres estructuras extraíbles que permiten generar tres lúmenes de forma y tamaño controlados (Figura 10C, c-i), cada uno de ellos con un puerto de entrada y salida. El canal central se endotelizó mediante el uso de células endoteliales derivadas de **células madre pluripotentes inducidas** (iPSC, *induced pluripotent stem cell*).

Para el estudio de la comunicación tanto yuxtacrina como paracrina, las células tumorales se co-cultivaron en el canal central sobre el endotelio (Figura 10C, c-ii) y se analizaron los perfiles de secreción. Por otro lado, para aislar el efecto derivado únicamente de la señalización paracrina en la permeabilidad vascular, las células malignas se cultivaron en el lumen adyacente (Figura 10C, c-ii). Se observó que las células eran capaces de alterar la barrera vascular simplemente a través de esta señalización, aunque el efecto se veía potenciado cuando existía un contacto directo³³.

Como se puede observar en los modelos expuestos, la mayoría de los dispositivos se centran en el estudio de eventos concretos de la cascada metastásica. La dificultad para recapitular los diferentes procesos que tienen lugar en la metástasis dentro de un mismo dispositivo, limita la obtención de **modelos preclínicos** útiles en el desarrollo y validación de **fármacos antimetastásicos**³⁴. En la Figura 11 se recogen dos sistemas microfluídicos que pueden ser adaptados para el estudio de diferentes pasos, como la intravasación, el transporte vascular y la adhesión celular o la extravasación e invasión de la ECM.

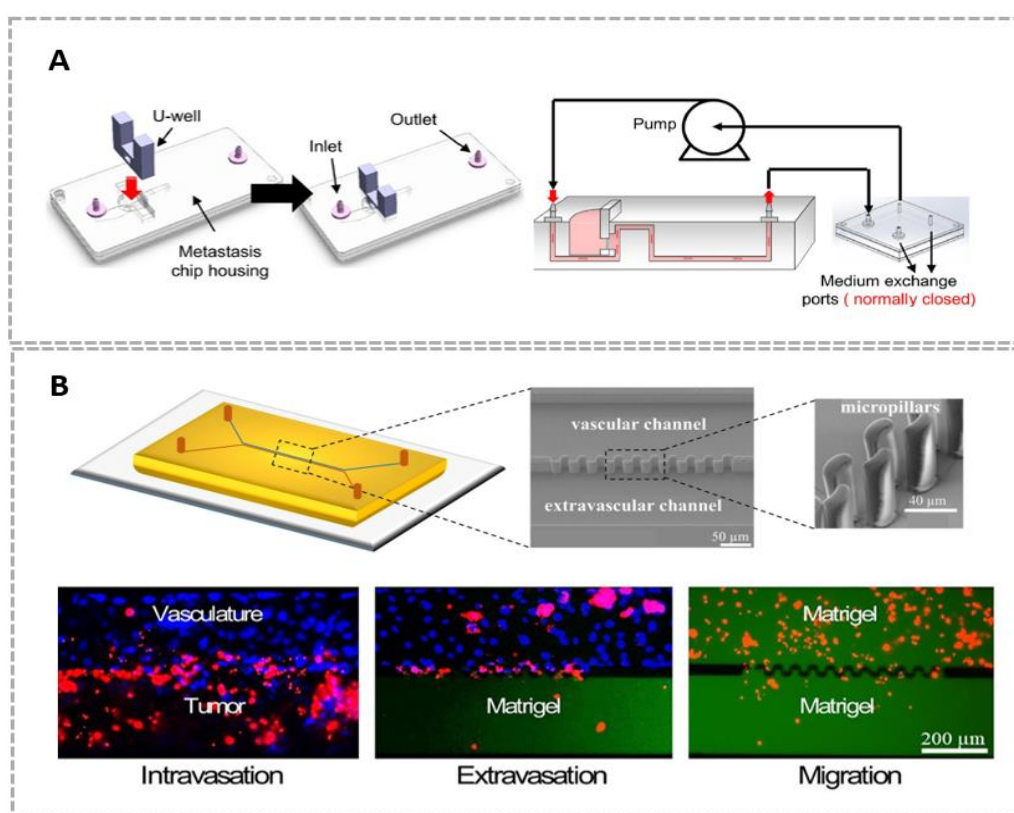


Figura 11. Dispositivos microfluídicos diseñados para reproducir los eventos de la cascada metastásica. **A.** Modelo de "plug and play", donde el inserto en forma de "U" (U-well) se coloca en el chip, con un lado de la membrana hacia la cámara y el otro hacia el microcanal. El dispositivo se conecta a una bomba de

perfusión y a un reservorio (derecha). [34]. **B.** Modelo desarrollado por Mollica y colaboradores, donde los canales se disponen de forma paralela separados por micropilares (imagen de microscopía electrónica). El sistema permite el estudio de diferentes eventos de la cascada metastásica, dependiendo de las condiciones establecidas en los canales vascular y extravascular. *Adaptado de Mollica et al. [35].*

El modelo de “**plug and play**”³⁴ mostrado en la Figura 11A, se basa en un inserto con forma de “U” que posteriormente se coloca en un *chip* microfluídico para simular la dinámica del TME. Dentro de este pocillo, la membrana porosa que lo divide permite el co-cultivo de distintos tipos celulares, así como el crecimiento de las células tumorales en 2D o en matrices tridimensionales. Esta plataforma se conecta a un sistema de perfusión y a un **reservorio** que permite manejar mayores cantidades de volumen, así como recuperar factores solubles y células tumorales que se hayan podido desprender en el flujo circulante³⁴.

En el caso del modelo desarrollado por Mollica y colaboradores³⁵, la plataforma microfluídica dispone de dos canales paralelos comunicados mediante pilares, con una abertura inferior a 3µm, dando lugar a una **micromembrana porosa** que hace posible la compartimentalización manteniendo la comunicación entre canales (Figura 11B). Dicha disposición de canales en el mismo plano facilita la **monitorización a tiempo real** de la dinámica celular entre compartimentos. En el estudio realizado por los autores, el canal vascular se revistió con células HUVECs, mientras que las células tumorales empleadas (MDA-MB-231) se cultivaron embebidas en Matrigel en el canal extravascular o se hicieron circular por el interior del canal vascular para los estudios de intravasación y extravasación, respectivamente (Figura 11B).

Como se observa en los diferentes estudios expuestos, los autores generalmente emplean diferentes líneas celulares^{26,27,29,33} con distinta capacidad invasiva. El comportamiento diferencial de las subpoblaciones celulares dentro de un mismo cáncer permitiría descifrar aquellos mecanismos que ofrecen mayor capacidad metastásica, y que podrían significar una futura diana terapéutica para el control de la diseminación tumoral. Por otro lado, es necesario destacar que gran parte de los modelos expuestos con anterioridad^{26,28,30,31,32,35}, y muchos de los que se muestran a continuación, emplean como fuente de células endoteliales aquellas derivadas de vena umbilical (HUVECs) para la endotelización de los dispositivos. Sin embargo, es importante considerar que las características del endotelio vascular difieren de unos órganos a otros, por ejemplo debido a la presencia de fenestraciones. Dichas singularidades, no sólo pueden influir

en el transporte de fármacos sino que, como ya se ha descrito con anterioridad, dado que existe una comunicación entre la vasculatura y las células tumorales, pueden influir en la migración e invasión celular.

4.3.2. Modelado del sistema linfático

La mayoría de los cánceres inician el proceso de metástasis a través del **sistema linfático**. Pese a ello, los modelos *in vitro* se centran fundamentalmente en la interacción de las células tumorales con el endotelio vascular y su propagación a través de los vasos sanguíneos³⁶. De esta forma, los mecanismos que subyacen a la **metástasis de tipo linfógena** son, en gran medida, desconocidos. A continuación se muestran dos modelos microfluídicos de diferente complejidad, que incorporan el sistema linfático para el estudio de su participación en procesos patológicos como el cáncer.

El modelo desarrollado por Cho y colaboradores³⁷, se centra en reproducir *in vitro* la interacción entre los vasos linfáticos, el tejido y los vasos sanguíneos (**LTB chip**, *lymph vessel-tissue-blood vessel*) mediante la compartimentalización del dispositivo (Figura 12A). El canal central reproduce el compartimento tisular mediante la introducción de matriz extracelular. Por otro lado, las células endoteliales vasculares (HUVECS) y linfáticas (HLECs, *human lymphatic endothelial cells*) se cultivan en los canales restantes, formando una monocapa en el lateral del hidrogel, de forma que la comunicación entre el canal sanguíneo y el linfático solo se produce mediante la difusión a través de la matriz. Por el canal linfático, las células de cáncer de mama empleadas se hicieron circular en medio con IL6, para estimular el proceso de EMT y estudiar los efectos de dicha citoquina en la metástasis linfática y la angiogénesis.

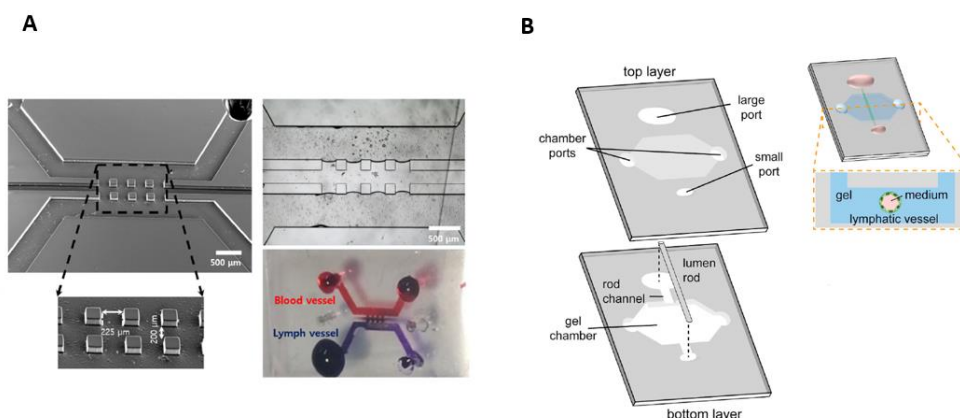


Figura 12. Modelos microfluídicos en el estudio de la metástasis linfógena. **A.** Estructura del LTB chip, donde los canales laterales simulan el vaso sanguíneo (en rojo) y el vaso linfático (en azul). El caudal

aplicado en cada canal se estableció conforme a las diferencias fisiológicas de ambos sistemas. [37] B. Esquema del μ LYMPH, donde se observan las dos capas que componen el dispositivo. El medio se hace circular a través del canal de forma pasiva, generando una diferencia de presión entre los puertos situados en los extremos del microcanal (small port; large port). [38].

Este efecto pro-metastásico de la IL6 también se estudió en un **modelo organotípico** de vaso linfático (μ LYMPH, *microscale lymphatic vessel*) desarrollado por Gong y colaboradores (Figura 12B)³⁸. En este modelo, el co-cultivo con fibroblastos asociados al cáncer permitió estudiar la comunicación intercelular con las células del endotelio linfático, y las alteraciones funcionales experimentadas por el vaso bajo el entorno tumoral simulado.

Frente al dispositivo expuesto con anterioridad, en este sistema se reproduce la estructura tubular del vaso linfático. Se emplea la **litografía**, técnica tradicionalmente utilizada en la tecnología microfluídica, para generar dos capas de PDMS. La capa inferior presenta una estructura en forma de varilla extraíble, que permite generar el lumen del vaso linfático al ser extraída tras la polimerización del gel de colágeno³⁸. De esta forma, las células del endotelio se pueden sembrar dentro de la estructura hueca, formando una monocapa que reviste el vaso.

Una de las formas de compensar la falta de modelos que consideren el sistema linfático, es emplear dispositivos ya desarrollados en los que se sustituya el endotelio vascular por células del endotelio linfático. Sin embargo, lo ideal sería desarrollar sistemas como el *LTB chip*, donde se simula tanto el sistema sanguíneo como el linfático, para poder estudiar el comportamiento de las células cancerosas y determinar qué tipo de metástasis se da preferentemente, así como la comunicación entre sistemas, haciendo uso de un único dispositivo³⁶.

4.4. Participación del sistema inmunitario en modelos de metástasis tumoral

Como se ha descrito en repetidas ocasiones, el microambiente tumoral juega un papel fundamental en las diferentes etapas de la metástasis, y en él se distinguen tanto células tumorales como células del estroma. Dentro de las células del sistema inmunitario con mayor representación en el TME, se encuentran los **macrófagos**^{13,39}. Estos **macrófagos asociados a tumor** (TAMs, *tumor-associated macrophages*) presentan una influencia en la progresión del cáncer que depende del fenotipo adoptado. Los

macrófagos **M1** tienen un potencial pro-inflamatorio y, en consecuencia, anti-tumorigénico. Sin embargo, según las señales que reciban del TME, pueden polarizarse hacia un fenotipo **M2**^{13,40}, capaz de secretar citoquinas, factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos, etc., que promueven la invasión de las células tumorales conduciendo a un peor pronóstico. Este papel pro-tumorigénico hace que los TAMs sean una buena **diana terapéutica**¹³, por lo que es necesario el desarrollo de modelos aptos para las tareas de *screening* de fármacos y la búsqueda de nuevas estrategias, y que permitan esclarecer el papel de los TAMs en la progresión del cáncer y la metástasis. A continuación se muestran diferentes modelos que tratan de definir la participación de los macrófagos en la invasión tumoral.

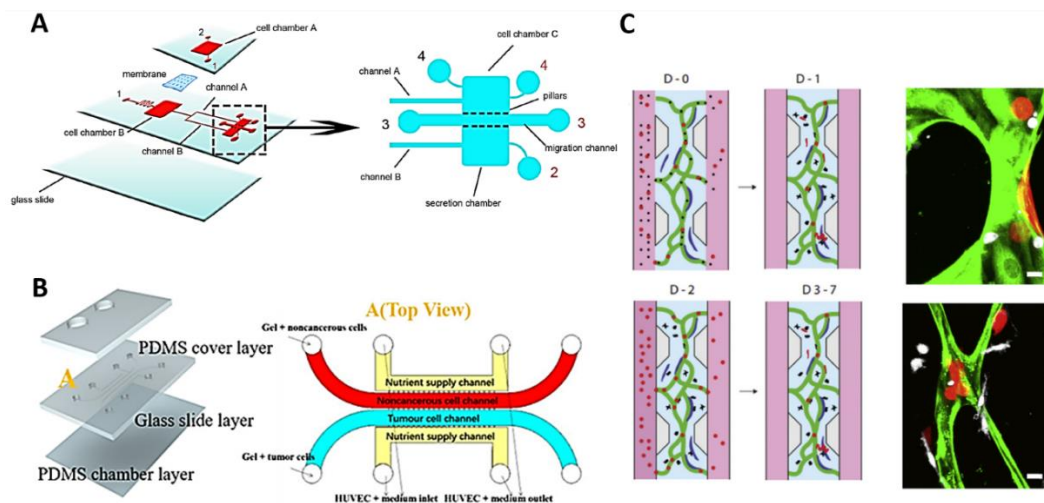


Figura 13. Modelos microfluídicos para el análisis del papel de los macrófagos en la invasión tumoral. **A.** Representación esquemática del dispositivo desarrollado por Guo y colaboradores para el estudio del cáncer de pulmón no microcítico. El sistema dispone de dos capas de PDMS, separadas por una membrana que permite el co-cultivo de las células tumorales y los macrófagos. La cámara C y la cámara de secreción comunican con el resto del sistema a través de dos microcanales regulados por válvulas. [39]. **B.** Sistema microfluídico biomimético empleado por Mi y colaboradores. La capa central de PDMS, presenta dos canales paralelos donde se cultivan los diferentes tipos celulares embebidos en matrices tridimensionales. [41]. **C.** Esquema de las estrategias empleadas para el estudio del efecto de los monocitos (en negro) en la extravasación de las células tumorales (rojo), a través de la red microvascular (verde). Los fibroblastos se marcan en azul. En el primer caso (imagen superior) se perfunden suspendidas en medio tanto las células tumorales como los monocitos extraídos de muestras sanguíneas. En el segundo caso (imagen inferior), las células tumorales son perfundidas tras la migración transendotelial de los monocitos. Imágenes de confocal: monocitos (blanco); células tumorales (rojo); endotelio (verde). (Escala:10µm). [42].

El estudio de Guo y colaboradores³⁹ se centra en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC, *non-small cell lung cancer*), para el que desarrollaron una plataforma microfluídica en la que se simula la interacción de las células tumorales con los TAMs. Dicha plataforma consta de dos capas de PDMS separadas por una membrana

porosa que permite el co-cultivo de las células NSCLC y los macrófagos en las cámaras A y B, respectivamente (Figura 13A). Estas cámaras conectan con una tercera cámara y una cámara de secreción a través de dos microcanales regulados por microválvulas. El co-cultivo de las células NSCLC y los macrófagos dentro del chip, indujo el cambio de fenotipo de estos a M2, y la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales³⁹. Por otro lado, se estudió el efecto que el **medio condicionado** por los macrófagos M2 co-cultivados con las células de carcinoma pulmonar, presentaba en la invasión por parte de las células NSCLC cultivadas en la cámara C. Para ello, se cerró el microcanal A dejando que el fluido accediera a la cámara de secreción a través del microcanal B. El medio condicionado por los TAMs, promovió la invasión de las células de carcinoma pulmonar³⁹ hacia la cámara de secreción a través del canal de migración.

A diferencia de este estudio, donde sólo se consideran los macrófagos dentro de los componentes del compartimento estromal, Mi y colaboradores⁴¹ desarrollaron un modelo donde se incluye además el endotelio vascular, para el estudio de la **comunicación bidireccional** entre los macrófagos y las células tumorales y su repercusión en la respuesta a fármacos anticancerígenos. Se creó un entorno tridimensional, mediante el co-cultivo en canales adyacentes de los macrófagos y las células tumorales de cáncer de mama embebidos en matriz de colágeno. El aporte de nutrientes se realizó a través de los canales situados a ambos lados del chip, donde se formó una monocapa de células endoteliales (HUVECs) para reproducir el efecto de la barrera vascular en el transporte de nutrientes (Figura 13B)⁴¹.

No sólo el co-cultivo con TAMs tuvo un efecto potenciador en la distancia de migración recorrida por las células tumorales, sino que también se observó un aumento de esta a los 2 y 3 días de cultivo cuando se co-cultivaron con una línea celular de **monocitos** (U937). El análisis de los marcadores de membrana mostró un cambio de fenotipo de las células U937 a TAMs bajo la influencia de las células tumorales⁴¹.

Más allá de la función que desempeña en el transporte selectivo de nutrientes y la generación de gradientes, la vasculatura es además un componente clave a la hora de simular la interacción del TME con el sistema inmunitario. Las células inmunitarias, como los monocitos, viajan en la circulación y se extravasan posteriormente en respuesta a procesos fisiológicos o patológicos, siendo reclutadas en el tejido. Este aspecto es

abordado por el grupo de Boussommier-Calleja⁴², haciendo uso de un modelo microfluídico vascularizado, expuesto anteriormente en el trabajo de Chen y colaboradores (Figura 10A)³⁰. En este caso, la red microvascular se empleó para analizar el efecto que los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares presentan en la extravasación de las células tumorales. Las células endoteliales se introdujeron embebidas en el canal central en gel de fibrina junto con fibroblastos.

Se realizaron dos experimentos para el estudio de la influencia en la extravasación de las células tumorales (Figura 13C). En primer lugar, la red vascular se perfundió con células tumorales y monocitos sin diferenciar, para reproducir la interacción que tiene lugar a nivel intravascular⁴². En el segundo experimento, los monocitos fueron introducidos primero en la vasculatura, dando tiempo a que se produjera la extravasación y diferenciación a macrófagos, previo a la introducción de las células tumorales. Mientras que en este último caso no hubo un efecto significativo en la extravasación de las células tumorales de cáncer mamario (MDA-MB-231), la interacción de los monocitos no diferenciados con las células tumorales a nivel intravascular redujo la extravasación.

Estos resultados muestran que hay una contribución de las células inmunitarias en el avance de las células metastásicas, lo que ofrece interesantes oportunidades fundamentalmente en el campo de la **inmunoterapia**.

4.5. Modelos de metástasis órgano-específica

Aunque las células tumorales que acceden a la circulación y se diseminan podrían colonizar potencialmente cualquier órgano, la evidencia clínica indica que hay cierta **especificidad** en el órgano diana para determinados tipos de cáncer, siendo más frecuente la formación de metástasis en unos órganos frente a otros. Dichas observaciones ponen de manifiesto que la metástasis no es un proceso que ocurra de forma aleatoria¹². Esta predilección hacia determinados órganos dependiendo del tipo de célula tumoral, dio paso a la llamada **hipótesis de “seed and soil”**⁴³, según la cual la metástasis está condicionada por la interacción que se establece entre las células tumorales (“seeds”) y el microentorno hospedador (“soil”)^{12,44}. De esta forma, dada la dificultad de sobrevivir en un nuevo microentorno, las posibilidades de colonización y

formación de macrometástasis en el órgano diana quedan muy limitadas, haciendo de la metástasis un proceso, en gran medida, ineficiente.

Por otra parte, James Edwing⁴⁵ propuso que las células cancerosas, una vez separadas de la masa tumoral, dan lugar a **émbolos tumorales**. La diseminación de estos émbolos estaría condicionada por la dinámica del flujo vascular^{12,44}, quedando atrapados en sitios específicos dentro de la vasculatura.

Actualmente ambas teorías son consideradas, de manera que en la diseminación tumoral y la metástasis, no sólo hay una influencia del flujo y el atrapamiento mecánico que ocurre a nivel vascular, sino que además las interacciones que las células cancerosas establecen con el microambiente específico del órgano secundario son críticas. Sin embargo, los mecanismos concretos que determinan el **organotropismo** observado en diferentes tipos de cáncer se desconocen. Por tanto, es necesario el desarrollo de modelos capaces de recapitular el microambiente del órgano diana.

Este tropismo se observa frecuentemente en la metástasis del cáncer de mama, donde órganos como el hueso, los pulmones, el cerebro o el hígado, son dianas preferentes en la diseminación del tumor. De entre ellos, los sitios más frecuentes son el **hueso** y los **pulmones**⁴⁶. Haciendo uso del diseño microfluídico expuesto en la Figura 14A, ya descrito anteriormente en la Figura 9C²⁸, Kwak y Lee trataron de modelar la extravasación de células de cáncer de mama en entornos específicos utilizando células del **parénquima óseo y pulmonar**⁴⁶. En el caso del hueso, se emplearon **osteoblastos o células stem mesenquimales** (MSC, *mesenchymal stem cells*) derivadas de médula ósea, embebidos en una matriz tridimensional de colágeno I, rodeando la estructura vascular creada en la cámara central. Para estudiar la extravasación en el microentorno pulmonar, se introdujeron en la matriz tridimensional **fibroblastos de pulmón humano**. Utilizando diferentes subpoblaciones de células MDA-MB-231, con capacidad de metastatizar hueso o pulmón en modelos *in vivo*, se observó un efecto selectivo inducido por los osteoblastos en la extravasación dentro del parénquima óseo de aquellas poblaciones celulares con tropismo por el hueso.

Frente a este estudio, donde los autores se centran en analizar la influencia de células del parénquima óseo y pulmonar, Hao y colaboradores generaron un sistema tridimensional de hueso en chip (**3D Bone-On-a-Chip**) compartimentalizado (Figura

14B)⁴⁷, donde se trata de reproducir la estructura mineralizada del hueso. Ambos compartimentos se separaron mediante el uso de una membrana de nitrocelulosa. El tamaño de poro utilizado permitió una acumulación óptima de las proteínas de **matriz ósea** sintetizadas por las **células osteoblásticas** cultivadas en la cámara inferior. Se consiguió la formación de una matriz gruesa de colágeno a 720h de cultivo, donde las fibras se organizaron espacialmente de forma natural, sin necesidad de adicionar otros factores. El co-cultivo de células MDA-MB-231 en el **nicho metastásico**, permitió recapitular eventos observados en la metástasis, como la **invasión** y la **degradación** de la matriz ósea.

La matriz extracelular del hueso, no sólo se basa en un alto contenido en colágeno, sino que además hay un **componente mineral** muy importante en la mecánica ósea que es la **hidroxiapatita (HAp)**. El efecto que la composición de la matriz presenta en el TME y la actividad celular, es abordado por Ahn y colaboradores⁴⁸ haciendo uso del sistema microfluídico presentado en la Figura 14C. Para simular el entorno del hueso, se utilizaron matrices de fibrina con diferentes concentraciones de HAp. Posteriormente se evaluó su efecto sobre la **viabilidad, proliferación y migración celular** de líneas tumorales de cáncer colorectal (SW620) y cáncer gástrico (MKN74). Por otro lado, para recrear la estructura del tumor vascularizado y analizar el efecto de la señalización paracrina del TME sobre la angiogénesis, se sembraron esferoides constituidos por las líneas tumorales empleadas y fibroblastos en las diferentes matrices generadas dentro del canal central, analizando la formación de brotes vasculares a partir de la monocapa de endotelio formada en la pared del canal. Los resultados mostraron un efecto inhibitorio sobre la migración y angiogénesis tumoral conforme se incrementó la concentración de HAp presente en la matriz.

La composición en hidroxiapatita de la matriz ósea también es considerada en el sistema desarrollado por Sharifi y colaboradores⁴⁹, donde uno de los compartimentos trata de reproducir el microentorno del hueso para el estudio de la metástasis del **carcinoma hepatocelular (HCC, hepatocellular carcinoma)**. El dispositivo consta de dos cámaras (Figura 14D), una de las cuales simula el entorno del tumor primario, utilizando células HepG2 encapsuladas en hidrogel de gelatina de metacrilato (GelMA, *Gelatin methacryloyl*), para reproducir la rigidez del tejido tumoral. En el compartimento paralelo, se creó una matriz tridimensional compuesta por el hidrogel y el mineral óseo,

comunicado con el anterior a través de un canal vascular. Las células tumorales hepáticas fueron capaces de atravesar la membrana porosa, entrar en la circulación establecida en el canal vascular y asentarse en el nicho metastásico, en una forma dependiente de la concentración de HAp⁴⁹. Este modelo de metástasis en chip compartimentalizado, simula tanto el entorno del tumor primario como el nicho metastásico en el mismo dispositivo. Frente a otros diseños, no sólo ofrece la posibilidad de **monitorizar a tiempo real** la invasión del órgano diana, sino también analizar y controlar los parámetros que afectan al proceso previo de **migración** de las células tumorales⁴⁹.

Al igual que la interacción de las células tumorales con el TME condiciona en gran medida la progresión del cáncer, las células cancerosas también pueden interaccionar con el órgano de formación del tumor secundario, propiciando la generación de ambientes aptos para su supervivencia y proliferación^{44,50}. Estos microambientes, creados antes de la llegada de las CTCs, se denominan **nichos pre-metastásicos** (PMNs, *pre-metastatic niches*) y su acondicionamiento estaría regulado por factores solubles secretados por las células tumorales y **vesículas extracelulares** (EVs, *extracellular vesicles*)^{44,50,51}.

Dado el papel como mensajeros de las vesículas derivadas de tumor, muchos grupos han empleado sistemas microfluídicos para estudiar su participación en la formación del nicho pre-metastásico y la metástasis órgano-específica. En el modelo de hígado en chip (**human liver-on-a-chip**) desarrollado por Kim y colaboradores⁵¹, se co-cultivaron **células endoteliales sinusoidales** (*LSECs, liver sinusoidal endothelial cells*) con hepatocitos humanos, en las cámaras superior e inferior del *chip*, respectivamente (Figura 14E). EVs derivadas de tumor mamario se inyectaron en flujo dentro del canal vascular, observándose como resultado una pérdida de las uniones estrechas en la barrera vascular y una activación del endotelio dando lugar a la transición endotelio-mesénquima. Frente a este sistema, Tian y colaboradores⁵² generaron un modelo de hígado y riñón en *chip* (**liver-kidney-on-a-chip**) donde utilizaron **cortes de tejido** recolectados de ratas para simular el microentorno del PMN (Figura 14F). Este enfoque ofrece la ventaja de una matriz donde los diferentes tipos celulares se organizan de acuerdo con la arquitectura *in vivo* y donde es posible mantener el **gradiente de citoquinas** que se genera de forma natural en el tejido, pero dentro del dispositivo

microfluídico. Una de las capas de PDMS que constituye el dispositivo, presenta dos cámaras que permiten el cultivo de los cortes de tejido renal y hepático, para estudiar el tropismo de las EVs de cáncer de mama que son introducidas por los microcanales. Las vesículas mostraron un fuerte **tropismo hepático**, el cual parecía estar mediado por el gradiente de citoquinas específico que se establece en dicho órgano⁵².

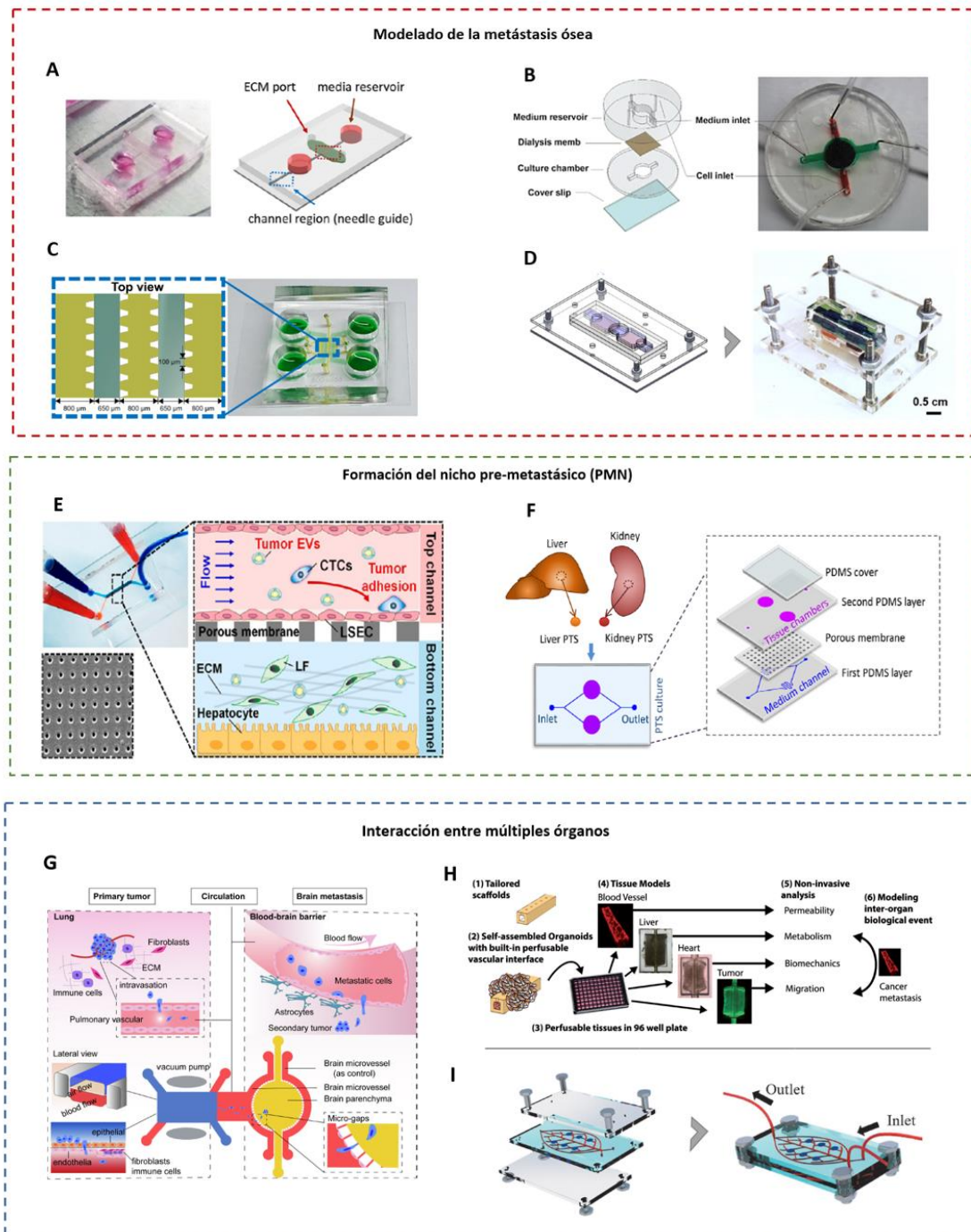


Figura 14. Modelos de metástasis empleados en el estudio del organotropismo y formación del nicho pre-metastásico. **A.** Estructura de la plataforma microfluídica utilizada por Kwak y Lee para estudiar el tropismo en la extravasación de células de cáncer de mama. [46] **B.** Modelo 3D *Bone-On-a-Chip* desarrollado por Hao y colaboradores. Presenta puertos de entrada separados que permiten el acceso a

la cámara de cultivo (rojo) y al reservorio (verde). [47] **C.** Plataforma microfluídica empleada por Ahn y colaboradores para reproducir el TME en una ECM de fibrina e hidroxiapatita que trata de imitar el hueso. [48] **D.** Estructura del modelo *HCC–bone metastasis-on-a-chip* desarrollado por Sharifi y colaboradores para la simulación de la metástasis ósea del carcinoma hepatocelular. En la fotografía: HCC (naranja); hueso (marrón); cámara vascular (azul); membrana (verde). [49] **E.** Plataforma de *Human liver-on-a-Chip* utilizada por Kim y colaboradores para simular la formación del PMN hepático a partir de vesículas extracelulares (EVs) derivadas de cáncer de mama. [51] **F.** Estructura del modelo *liver-kidney-on-a-chip* desarrollado por Tian y colaboradores, donde se introducen cortes tisulares (PTS, *precision-cut tissue slices*) en las cámaras del dispositivo, para estudiar el tropismo de las EVs de cáncer mamario. [52] **G.** Estructura del chip empleado por Liu y colaboradores, para el estudio de la metástasis cerebral del cáncer de pulmón no microcítico. El modelo de cerebro se conecta al de pulmón situado aguas arriba en el chip a través de uno de los canales vasculares, mientras que el otro canal sirve de control. [53] **H.** Representación esquemática de la estructura y aplicaciones del sistema InVADE desarrollado por Lai y colaboradores. [54] **I.** Modelo de *Human-on-Leaf-Chip* diseñado por Mao y colaboradores, donde la estructura vascular se reproduce a partir de la nervadura de la hoja. [55].

La adopción de un **diseño multi-orgánico** en los dispositivos microfluídicos es esencial a la hora de estudiar la dinámica de la metástasis. De lo contrario, se ofrece una visión parcial. Sin embargo, integrar todos los aspectos que participan, como la interacción con el parénquima tisular, la comunicación entre órganos, la vascularización, etc., es complejo desde el punto de vista de las herramientas de ingeniería necesarias para desarrollarlo. A continuación se muestran algunos sistemas de mayor complejidad con respecto a los ya expuestos, que tratan de simular diferentes microentornos tisulares, y que son útiles para el desarrollo de fármacos y el estudio de la metástasis considerando la invasión del canal vascular, la extravasación y la invasión del órgano secundario.

El modelo de Liu y colaboradores⁵³ se basa en la conexión de un **sistema organ-on-chip de pulmón**, con otro que simula la **barrera hematoencefálica** (BBB, *blood-brain-barrier*), para el estudio de la metástasis cerebral del cáncer de pulmón no microcítico (Figura 14G). El modelo de pulmón dispone de dos canales paralelos donde se co-cultivaron células epiteliales bronquiales, fibroblastos, células endoteliales pulmonares, células inmunitarias y las células tumorales NSCLC. Los canales de vacío situados a los laterales permitieron reproducir los movimientos cíclicos respiratorios. En el sistema BBB, situado en el sentido de flujo desde el pulmón en *chip*, la cámara circular que simula el parénquima cerebral se rodea de dos canales vasculares, donde se reprodujo la estructura de la barrera hematoencefálica cultivando **células endoteliales microvasculares de cerebro humano y astrocitos**. Uno de esos canales contacta con el modelo de pulmón para permitir el acceso de las células tumorales, consiguiendo por

tanto una plataforma microfluídica que permite recapitular todo el proceso de metástasis cerebral.

Los modelos propuestos por los grupos de Lai⁵⁴ y Mao⁵⁵, se centran en desarrollar **sistemas vasculares biomiméticos** donde se puedan perfundir y monitorizar diferentes tejidos en paralelo. El sistema **InVADE** (*integrated vasculature for assessing dynamic events*)⁵⁴, consiste en una placa multipocillos donde se construye un andamio vascular incluido en cada una de las cámaras que reproducen el parénquima tisular de diferentes órganos, creando una interfaz vascular continua (Figura 14H). Aplicado al estudio de la metástasis, los autores consiguieron recapitular la invasión vascular de células tumorales de cáncer de mama y probar la importancia del **metabolismo hepático** en el efecto de fármacos quimioterápicos, conectando en serie el modelo de tumor con la cámara tisular hepática. Por su parte, el modelo de **Human-on-Leaf-Chip**⁵⁵ consiste en una capa de PDMS donde se dispone la red vascular y seis cámaras tisulares (Figura 14I), sellada entre dos láminas de polimetilmetacrilato (PMMA). En este caso, los autores lo aplican en el estudio de la metástasis órgano-específica del cáncer de páncreas, recreando el entorno vascularizado del hígado y del hueso en las dos mitades de la estructura del *chip*.

Como se ha mostrado en este apartado, el desarrollo de **modelos organotípicos tridimensionales** capaces de recapitular **microentornos específicos**, es especialmente relevante para entender los mecanismos que subyacen a la diseminación de las células tumorales y la colonización en la metástasis.

4.6. Aplicación de la tecnología microfluídica en el aislamiento de las CTCs

Las **células tumorales circulantes** pueden ser utilizadas como **biomarcadores** en las **biopsias líquidas**, aislándolas de las muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer para su posterior caracterización. En la medida en que las CTCs no sólo son liberadas por la enfermedad primaria, sino también por el tumor metastásico, pueden aportar mucha información sobre la **progresión** del cáncer^{56,57}, lo que le otorga a este marcador un importante **valor pronóstico** en clínica. Por otro lado, el análisis de la **heterogeneidad celular** mediante estudios moleculares permitiría monitorizar la respuesta de los pacientes a los tratamientos y detectar la aparición de fenotipos **farmacorresistentes**⁵⁶.

Sin embargo, este tipo de análisis aún no se ha trasladado a la práctica clínica habitual. Se requieren tecnologías que permitan aislar estas células tumorales de la sangre con una **alta eficiencia y selectividad**, pues la proporción en la que se encuentran en las muestras es muy baja y se pueden perder en el proceso con facilidad. En este campo, la **tecnología microfluídica** presenta un gran potencial en la medida en que permite reducir la cantidad de muestra que es necesario procesar, la cual puede ser manipulada de forma precisa a escala micrométrica. Aprovechando la flexibilidad que aporta esta tecnología, se han desarrollado multitud de dispositivos microfluídicos para el aislamiento de las CTCs, fundamentalmente a nivel de célula individual, pero también para el aislamiento de *clusters* celulares con gran potencial para la iniciación del tumor secundario⁵⁸. Las estrategias utilizadas suelen hacer uso de las **propiedades biológicas** que caracterizan a estas células o bien de las **propiedades físicas** que las diferencian de las células sanguíneas^{56,57}. Entre los métodos empleados, se distinguen aquellos **dependientes de marcaje**, basados en la expresión de antígenos en la superficie celular, que pueden ser detectados mediante el uso de **anticuerpos** generalmente, empleando técnicas de inmunocaptura o variantes de esta como la selección mediante inmunomagnetismo⁵⁹. También se están desarrollando **aptámeros y péptidos**^{56,57} que puedan reconocer moléculas en la superficie celular y con los que **funcionalizar** las plataformas microfluídicas. Pese a su alta especificidad, estos métodos están limitados por la presencia de marcadores específicos, lo que puede hacer que se pierdan subpoblaciones celulares. Por el contrario, los **métodos independientes de marcaje** se basan en las diferencias en propiedades como: **tamaño, densidad y rigidez celular** (a nivel de célula completa y/o del núcleo celular⁶⁰), así como **propiedades eléctricas**. Estos métodos hacen especial uso del establecimiento de flujo en las plataformas, y la aplicación de diferentes **fuerzas hidrodinámicas**⁶¹ para separar las CTCs de las células sanguíneas. Sin embargo, la selectividad es menor debido a que las células sanguíneas pueden compartir ciertas características físicas con las CTCs.

Dado que esta tecnología aún necesita mejoras para su aplicación en el análisis de biopsias líquidas, muchos diseños se centran en combinar diferentes métodos o llevar a cabo un proceso de separación en varias etapas para conseguir un mayor rendimiento en el aislamiento de las CTCs^{56,57}.

5. Retos actuales y perspectivas futuras

5.1. Aplicación de los modelos *MoC* en medicina personalizada

Como se ha expuesto a lo largo de la revisión, la tecnología microfluídica y, concretamente, los sistemas *organ-on-chip*, permiten diseñar modelos de cultivo tridimensionales en los que simular, a escala micrométrica, el propio contexto en el que el tumor crece y evoluciona, ejerciendo un control preciso e independiente sobre los diferentes parámetros que definen el **entorno tumoral**. Esto, unido a la posibilidad de generar modelos donde se establezca la conexión entre diferentes tejidos u órganos⁵⁴⁻⁵⁵, hace de los sistemas de *cancer-on-chip* o *metastasis-on-chip* una herramienta idónea para la aplicación en **teragnosis**.

La utilización de células extraídas de pacientes para la producción de sistemas *MoC* (haciendo uso, por ejemplo, de las tecnologías de **iPSCs**), permitiría obtener modelos con un mayor **poder predictivo**, para aplicarlos en **medicina de precisión**. El objetivo es generar dispositivos *patient-on-a-chip*⁵⁰, con potencial para determinar cuál es la **estrategia terapéutica** que será más efectiva en el paciente y optimizar así el tratamiento, e incluso determinar el **potencial metastásico** del tumor y el **tropismo** por otros órganos, con la finalidad de agilizar la diagnosis y emitir un pronóstico mejor informado. Concretamente, dentro de la **medicina personalizada**, un área que está cobrando especial interés es el desarrollo de plataformas para el diagnóstico en el punto de atención (**Point-of-care, POC**)^{5,40}. Estos sistemas permitirían realizar un **diagnóstico molecular temprano** del paciente, así como reducir los costos derivados de la atención médica.

En este sentido, los modelos *MoC* desarrollados para el diagnóstico en el punto de atención, deben ser capaces de reproducir la **heterogeneidad tumoral** que caracteriza a cada paciente, sin alcanzar una elevada complejidad para que sean fáciles de manipular y relevantes desde el punto de vista clínico⁵ a la hora de interpretar los resultados.

5.2. Oportunidades de mercado: limitaciones y direcciones futuras

Aunque la tecnología microfluídica tiene por delante un futuro prometedor en áreas como la **industria farmacéutica** o la **medicina de precisión**, aún quedan algunos

retos por abordar para que los sistemas *organ-on-chip* se produzcan a gran escala o se puedan incorporar en el mercado como **herramienta diagnóstica**. Esto se debe por un lado, a aspectos técnicos de su fabricación y a los materiales empleados. La gran mayoría de los dispositivos mostrados, están hechos de **polidimetilsiloxano** (PDMS) utilizando técnicas de fabricación de microsistemas como la fotolitografía y la litografía suave. Sin embargo, aunque el PDMS es un material con buenas **propiedades ópticas** y **biocompatible**¹¹, presenta ciertos inconvenientes como la absorción inespecífica de ciertos fármacos^{11,25,54}, y las técnicas utilizadas en la fabricación de estos dispositivos no son aptas para la producción en masa. Por ello, cada vez más se contempla el uso de **materiales termoplásticos**²⁵ (poliestireno, copolímero de olefina cíclica,...), además de otros métodos más avanzados de fabricación como la **impresión 3D**^{12,40}, la cual permitiría crear sistemas más complejos donde las células se organicen en **andamios tridimensionales**⁴⁰ capaces de capturar la heterogeneidad del TME y reproducir la arquitectura del tejido. Igualmente, esta tecnología presenta obstáculos en su implementación, como la necesidad de desarrollar nuevos **biomateriales** adecuados para la generación de las estructuras tisulares.

Por otro lado, se debe contemplar la producción de modelos más **robustos**, **automatizados**, y compatibles con las tecnologías existentes en laboratorios de biología tradicionales, para lo que es necesario profundizar en estrategias de estandarización de estos sistemas. En este sentido, el diseño de **“plug-and-play”**³⁴ donde el dispositivo presenta una estructura modular, puede suponer una buena aproximación para la estandarización y generación de dispositivos fáciles de emplear, pudiendo recapitular diferentes eventos de la metástasis y realizar diferentes ensayos, sin cambiar la configuración del sistema de perfusión y evitando la formación de burbujas, uno de los problemas habituales en la manipulación de *chips*.

Finalmente, y dentro de las dificultades encontradas en investigación, destaca la falta de **sistemas de referencia** con los que poder comparar los resultados¹². En este contexto, y dentro de los estudios revisados, muchos grupos emplean los sistemas *transwell* o comparan los resultados obtenidos con aquellos observados en modelos animales, para analizar si el comportamiento celular monitorizado en los dispositivos se corresponde al dado en estos ensayos. Aun así, con vistas a su aplicación en clínica, es necesario profundizar en la búsqueda de estrategias para la **validación** de los modelos

microfluídicos, que permitan demostrar que son capaces de reproducir la **patofisiología** del tumor nativo o la respuesta a fármacos, de la misma forma que se observa *in vivo*.

6. Conclusiones

En este trabajo se ha llevado a cabo una **revisión** de la literatura más reciente acerca de **modelos microfluídicos** empleados en el estudio de la **metástasis en cáncer**. Los estudios abordados (resumidos en la Tabla 2, Anexo I) ponen de manifiesto la **flexibilidad** que ofrece esta tecnología y, concretamente, los sistemas de **metastasis-on-chip (MoC)**, a la hora de recapitular el **microentorno tumoral** y la **diseminación** de las células cancerosas. De esta forma, se puede concluir que:

- Los modelos *MoC* ofrecen una **visión dinámica** de la forma en la que el tumor evoluciona y se disemina en la metástasis, pudiendo abordar los diferentes eventos de la cascada metastásica, desde la migración e invasión local hasta la formación del nicho pre-metastásico y la colonización del órganos secundario.

- Uno de los aspectos fundamentales en la simulación del TME, es la incorporación de **matrices extracelulares tridimensionales**, capaces de recapitular la organización espacial de las células tumorales y entornos órgano-específicos.

- El estudio de la metástasis requiere de un enfoque **multicelular**, donde se reproduzca la **comunicación bidireccional** entre las células tumorales y otros tipos celulares, fundamentalmente **fibroblastos (CAFs)** y **células endoteliales**.

- La aplicación y control del **flujo** en las plataformas microfluídicas permite analizar el efecto a nivel celular del **estrés cortante** inducido por el mismo, así como recrear una **vasculatura funcional**.

- Con respecto a la vasculatura, los **modelos organotípicos** que reproducen la **geometría tubular** de los vasos, se aproximan en mayor medida a la fisiología del entorno *in vivo*, en comparación con aquellos basados en el cultivo de una monocapa de células endoteliales.

- La compatibilidad de los sistemas con **técnicas de imagen** (microscopía de fluorescencia, confocal, campo claro, etc.), permite la monitorización de los eventos celulares que tienen lugar en el contexto del órgano o tejido simulado, **a tiempo real** y con una **elevada resolución**.

-La incorporación de **células extraídas de pacientes** permitiría generar modelos *MoC* con un gran **poder predictivo** y potencial aplicación en **medicina personalizada**.

De esta forma, y pese a las limitaciones que se han descrito con respecto al diseño y la producción de los modelos *MoC*, el avance que está experimentando la tecnología *organ-on-chip* es innegable, y su aplicación dentro del estudio del cáncer ha permitido abordar aspectos de la mecánica y la biología de la metástasis que los ensayos convencionales no habían sido capaces de trasladar.

Conclusions

The present review discusses different microfluidic devices developed to study **cancer metastasis**. The models addressed in this project (summarized in Table 2, Annex I) shows the **flexibility** of this technology, especially ***metastasis-on-chip* systems**, to recapitulate **tumor microenvironment** and **tumor dissemination**. It can be concluded that:

- *Metastasis-on-chip models (MOC)* offer a **dynamic view** of tumor growth and metastasis. These systems are able to address the different events of metastatic cascade, from migration and local invasion to the formation of pre-metastatic niches and colonization of secondary organs.

- One fundamental aspect in modelling tumor microenvironment is the introduction of **three-dimensional extracellular matrices** to reproduce the organization of tumor cells and the specific organ and tissue environment.

- The study of metastasis requires a **multicellular approach** to reproduce the **bidirectional crosstalk** between tumor cells and other cell types, such as **fibroblasts** (CAFs) and **endothelial cells**.

- Microfluidic *chips* have the ability to control **fluid flow** in order to analyze the effect of **shear stress** on cells and recreate a **functional vasculature**.

- Organotypic models** that reproduce the **geometry** of blood vessels recapitulate more closely the physiology of *in vivo* microenvironment compared to those based on a monolayer of endothelial cells.

-Optical properties of microfluidic chips allows to monitor cellular events with **advanced image techniques** (bright-field, fluorescence, and confocal microscopy, etc.) in **real-time** and with a **high resolution**.

-**Cells from cancer patient** could be used in order to generate *MoC* models with high **predictive power** and future applications in **precision medicine**.

Therefore, and despite the limitations described above related to technical aspects of microfluidic models, organ-on-a-chip technology is growing and the application of microfluidic models in cancer has allowed to recapitulate important mechanical and biological aspects of cancer metastasis, that conventional models cannot reproduce.

7. Bibliografía

1. Las cifras del cáncer en España 2020. Soc Española Oncol Médica [Internet]. 2020;1. Available from: <https://seom.org/dmccancer/cifras-del-cancer/>
2. Cifras del cancer en España 2021. Soc Española Oncol Médica [Internet]. 2021. 1–40 p. Available from: www.seom.org.
3. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2020. Red Española Regist Cáncer. 2020;1–21. Available from: <https://www.redecan.es>
4. Xu H, Liu X, Le W. Recent advances in microfluidic models for cancer metastasis research. Trends Anal Chem. 2018;105:1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.007>.
5. Caballero D, Kaushik S, Correló VM, Oliveira JM, Reis RL, Kundu SC. Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: From chip to the patient. Biomaterials.2017;149:98–115. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.005>.
6. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature. 2016;529(7586):298–306. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature17038>.
7. Xu X, Jiang Z, Wang J, Ren Y, Wu A. Microfluidic applications on circulating tumor cell isolation and biomimicking of cancer metastasis. Electrophoresis. 2020;41(10–11):933–51. Available from: <https://doi.org/10.1002/elps.201900402>.
8. Lin Z, Luo G, Du W, Kong T, Liu C, Liu Z. Recent Advances in Microfluidic Platforms Applied in Cancer Metastasis: Circulating Tumor Cells' (CTCs) Isolation and Tumor-On-A-Chip. Small. 2020;16(9):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1002/sml.201903899>.
9. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. Front Bioeng Biotechnol. 2016;4(FEB). Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>.
10. Morton JJ, Bird G, Refaeli Y, Jimeno A. Humanized Mouse Xenograft Models: Narrowing the Tumor-Microenvironment Gap. Cancer Res. 2016;76(21):6153-6158. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1260>.
11. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. Nat Biotechnol. 2014;32(8):760–72. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>.
12. Peela N, Truong D, Saini H, Chu H, Mashaghi S, Ham SL, et al. Advanced biomaterials and microengineering technologies to recapitulate the stepwise process of cancer

- metastasis. Vol. 133, Biomaterials. Elsevier Ltd; 2017. p. 176–207. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.017>.
13. Sleeboom JJF, Amirabadi HE, Nair P, Sahlgren CM, Den Toonder JMJ. Metastasis in context: Modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. Vol. 11, DMM Disease Models and Mechanisms. Company of Biologists Ltd; 2018. Available from: <https://doi.org/10.1242/dmm.033100>.
 14. Um E, Oh JM, Granick S, Cho Y-KK. Cell migration in microengineered tumor environments. Lab Chip. 2017 Dec 21;17(24):4171–85. Available from: <https://doi.org/10.1039/C7LC00555E>.
 15. Wu J, Kumar-Kanojia A, Hombach-Klonisch S, Klonisch T, Lin F. A radial microfluidic platform for higher throughput chemotaxis studies with individual gradient control. Lab Chip. 2018;18(24):3855–64. Available from: <https://doi.org/10.1039/C8LC00981C>.
 16. Goh A, Yeh C-C, Lei KF. Visualization and Quantification of 3D Tumor Cell Migration under Extracellular Stimulation. ACS Appl Bio Mater. 2020 Mar;3(3):1506–13. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01134>.
 17. Xia J-L, Fan W-J, Zheng F-M, Zhang W-W, Xie J-J, Yang M-Y, et al. Inhibition of AURKA kinase activity suppresses collective invasion in a microfluidic cell culture platform. Sci Rep. 2017 Jun;7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02623-1>.
 18. Peela N, Barrientos ES, Truong D, Mouneimne G, Nikkhah M. Effect of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on breast cancer cells within a tumor-stroma microfluidic model. Integr Biol (United Kingdom). 2017 Dec 1;9(12):988–99. Available from: <https://doi.org/10.1039/c7ib00180k>.
 19. Anguiano M, Castilla C, Maška M, Ederra C, Peláez R, Morales X, et al. Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis. PLoS One. 2017 Feb 1;12(2). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171417>.
 20. Huang YL, Shiau C, Wu C, Segall JE, Wu M. The architecture of co-culture spheroids regulates tumor invasion within a 3D extracellular matrix. Biophys Rev Lett. 2020 Sep 9;15(3):131–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33033500>.
 21. Huang, Y.L., et al., Interstitial flows promote amoeboid over mesenchymal motility of breast cancer cells revealed by a three dimensional microfluidic model. Integr Biol (Camb), 2015. 7(11): p. 1402–11. Available from: <https://doi.org/10.1039/c5ib00115c>.
 22. Mina SG, Wang W, Cao Q, Huang P, Murray BT, Mahler GJ. Shear stress magnitude and transforming growth factor- β 1 regulate endothelial to mesenchymal transformation

- in a three-dimensional culture microfluidic device. *RSC Adv.* 2016;6(88):85457–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA16607E>.
23. Mina SG, Huang P, Murray BT, Mahler GJ. The role of shear stress and altered tissue properties on endothelial to mesenchymal transformation and tumor-endothelial cell interaction. *Biomicrofluidics.* 2017 Jul 1;11(4):044104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28798857>.
 24. Tran QD, Marcos, Gonzalez-Rodriguez D. Permeability and viscoelastic fracture of a model tumor under interstitial flow. *Soft Matter.* 2018;14(30):6386–92. Available from: <https://doi.org/10.1039/C8SM00844B>.
 25. Wang X, Sun Q, Pei J. Microfluidic-Based 3D Engineered Microvascular Networks and Their Applications in Vascularized Microtumor Models. *MICROMACHINES.* 2018 Sep 27;9(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30424426>.
 26. Nagaraju S, Truong D, Mouneimne G, Nikkhah M. Microfluidic Tumor-Vascular Model to Study Breast Cancer Cell Invasion and Intravasation. *Adv Healthc Mater.* 2018 May 9;7(9). Available from: <https://doi.org/10.1002/adhm.201701257>.
 27. Tang Y, Soroush F, Sheffield JB, Wang B, Prabhakarpandian B, Kiani MF. A Biomimetic Microfluidic Tumor Microenvironment Platform Mimicking the EPR Effect for Rapid Screening of Drug Delivery Systems. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09815-9>.
 28. Kwak TJ, Lee E. In vitro modeling of solid tumor interactions with perfused blood vessels. *Sci Rep.* 2020 Nov 1;10(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77180-1>.
 29. Cui X, Guo W, Sun Y, Sun B, Hu S, Sun D, et al. A microfluidic device for isolation and characterization of transendothelial migrating cancer cells. *Biomicrofluidics.* 2017;11(1). Available from: <https://doi.org/10.1063/1.4974012>.
 30. Chen MB, Whisler JA, Froese J, Yu C, Shin Y, Kamm RD. On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics. *Nat Protoc.* 2017 May;12(5):865–80. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.018>.
 31. Song J, Miermont A, Lim CT, Kamm RD. A 3D microvascular network model to study the impact of hypoxia on the extravasation potential of breast cell lines. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36381-5>.
 32. Blaha L, Zhang C, Cabodi M, Wong JY. A microfluidic platform for modeling metastatic cancer cell matrix invasion. *Biofabrication.* 2017 Sep 1;9(4). doi: [10.1088/1758-5090/aa869d](https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa869d).

33. Humayun M, Ayuso JM, Brenneke RA, Virumbrales-Muñoz M, Lugo-Cintrón K, Kerr S, et al. Elucidating cancer-vascular paracrine signaling using a human organotypic breast cancer cell extravasation model. *Biomaterials*. 2021 Mar 1;270. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120640>.
34. Ni B-SS, Tzao C, Huang J-HH. Plug-and-Play In Vitro Metastasis System toward Recapitulating the Metastatic Cascade. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54711-z>.
35. Mollica H, Palomba R, Primavera R, Decuzzi P. Two-Channel Compartmentalized Microfluidic Chip for Real-Time Monitoring of the Metastatic Cascade. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019 Sep;5(9):4834–43. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00697>.
36. Greenlee JD, King MR. Engineered fluidic systems to understand lymphatic cancer metastasis. *Biomicrofluidics*. 2020;14(1). Available from: <https://doi.org/10.1063/1.5133970>.
37. Cho H-Y, Choi J-HJ-WJ-HJ-WJ-H, Kim K-J, Shin M, Choi J-HJ-WJ-HJ-WJ-H. Microfluidic System to Analyze the Effects of Interleukin 6 on Lymphatic Breast Cancer Metastasis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Feb 15;8:611802. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33659239>.
38. Gong MM, Lugo-Cintrón KM, White BR, Kerr SC, Harari PM, Beebe DJ. Human organotypic lymphatic vessel model elucidates microenvironment-dependent signaling and barrier function. *Biomaterials*. 2019;214(May). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119225>.
39. Guo Z, Song J, Hao J, Zhao H, Du X, Li E, et al. M2 macrophages promote NSCLC metastasis by upregulating CRYAB. *Cell Death Dis*. 2019 Jun 1;10(6). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1618-x>.
40. Ruzyczka M, Cimpan MR, Rios-Mondragon I, Grudzinski IP. Microfluidics for studying metastatic patterns of lung cancer. *J Nanobiotechnology*. 2019 May 27;17(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0492-0>.
41. Mi S, Liu Z, Du Z, Yi X, Sun W. Three-dimensional microfluidic tumor–macrophage system for breast cancer cell invasion. *Biotechnol Bioeng*. 2019 Jul 1;116(7):1731–41. Available from: <https://doi.org/10.1002/bit.26961>.
42. Boussommier-Calleja A, Atiyas Y, Haase K, Headley M, Lewis C, Kamm RD. The effects of monocytes on tumor cell extravasation in a 3D vascularized microfluidic model. *Biomaterials*. 2019 Apr 1;198(SI):180–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.005>.

43. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989 Aug;8(2):98-101. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0).
44. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, et al. Pre-metastatic niches: Organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(5):302–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.6>.
45. J. Ewing, *Neoplastic Diseases: a Treatise on Tumors*, WB Saunders Company, 1922. Available from: <https://doi.org/10.1002/bjs.1800166126>.
46. Kwak TJ, Lee E. Rapid multilayer microfabrication for modeling organotropic metastasis in breast cancer. *Biofabrication.* 2020;13(1). Doi: [10.1088/1758-5090/abbd28](https://doi.org/10.1088/1758-5090/abbd28).
47. Hao S, Ha L, Cheng G, Wan Y, Xia Y, Sosnoski DM, et al. A Spontaneous 3D Bone-On-a-Chip for Bone Metastasis Study of Breast Cancer Cells. *Small.* 2018;14(12). Available from: <https://doi.org/10.1002/sml.201702787>.
48. Ahn J, Lim J, Jusoh N, Lee J, Park T-E, Kim Y, et al. 3D Microfluidic Bone Tumor Microenvironment Comprised of Hydroxyapatite/Fibrin Composite. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Jul;7(JUL):168. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31380359>.
49. Sharifi F, Yesil-Celiktas O, Kazan A, Maharjan S, Saghezadeh S, Firoozbakhsh K, et al. A hepatocellular carcinoma–bone metastasis-on-a-chip model for studying thymoquinone-loaded anticancer nanoparticles. *Bio-Design Manuf.* 2020;3(3):189–202. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42242-020-00074-8>.
50. Graney PL, Tavakol DN, Chramiec A, Ronaldson-Bouchard K, Vunjak-Novakovic G. Engineered models of tumor metastasis with immune cell contributions. *iScience.* 2021;24(3). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102179>.
51. Kim J, Lee C, Kim I, Ro J, Kim J, Min Y, et al. Three-dimensional human liver-chip emulating premetastatic niche formation by breast cancer-derived extracellular vesicles. *ACS Nano.* 2020;14(11):14971–88. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04778>.
52. Tian H, Pang J, Qin K, Yuan W, Kong J, Ma H, et al. A Novel Tissue-Based Liver–Kidney-on-a-Chip Can Mimic Liver Tropism of Extracellular Vesicles Derived from Breast Cancer Cells. *Biotechnol J.* 2020;15(2). Available from: <https://doi.org/10.1002/biot.201900107>.
53. Liu W, Song J, Du X, Zhou Y, Li Y, Li R, et al. AKR1B10 (Aldo-keto reductase family 1 B10) promotes brain metastasis of lung cancer cells in a multi-organ microfluidic chip model.

- Acta Biomater. 2019;91:195–208. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.053>.
54. Lai BFL, Huyer LD, Lu RXZ, Drecun S, Radisic M, Zhang B. InVADE: Integrated Vasculature for Assessing Dynamic Events. *Adv Funct Mater.* 2017;27(46). Available from: <https://doi.org/10.1002/adfm.201703524>.
 55. Mao M, Bei HP, Lam CH, Chen P, Wang S, Chen Y, et al. Human-on-Leaf-Chip: A Biomimetic Vascular System Integrated with Chamber-Specific Organs. *SMALL.* 2020 Jun;16(22). Available from: <https://doi.org/10.1002/smll.202000546>.
 56. Pei H, Li L, Han Z, Wang Y, Tang B. Recent advances in microfluidic technologies for circulating tumor cells: enrichment, single-cell analysis, and liquid biopsy for clinical applications. *Lab Chip.* 2020 Nov;20(21):3854–75. Available from: <https://doi.org/10.1039/D0LC00577K>.
 57. Xu X, Jiang Z, Wang J, Ren Y, Wu A. Microfluidic applications on circulating tumor cell isolation and biomimicking of cancer metastasis. *Electrophoresis.* 2020 Jun 1;41(10–11):933–51. Available from: <https://doi.org/10.1002/elps.201900402>.
 58. Shaner SW, Allen JK, Felderman M, Pasko ET, Wimer CD, Cosford NDP, et al. Design and production of a novel microfluidic device for the capture and isolation of circulating tumor cell clusters. *AIP Adv.* 2019 Jun;9(6). Available from: <https://doi.org/10.1063/1.5084736>.
 59. Kwak B, Lee J, Lee D, Lee K, Kwon O, Kang S, et al. Selective isolation of magnetic nanoparticle-mediated heterogeneity subpopulation of circulating tumor cells using magnetic gradient based microfluidic system. *Biosens Bioelectron.* 2017;88:153–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.002>.
 60. Xia Y, Wan Y, Hao S, Nisic M, Harouaka RA, Chen Y, et al. Nucleus of Circulating Tumor Cell Determines Its Translocation Through Biomimetic Microconstrictions and Its Physical Enrichment by Microfiltration. *SMALL.* 2018 Nov;14(44). Available from: <https://doi.org/10.1002/smll.201802899>.
 61. Wan S, Kim TH, Smith KJ, Delaney R, Park G-S, Guo H, et al. New Labyrinth Microfluidic Device Detects Circulating Tumor Cells Expressing Cancer Stem Cell Marker and Circulating Tumor Microemboli in Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2019;9(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54960-y>.

ANEXO I.

Tabla 2. Resumen de los dispositivos microfluídicos expuestos en la revisión

REFERENCIAS	LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS	CARACTERÍSTICAS DEL DISPOSITIVO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	EVENTO DE LA CASCADA METÁSTASIS
Wu et al., 2018 [15]	MDA-MB-231, MCF7 (líneas celulares de cáncer de mama)	-Dispositivo de estructura radial para la realización en paralelo de ensayos de quimiotaxis , bajo el establecimiento de gradientes bioquímicos .	Migración
Goh et al., 2020 [16]	HeLa (cáncer cervical) y fibroblastos asociados a cáncer (CAFs)	-Placa microfluídica de 96 pocillos conectados por microcanales para ensayos de migración 3D bajo estímulos extracelulares : gradiente de nutrientes, citoquinas y co-cultivo con CAFs.	Migración e invasión
Xia et al., 2017 [17]	MDA-MB-231, MCF10A (línea celular de epitelio mamario), A549 (línea celular de cáncer de pulmón), AGS (línea celular de cáncer gástrico)	-Dispositivo con cámara central conectada a dos canales laterales. El Matrigel introducido en la cámara central simula el compartimento estromal . -Aplicado en el estudio de la invasión colectiva bajo el establecimiento de un gradiente de suero.	Migración e invasión
Peela et al., 2017 [18]	SUM159 (línea celular de cáncer de mama) y CAFs	-Plataforma microfluídica de estructura compartimentalizada : región tumoral, estroma y canales de medio. -Reproducción de la interacción tumor-estroma para ensayos con fármacos antineoplásicos.	Migración e invasión
Anguiano et al., 2017 [19]	H1299 (línea celular de cáncer de pulmón)	-Creación de un entorno tridimensional mediante la generación de matrices con diferente proporción Matrigel:colágeno en la cámara central. -Estudio de la dinámica de migración en matrices con diferentes estructuras.	Migración e invasión
Huang et al., 2020 [20]	MDA-MB-231 y MCF10A	-Dispositivo constituido por tres canales paralelos donde se introducen esferoides en matrices tridimensionales de colágeno, para estudiar la influencia de la arquitectura en la invasión tumoral.	Migración e invasión
Mina et al., 2017 [23]	MDA-MB-231 y células HUVECs (células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano)	-Modelo constituido por una cámara central y un microcanal superior. -El sistema se conecta a un reservorio y a una bomba peristáltica, para el establecimiento de patrones de flujo. -Estudio del efecto de la tensión cortante y las propiedades de la matriz en el comportamiento de las células endoteliales y la migración de las células tumorales.	Migración e invasión
Tran et al., 2018 [24]	MCF7	- Dispositivo con una cámara de cultivo y un canal paralelo de drenaje. -Simulación del flujo intersticial mediante el establecimiento de un gradiente de presiones entre el canal de entrada y salida. -Análisis del efecto de la presión intratumoral en el desprendimiento y diseminación de las células tumorales.	Diseminación y migración de las células tumorales
Nagaraju et al., 2018 [26]	MDA-MB-231, MCF7, HUVECs	-Dispositivo microfluídico dividido en compartimentos independientes correspondientes al tumor, al estroma y a la región vascular, además de los canales donde se introduce el medio. -Estudio de la comunicación bidireccional entre el endotelio vascular y las células cancerosas, y su influencia en la invasión e intravasación tumoral.	Invasión e intravasación
Tang et al., 2017 [27]	MDA-MB-231, MCF7 y HBTAEC (células endoteliales humanas asociadas a tumor mamario)	-Dispositivo microfluídico biomimético donde se reproduce la estructura tubular de la microvasculatura mediante el revestimiento de los canales prefabricados en el chip. -Establecimiento del flujo en el compartimento vascular con una bomba de jeringa programable. -Análisis del efecto de células tumorales con diferente capacidad invasiva en la permeabilidad vascular (efecto EPR).	Interacción entre el endotelio y el tumor
Kwak et al., 2020 [28]	MDA-MB-231, MSC (células madre mesenquimales), HLFs (fibroblastos de pulmón humano) y HUVECs	-Plataforma microfluídica que dispone de una estructura extraíble, para reproducir la geometría del vaso sanguíneo. -Cultivo de esferoides embebidos en matrices tridimensionales. -Aplicación de flujo laminar mediante la colocación de los chips en plataformas rockers.	Intravasación y angiogénesis tumoral

		-Simulación <i>in vitro</i> de la fisiología de los tumores sólidos vascularizados .	
Cui et al., 2017 [29]	MDA-MB-231 y células primarias de endotelio vascular humano	<p>- Dispositivo con dos cámaras de flujo separadas por una membrana porosa.</p> <p>-La cámara inferior dispone de microcámaras independientes para el aislamiento de las células.</p> <p>-Recolección y caracterización de las células tumorales que han migrado a través del endotelio, sometidas a estrés cortante provocado por el flujo.</p>	Migración transendotelial
Chen et al., 2017 [30]	HUVECs y fibroblastos de pulmón humano (NHLFs)	<p>-Dispositivo microfluidico donde se produce una red microvascular funcional mediante la organización espontánea de células HUVECs en matriz de fibrina.</p> <p>-Aplicado en el seguimiento a tiempo real y cuantificación de los eventos de extravasación tumoral.</p>	Extravasación
Song et al., [31]	MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231, HUVECs, NHLFs	<p>-Dispositivo con tres cámaras de gel separadas por canales de medio, donde se reproduce la red microvascular.</p> <p>-Estudio del efecto de la hipoxia en el potencial de extravasación.</p>	Extravasación
Blaha et al., 2017 [32]	MDA-MB-231 y HUVECs	-Dispositivo con cinco microcanales, para el estudio de la invasión celular en matrices tridimensionales de colágeno mediada por la interacción con el endotelio vascular .	Invasión de la matriz en la extravasación
Humayun et al., 2021 [33]	MDA-MB-231, MCF7, Hs578T (línea celular de cáncer mamario) y células endoteliales derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC-EC)	<p>-Modelo organotípico vascularizado para el estudio de la extravasación en cáncer de mama.</p> <p>-En la cámara central se disponen tres lúmenes que simulan la estructura de los vasos, rodeados de ECM.</p> <p>-Estudio de la comunicación yuxtacrina y paracrina entre el tumor y la vasculatura, y que promueven la extravasación.</p>	Extravasación
Ni et al., 2019 [34]	A549 (células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano), HeLa, HPMECs (células pulmonares endoteliales microvasculares)	<p>-Dispositivo basado en el diseño de “plug and play”, donde se coloca un inserto en forma de “U” en el chip microfluídico.</p> <p>-Conexión del chip a una bomba peristáltica y a un reservorio de medio.</p> <p>-Dirigido a la simulación de la cascada metastásica.</p>	Migración, intravasación y diseminación tumoral
Mollica et al., 2019 [35]	MDA-MB-231, HUVECs	<p>-Chip microfluídico de doble canal, separados entre sí por una membrana basada en micropilares.</p> <p>-Conexión del canal vascular a una bomba de jeringa para los experimentos bajo aplicación de flujo.</p> <p>-Simulación de los eventos de la cascada metastásica.</p>	Migración, intravasación, extravasación e invasión
Cho et al., 2021 [37]	MDA-MB-231, MCF7, SKBR-3 (línea celular de cáncer de mama), HUVECs y HLECs (células endoteliales linfáticas humanas)	<p>-Dispositivo de tres canales compartimentalizado, que reproduce la interacción entre el vaso linfático, el tejido y el vaso sanguíneo (LTB chip).</p> <p>-Análisis del efecto de citoquinas inflamatorias en la metástasis linfógena del cáncer de mama, considerando la intercomunicación con el endotelio del vaso sanguíneo.</p>	Metástasis linfógena y angiogénesis tumoral
Gong et al., 2019 [38]	HLECs (células endoteliales linfáticas humanas), HUVECs, CAFs y fibroblastos normales mamarios (NFs)	<p>-Modelo organotípico de vaso linfático (μLYMPH)</p> <p>-Estudio de la comunicación bidireccional entre el vaso linfático y el microentorno tumoral simulado.</p>	Metástasis linfógena
Guo et al., 2019 [39]	A549 y NCI-H1975 (línea celular de carcinoma de pulmón no microcítico, NSCLC), THP-1 (línea celular monocítica humana)	<p>-Dispositivo microfluídico constituido por tres cámaras de cultivo, una cámara de secreción y un canal de migración.</p> <p>-Conexión de las cámaras a bombas de jeringa para el control del flujo.</p> <p>-Evaluación del efecto de los macrófagos asociados a tumor en la invasión celular.</p>	Migración e invasión
Mi et al., 2019 [41]	MDA-MB-231, MC10A, Monocitos humanos (U937), HUVECs	<p>-Dos canales de gel paralelos, en contacto cada uno de ellos con canales por donde se introduce el medio de cultivo y en los que se recrea la barrera vascular.</p> <p>-Análisis de la comunicación bidireccional entre los macrófagos y el tumor.</p>	Invasión
Boussommier- Calleja et al., 2019 [42]	MDA-MB-231, MDA-MB-435 (línea celular de melanoma), HUVECs, NHLF, monocitos	<p>-Plataforma con tres regiones de hidrogel separadas por canales de medio.</p> <p>-Creación de la red microvascular en la cámara central, donde se perfunden tanto las células tumorales como las células inmunitarias.</p> <p>-Estudio del efecto de los monocitos en la extravasación de las células tumorales.</p>	Extravasación

Kwak et al., 2020 [46]	MDA-MB-231, derivados de la línea parental con capacidad para metastatizar hueso y pulmón, hBM-MSCs (células <i>stem</i> mesenquimales derivadas de médula ósea humana), HLFs, osteoblastos	-Dispositivo en el que se recrea la estructura vascular tridimensional para simular la extravasación en entornos órgano específicos (organotropismo). -Establecimiento de flujo laminar intravascular utilizando la plataforma rockers. -Modelado del tropismo óseo y pulmonar del cáncer de mama.	Tropismo de la metástasis del cáncer de mama
Hao et al., 2018 [47]	MC3-T3 -E1 (línea celular murina precursora de osteoblastos), MDA-MB-231 y MDA-MB-231-BRMS1 (variante supresora de la metástasis)	-Sistema tridimensional de hueso en chip (3D Bone-on-a-chip), constituido por dos compartimentos separados por una membrana porosa. - Reproducción de la estructura de la matriz ósea aplicada en el estudio de la metástasis de hueso.	Metástasis ósea del cáncer de mama
Ahn et al., 2019 [48]	HUVECs, SW620 (línea celular de cáncer de colon), MKN74 (línea celular de cáncer gástrico), fibroblastos pulmonares.	-Dispositivo microfluídico con tres cámaras separadas entre sí por canales de medio, los cuales presentan en los extremos construcciones que actúan como reservorios. -Recreación del microentorno óseo usando matrices basadas en hidroxiapatita y fibrina .	Migración, invasión y angiogénesis en la metástasis ósea
Sharifi et al., 2020 [49]	HepG2 (carcinoma hepatocelular)	-Estructura formada por dos cámaras conectadas por un canal vascular, correspondientes al entorno del tumor primario (carcinoma hepatocelular) y al órgano diana (hueso). -Las dos capas del dispositivo de PDMS se separan mediante una membrana de tereftelato de polietileno (PET) para recrear la barrera vascular. -Conectado a una bomba peristáltica y a un reservorio. -Aplicado en el estudio de la metástasis ósea del carcinoma hepatocelular .	Metástasis ósea del carcinoma hepatocelular
Kim et al., 2020 [51]	THLE-2 (células epiteliales hepáticas), fibroblastos hepáticos (LFs), células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSECs), hepatocitos, MCF-7, MDA-MB-231, y MCF-10A	-Modelo basado en una cámara superior y una cámara inferior separadas por una membrana porosa de PDMS. -Conexión a una bomba de jeringa que establece el flujo para inducir el estrés cortante que se da de forma fisiológica en los sinusoides hepáticos. - Simulación del entorno hepático (human liver-on-a-chip) y efecto de las EVs derivadas de cáncer de mama en el acondicionamiento del nicho pre-metastásico .	Metástasis hepática del cáncer de mama y formación del nicho pre-metastásico
Tian et al., 2020 [52]	HUVECs, MCF-7, MDA-MB-231	-Dispositivo formado por dos cámaras de cultivo y dos canales de medio, lo cuales se unen en una entrada (<i>inlet</i>) y una salida (<i>outlet</i>) en los extremos. -Aplicación de flujo con una bomba de jeringa. -La simulación del entorno hepático y renal se realiza mediante el cultivo de cortes tisulares (liver-kidney-on-a-chip) -Estudio del tropismo de las vesículas extracelulares derivadas del cáncer de mama.	Metástasis hepática del cáncer de mama y formación del nicho pre-metastásico
Liu et al., 2019 [53]	HA-1800 (astrocitos humanos), células endoteliales microvasculares de cerebro humano (hBMVEC), PC9 (línea celular de cáncer de pulmón humano), 16HBE (células epiteliales bronquiales humanas), células endoteliales microvasculares pulmonares (hPMEC), fibroblastos pulmonares (HFL1), THP-1	-Dispositivo de diseño multiorgánico basado en la conexión de un sistema de pulmón en chip (lung-on-chip) a otro que simula la barrera hematoencefálica (blood-brain-barrer on chip). -Para simular la circulación sanguínea se utiliza una bomba de jeringa. -Reproducción de los eventos de la metástasis cerebral : intravasación, extravasación y colonización del órgano secundario.	Metástasis cerebral del cáncer de pulmón no microcítico
Lai et al., 2017 [54]	MDA-MB-231, HUVECs, HepG2, cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas (hPSC)	-Placa multipocillos con andamios vasculares que conectan las cámaras donde se reproduce el parénquima tisular de diferentes órganos (sistema InVADE) -Incorporación de electrodos y microcantilevers en la plataforma, para simular y monitorizar las contracciones musculares -Enfocado en la reproducción de la dinámica de interacción entre órganos .	Angiogénesis, extravasación y colonización
Mao et al., 2020 [55]	PANC-1 (cáncer de páncreas), células <i>stem</i> mesenquimales (MSC), HepG2, HUVECs.	- Sistema vascular biomimético donde se reproduce la estructura de la vasculatura utilizando como modelo la nervadura de la hoja (Human-on-leaf). -Recreación de entornos órgano específicos vascularizados en las cámaras tisulares incorporadas en el dispositivo.	Metástasis órgano específica del cáncer de páncreas

ANEXO II. TRABAJO EXPERIMENTAL REALIZADO:

Protocol for the generation of MDA-MB-231 spheroids

(Trabajo experimental previo a la decisión justificada de cambio del trabajo fin de máster hacia la modalidad de revisión bibliográfica)

Content

1. Introduction	66
2. Objectives	67
3. Abbreviations	67
4. Materials and methods.....	67
4.1. Task 1	67
4.1.1. Materials, equipment and participants needed	68
4.1.2 Methodology	69
4.1.3. Results	71
4.2. Task 2	72
4.2.1. Materials, equipment and participants needed	73
4.2.2. Methodology	73
4.2.3 Results	73
4.3. Task 3	76
4.3.1. Materials, equipment and participants needed	76
4.3.2. Methodology	77
4.3.3 Results	78
5. Conclusions	82
6. References	82

1. Introduction

In order to study tumor processes and develop new therapies, it is important to use a model that is able to recapitulate the characteristics of the tumor. Typically, anticancer compounds that show promising results in vitro and in animal models, have a weak efficacy in real patients because of the limitations of preclinical models¹. In the case of two-dimensional models, they lack the three dimensionality of the tumor and do not recapitulate the tumor microenvironment, characterized by a complex and heterogeneous structure, where there is an interaction between different cell types and of these with the extracellular matrix, which influences the way cancer cells behave and progress. On the other hand, in animal models the tumor environment is not human.

Nevertheless, three-dimensional cell culture systems can overcome some of these limitations, recapitulating avascular tumor areas, cell-cell and cell- extracellular matrix (ECM) interactions and allowing cancer cells to be cultured, either alone or in co-culture with other cell types¹. Within this type of cell culture, spheroids have been widely used to study different aspects of cancer biology. They generally have a spherical shape and three concentric zones of cell populations: an external zone of proliferating and migrating cells, a middle zone of quiescent cells and an internal zone of necrotic cells¹. The limited diffusion of oxygen and nutrients from the outside to the center of the spheroids define these zones in the 3D structure.

Spheroids can be used to study some complex processes that usually take place in cancer progression, like invasion and cancer metastasis. The first step in metastasis is the transformation of epithelial cells to a migrating and invasive phenotype, which is called epithelial to mesenchymal transition (EMT)².

There are different types of breast cancer and the most dangerous among them is the triple-negative breast cancer (TNBC). In this context, MDA-MB-231 is a triple-negative breast cancer cell line that show representative EMT associated with cancer progression² and can be used to study invasion and metastasis.

Protocols for spheroid formation are still inconsistent³, and not all protocols are useful for all cell lines. In the case of MDA-MB-231 spheroids there are no detailed

characterizations, and it is necessary to establish a standardized and reproducible protocol that can generate compact and tight spheroids of comparable size and structure³.

In these series of experiments, we try to find a protocol to generate reproducible MDA-MB-231 spheroids, using different techniques like hanging drop and liquid overlay with some additives such as Methocel and Matrigel to help MDA spheroids to form properly.

According to previous studies, it seems that the most suitable conditions include a higher number of cells per spheroid and extracellular matrix in order to get a three-dimensional structure.

2. Objectives

The purpose of the experiment is to establish a protocol that can be used in the generation of MDA-MB-231 spheroids, considering the experimental approaches consulted in the literature³⁻⁷.

- To evaluate spheroids using different spheroids generation techniques (hanging drop and liquid overlay).
- To test the spheroid formation with different cell numbers per spheroid.
- To use different additives: Methocel and Matrigel.

3. Abbreviations

- Triple-negative breast cancer (TNBC)
- Extracellular Matrix (ECM)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Phosphate buffered saline (PBS)
- Propidium iodide (PI)

4. Materials and methods

4.1. Task 1:

Generation of MDA-MB-231 spheroids using hanging drop technique and 20% Methocel. For comparison of cell number influence on generation of spheroids, different

numbers of cells (1000, 5000 and 10 000) were seeded in hanging drop (25µl) under the lid of cell culture plates (Figure 1) for two and three days until spheroids were plated on 96-well plates.

- Spheroids of 48h of formation at the bottom of the drops. 3 conditions and 8 spheroids per condition: 1000 cells/spheroid, 5000 cells/spheroid and 10 000 cells/spheroid.
- Spheroids of 72h of formation at the bottom of the drops. 3 conditions and 8 spheroids per condition: 1000 cells/spheroid, 5000 cells/spheroid and 10 000 cells/spheroid.

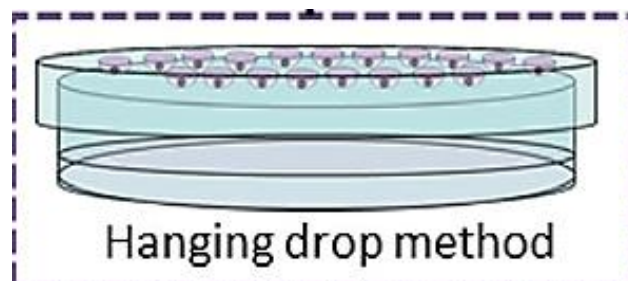


Figure 1. Hanging drop for spheroid generation. Cells were seeded under the lids of cell culture plates because lids are more hydrophobic and better able to hold a drop than the bottom of the dish. [3]

4.1.2. Materials, equipment and participants needed

- MDA-MB-231 cell line (TNBC)
- Cell Culture Flasks (T25)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose 4,5 g/l supplemented with: 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% Glutamine.
- Phosphate buffered saline (PBS)
- Trypsin-1 mM EDTA
- 15 ml / 50 ml falcons
- Glass Pasteur pipettes
- Tissue culture dishes to deposit the drops
- Methocel
- Anti-adherence rinsing solution (STEMCELL)
- 96-well plates (SARSTESDT)
- Propidium iodide (Stock concentration: 2mg/ml)
- Calcein (Stock concentration: 1mg/ml)

Equipment

- Micropipettes
- Multichannel pipette
- Centrifuge
- Laminar flow cabinet
- 37°C CO₂ incubator
- Neubauer chamber
- Nikon TI inverted microscope

Softwares

- Image J
- NIS-Elements Viewer

4.1.3. Methodology

1. Preparation of cell suspension

- Adherent cell culture should be grown to 80-90% confluence. Monolayers should be washed twice with PBS (use the same volume that have been used of medium). Add 2ml 0.05% trypsin-1 mM EDTA and incubate for 5 minutes until cell detach. Stop trypsinization by adding a volume of medium three times that of trypsin volume (6ml). Transfer cells to a 15 ml conical tube.
- Centrifuge at 1250 rpm (250-300 g), 5 minutes, 21°C. Discard supernatant and wash pellet with 1ml culture medium (or the necessary volume to facilitate cell counting and preparation of cell suspension).
- Count cells using a hemacytometer or Neubauer chamber. Calculate number of cells/ml:

$$\frac{\text{cells}}{\text{ml}} = \frac{\text{number of cells}}{\text{number of squares}} \times \text{Dilution factor} \times 10\,000$$

- Prepare a 15ml conical tube for each condition with the total volume needed to make the number of spheroids previously established. The composition should be: 80% medium and cells, 20 % Methocel.
- A total of 20 spheroids per dish were seeded on the lid of culture dishes.

2. Formation of hanging drops

- a. Remove the lid from the culture dish and place 5ml of PBS in the bottom of the dish to act as hydration chamber.
- b. Invert the lid and use a 200 μ l pipettor to deposit 25 μ l drops, placed sufficiently apart to not touch. Make sure to resuspend the solution before placing the drops.
- c. Invert the lid onto the PBS-filled bottom chamber and incubate at 37 $^{\circ}$ C.

3. Preparation of 96-well plates

- a. Add 200 μ l of the anti-adherent solution to each well.
- b. Retire the anti-adherent solution by aspiration using Pasteur Pipette and add 200 μ l PBS. Retire PBS by aspiration and add 100 μ l of medium.
- c. Prepare another plate to wash spheroids: first, in 200 μ l of PBS, and then transfer them to 200 μ l of medium.

4. Transfer spheroids to 96-well plates

- a. Check the drops on the lid using the microscope before selecting the spheroids you are going to use to make sure that you are selecting the ones which are formed correctly.
- b. Take spheroids from the lip of culture dishes with 20 μ l and wide orifice tips using a 200 μ l pipettor.
- c. Wash them twice (on PBS and medium, taking 100 μ l using 200 μ l pipettor and wide orifice tips) and transfer them into a total volume of 200 μ l to the plates treated with anti-adherent.
- d. Add 100-200 μ l PBS on the wells surrounding spheroids to avoid evaporation.

5. Notes

- a. Add 5 μ l medium at 48h to 72-hour formation spheroid drops.
- b. Change spheroids medium (100 μ l) every 72 hours after passing them to the 96-well plates. To change medium, place the tip on the edge of the well and aspirate very slowly to prevent spheroids from disintegrating.

Viability Assay

1. Prepare a solution of 1ml PBS with 6 μ l Propidium iodide and 4 μ l calcein.
2. Take spheroids using wide orifice tips.
3. Immerse spheroids in 200 μ l of the solution previously prepared.

Notes

1. Turn off the lights of the laminar flow cabinet to avoid photobleaching.
2. Stock concentrations of propidium iodide and calcein: 2mg/ml and 1mg/ml, respectively. Take it into account to prepare the necessary volume.

4.1.3. Results

Spheroids should be tight and compact structures, similar to *in vivo* tumors³. We monitored spheroids evolution for six days, starting on Day 0 when spheroids were transferred to 96-well plates. Following this protocol, we obtained flat aggregates (Figure 2).

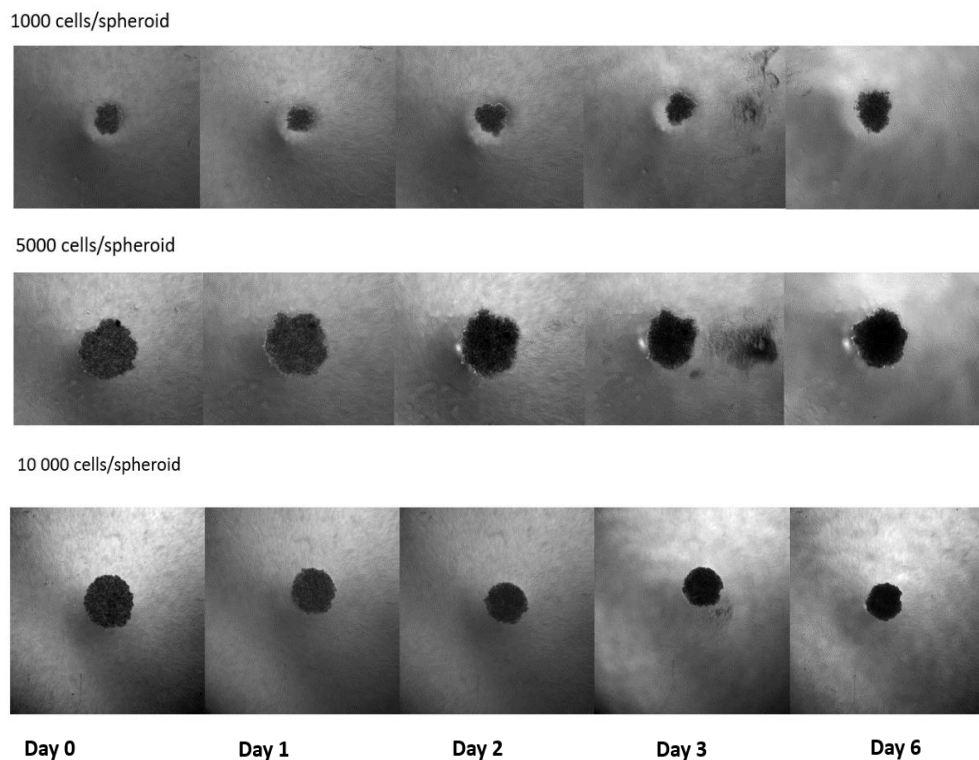


Figure 2. Spheroids with different number of cells (1000, 5000, 10 000 cells/spheroid) formed for 48h using hanging drop technique with 20% Methocel.

Spheroids of 10 000 cells formed during 72 hours in hanging drops were too adherent to the lid of culture plate and they get disintegrated when attempting to transfer them to the 96-well plate. It could be because the volume of the drops is too

small to allow spheroids to form for 72 hours because it could evaporate, especially if the spheroids that are forming into de drops have a higher number of cells. No other difference related to form and structure was observed.

The results of the viability test show areas of different proliferative capacity: there is an external zone of viable cells, which are positive for calcein and an internal zone where we can distinguish a necrotic core, because of the limited diffusion of oxygen and nutrients from the outside to the center (Figures 3, 4).

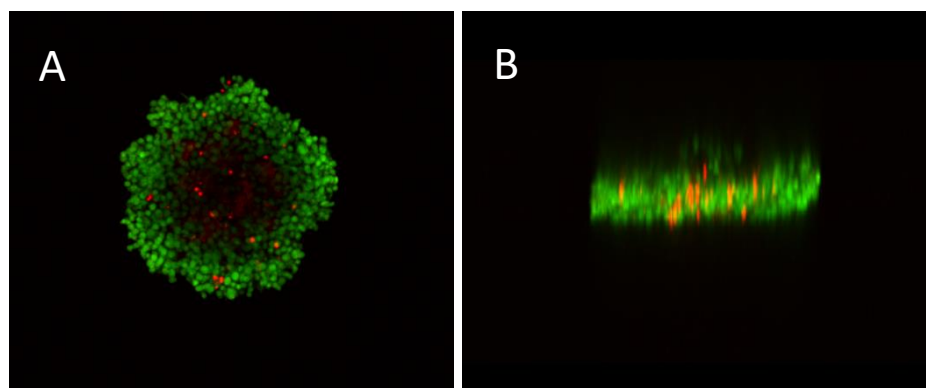


Figure 3. Viability assay with calcein and propidium iodide (PI) on day 8. Confocal microscopy using Nikon Ti, 10x. **A.** Spheroid of 48h of formation in hanging drop (1000 cells). There is an external zone of proliferating cells and an internal zone of necrotic cells, positive for PI. **B.** Frontal volume of the spheroid. There is no curvature because this protocol did not form three dimensional structures.

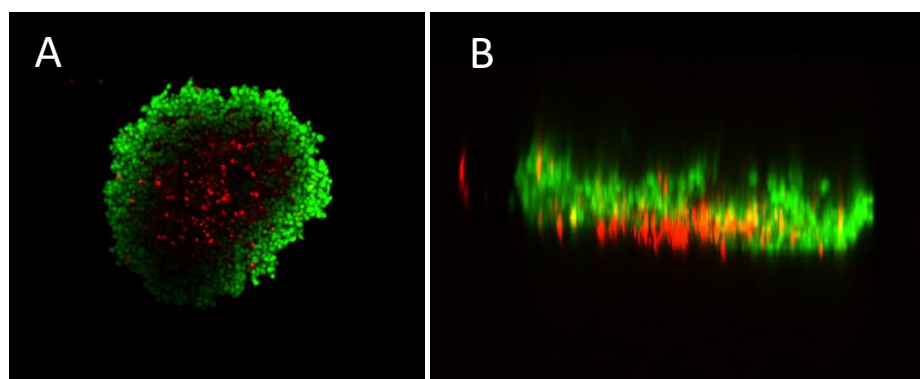


Figure 4. Viability assay with calcein and propidium iodide (PI) on day 8. Confocal microscopy using Nikon Ti, 10x. **A.** Spheroid of 48h of formation in hanging drop (5000 cells). There is an external zone of proliferating cells and an internal zone of necrotic cells, positive for PI. **B.** Frontal volume of the spheroid. There is no curvature.

4.2. Task 2:

Since spheroids generated by using Methocel were flat aggregates, Matrigel was added at some spheroids previously formed by hanging drop. 3 spheroids per condition (9 spheroids in total) were used to test the effect of adding extracellular matrix. 100 μ l

of medium containing 10% Matrigel was added (5% Matrigel in the total volume of the well, 200µl).

4.2.1. Materials, equipment and participants needed

- Matrigel (Stock concentration: 9mg/ml)

Softwares

- Image J
- NIS-Elements Viewer
- Las X Core

4.2.2. Methodology

1. Prepare solutions of Matrigel (10%)

- a. In this case, we prepared a total volume of 1000µl (900µl medium + 100µl Matrigel).
- b. 100µl of this solution was added to the well after removing 100µl of medium (total volume of the well 200 µl), obtaining a 5% Matrigel final solution per well.

Notes

- a. Keep Matrigel aliquots on ice to avoid polymerization.
- b. Prepare solution using cold medium.
- c. To change medium, place the tip on the edge of the well and aspirate very slowly.

Viability Assay

- Described in 4.1.2. methodology

4.2.3. Results

Spheroids to which Matrigel was added were compact and appeared to adopt a more regular and 3D structure. Therefore, Matrigel seems to be necessary to obtain MDA-MB-231 spheroids. In fact, Matrigel provides physiologically relevant environment and structural support for cells due to its composition (laminin, collagen IV, heparan sulfate proteoglycans, entactin and growth factors) and is generally used in 2D and 3D cell cultures as an extracellular matrix.

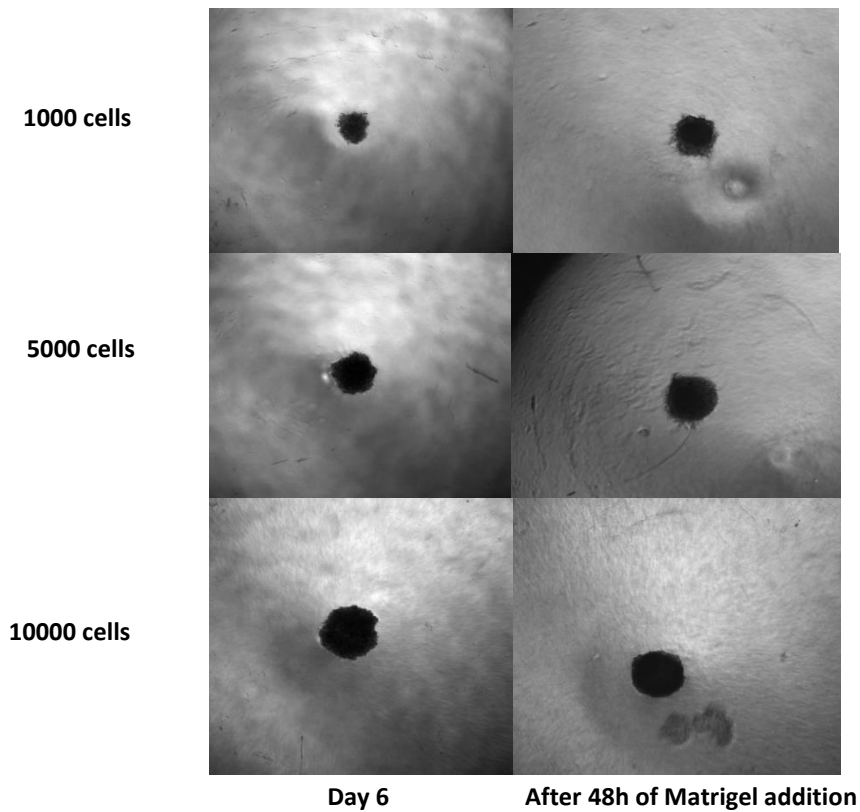


Figure 5. Spheroids of different cell number at day 6 (left) and the same spheroid after the addition of 5% Matrigel (right). Brightfield microscopy images using Nikon Ti, 2x.

The results of the viability test show an external zone of proliferative cells and a necrotic core (Figure 7, 8). Cells in spheroids to which fresh medium was added after 7 days in Matrigel, are more stretched in the center of the structure (especially in spheroids of 5000 cells, Figure 7B) than those seen in spheroids where the medium was not changed.

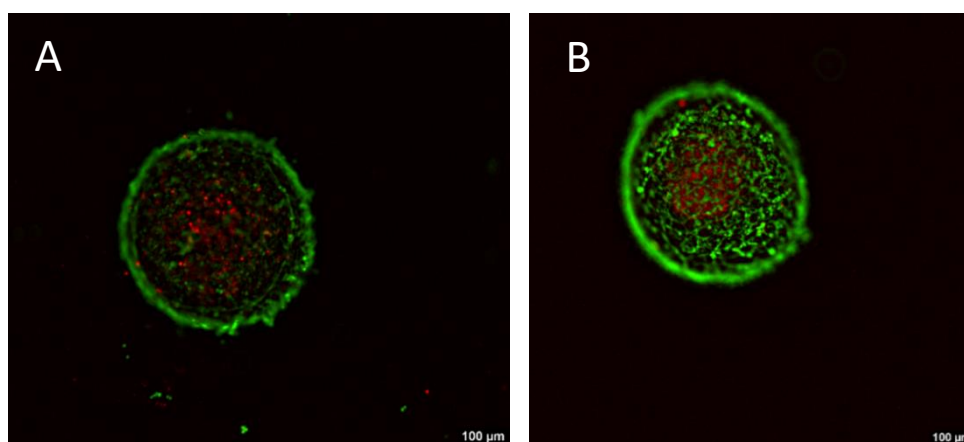


Figure 7. Viability assay with calcein and propidium iodide (PI) on day 20. Confocal microscopy using Leica Thunder. 5% Matrigel addition on day 6 after spheroids were transferred to 96-well plate. Medium was changed on day 7 after Matrigel addition. **A.** Spheroid of 1000 cells. **B.** Spheroid of 5000 cells. Scale bar 100μM.

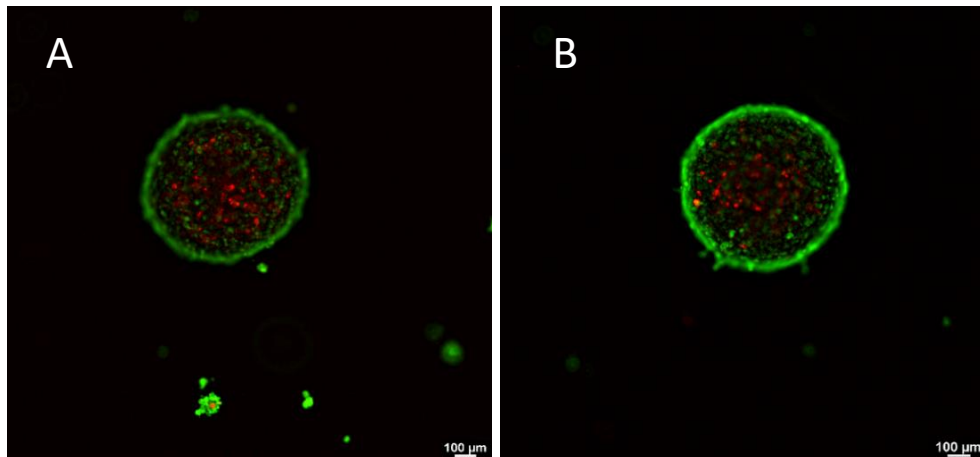


Figure 8. Viability assay with calcein and propidium iodide (PI) on day 20. Confocal microscopy using Leica Thunder. 5% Matrigel addition on day 6 after spheroids were transferred to 96-well plate. In these spheroids, the medium of the wells was not changed. **A.** Spheroid of 1000 cells. **B.** Spheroid of 5000 cells. Scale bar 100μM.

The following diagram shows the timeline of the different procedures carried out with spheroids formed by hanging drop.

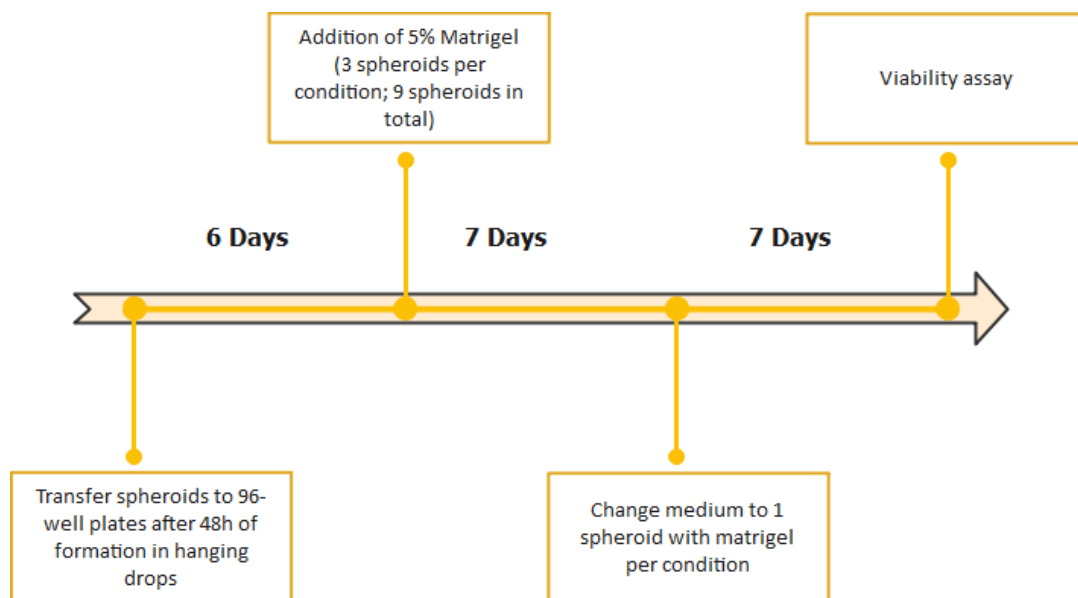


Figure 6. Process timeline description. Spheroids were transferred to the 96-well plates after 48h of formation. Medium was changed every 72h. Six days later, 5% Matrigel was added to 3 spheroids per condition (1000, 5000 and 10000 cells per spheroid). Medium was changed only in one spheroid of each condition. The viability assay was performed on day 20.

4.3. Task 3:

Since spheroids formed a three-dimensional structure when Matrigel was added, we tried another protocol, usually used in the literature with MDA-MB-231 cell lines, called liquid overlay technique using Matrigel as extracellular matrix. Two plates were prepared, where Matrigel was added at different points in time: on day 0, after centrifugation, and on day 1, when cells are more compact to see if there is any difference between conditions. In addition, Matrigel was added at different concentrations:

- 6 spheroids of 5000 cells and 2,5% Matrigel.
- 6 spheroids of 5000 cells and 5% Matrigel.
- 6 spheroids of 10 000 cells and 2,5% Matrigel.
- 6 spheroids of 10 000 cells and 5% Matrigel

4.3.1. Materials, equipment and participants needed

- MDA-MB-231 cell line
- Cell Culture Flasks (T25)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose 4,5 g/l supplemented with: 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% Glutamine.
- Phosphate buffered saline (PBS)
- Trypsin-1 mM EDTA
- 15 ml / 50 ml falcons
- Glass Pasteur pipettes
- Matrigel
- Anti-adherence rinsing solution (STEMCELL)
- 96-well plates (SARSTESDT)
- Propidium iodide (Stock concentration: 2mg/ml)
- Calcein (Stock concentration: 1mg/ml)

Equipment

- Micropipettes
- Multichannel pipette

- Centrifuge
- Laminar flow cabinet
- 37°C CO₂ incubator
- Neubauer chamber
- Nikon TI inverted microscope
- Leica Thunder Microscope

Softwares

- Image J
- NIS-Elements Viewer
- Las X Core

4.3.2. Methodology

1. Preparation of cell suspension.

Follow protocol description in 4.1.2. In this case, the composition of the 15 ml conical tubes is medium + cells (without any additives).

Take into account the number of wells that will be seeded to calculate the total volume needed. The volume per well was 100µl.

Total volume – volume of cell suspension = volume of medium

2. Centrifuge plates at 1250 rpm for 10 min.

3. Prepare solutions of Matrigel (10% and 5%)

a. In this case, we prepared a total volume of 1500µl:

- 10% Matrigel → 150µl Matrigel + 1350µl medium
- 5% Matrigel → 75µl + 1425µl medium

100µl of each solution was added to the corresponding wells (total volume of the wells 200 µl and final concentrations of Matrigel: 5% and 2,5%).

Notes

- a. On day 0, Matrigel must be added very slowly on the edge of the well.
You can centrifugate after Matrigel addition if the pellet is disintegrated.
- b. On day 1, cells are more compact and the solution of Matrigel can be resuspended in the well using the tip of the pipettor.

4.3.3. Results

Spheroids were monitored for four days, taking photos also on day 7 and day 10 before carrying out the viability test.

The addition of Matrigel causes the spheroids to compact significantly, reducing their size. After this initial compaction, spheroids grow slowly (Figure 9).

Spheroids to which Matrigel was added on day 0, experience a very prominent area drop in the first 24 hours. The different conditions analysed undergo parallel growth, reaching a similar maximum size after 10 days, both for spheroids of 5000 and for those of 10,000 cells. The 5000 cells spheroids to which 5% Matrigel was added show a larger area than the rest at 10 days (Figure 10).

In the case of spheroids to which Matrigel was added on day 1, we observed that the size decreased twice: once in the first 24 h because of the natural compaction that cells undergo after centrifugation due to the interactions between them, and another between day 1 and 2, after the addition of Matrigel.

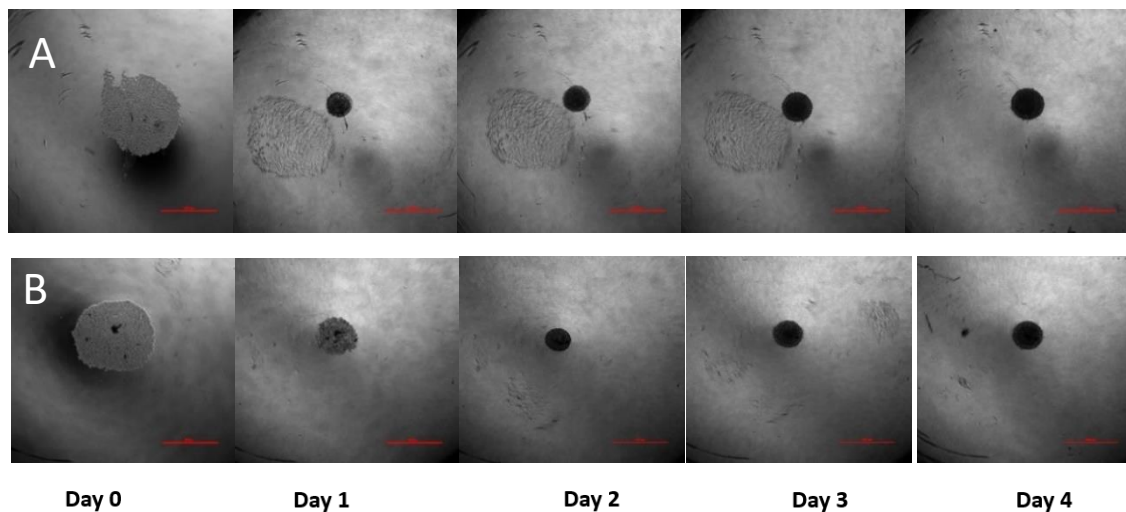


Figure 9. Evolution of spheroids of 5000 cells and 2,5% Matrigel during 4 days. Brightfield microscopy images using Nikon Ti, 2x. **A.** Matrigel was added on day 0. **B.** Matrigel was added on day 1, when cells were more compact. *Scale bar 1000 μ m.*

Adding Matrigel on day 1 seems to reduce variability between spheroids: from day two, an overlap of the graphs corresponding to the spheroids of 5000 and 10 000 cells is observed, reaching a similar maximum size at 10 days (Figure 11).

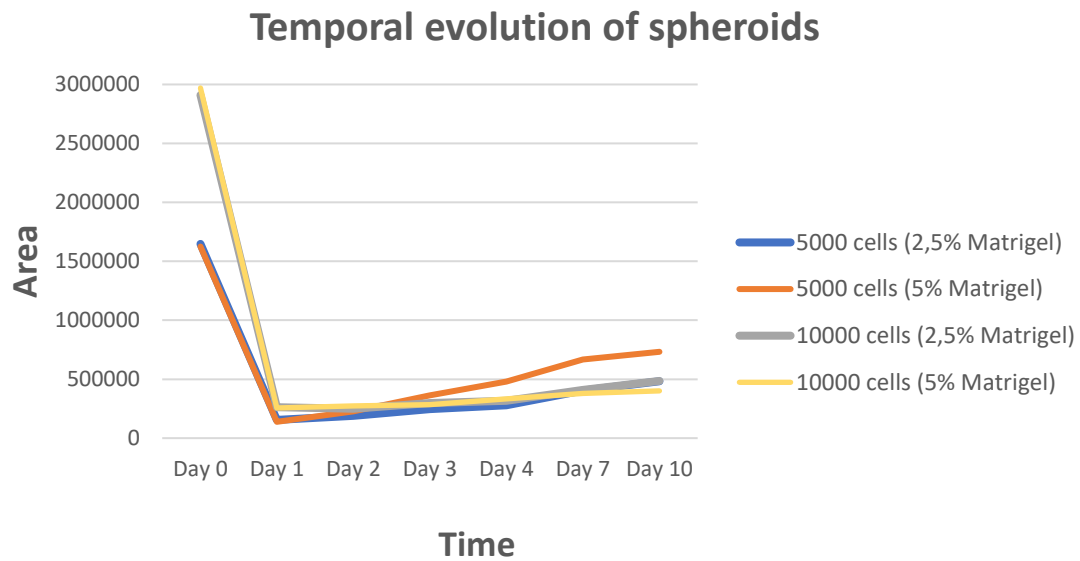


Figure 10. Temporal evolution of spheroids over a maximum period of 10 days, to which Matrigel was added on day 0 (blue arrow). Data of spheroids area were obtained using ImageJ and analysed with Microsoft Excel to calculate the mean of the 6 spheroids per condition and generate the line graphs to study spheroids evolution over time.

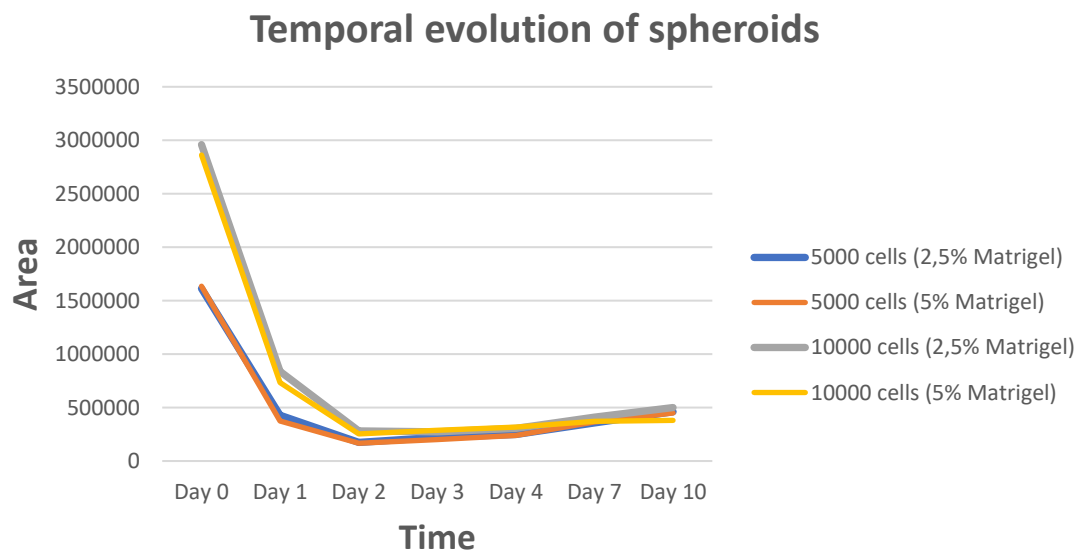


Figure 11. Temporal evolution of spheroids over a maximum period of 10 days, to which Matrigel was added on day 1 (blue arrow). Data of spheroids area were obtained using ImageJ and analysed with Microsoft Excel to calculate the mean of the 6 spheroids per condition (except in the two conditions where Matrigel was added at 5%, with 5 spheroids) and generate the line graphs to study spheroids evolution over time.

On the other hand, there is no relevant differences respect to the size reached and the structure of the spheroids due to the concentration of Matrigel used. However, it was observed in the viability test (Figure 12), when obtaining the confocal images, that

in some spheroids of 10 000 cells a central spheroid appeared to form from which cells generate the three-dimensional structure of the final spheroid (Figure 13). With this protocol, we obtain compact and three-dimensional spheroids at approximately 4 days.

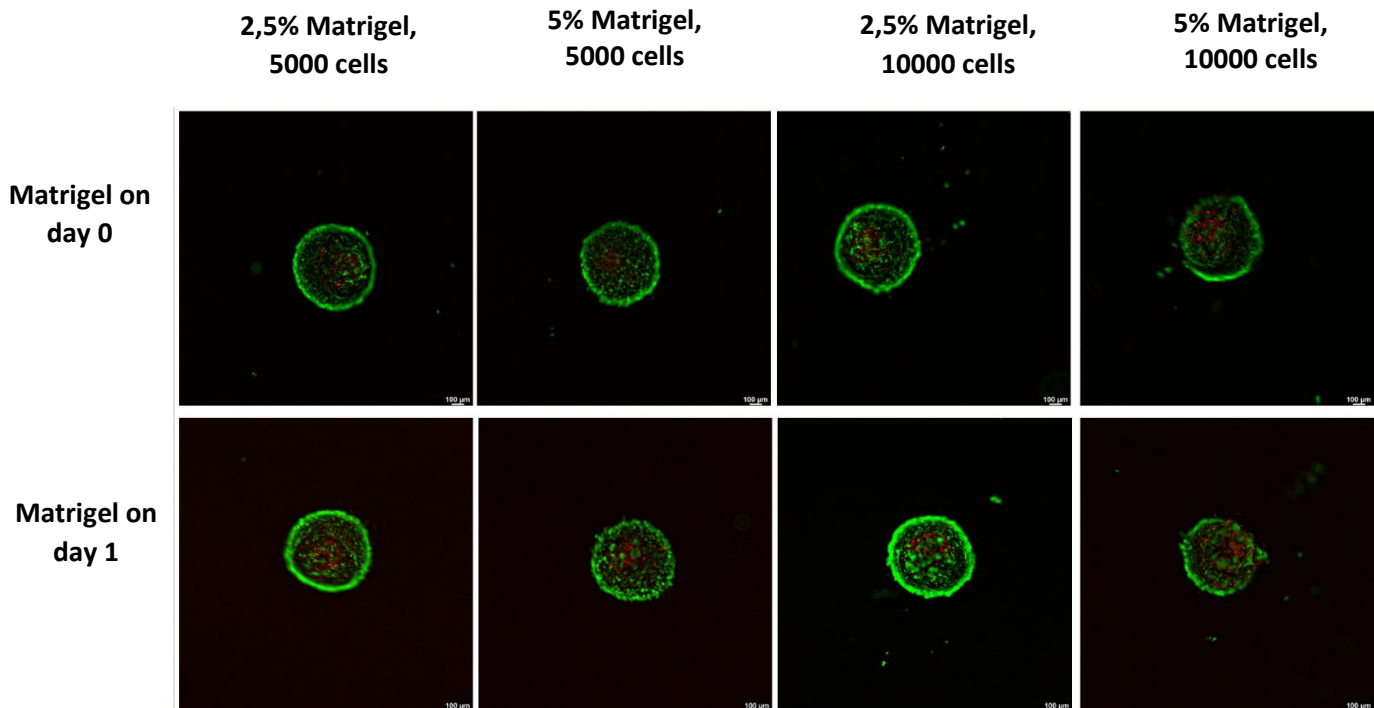


Figure 12. Viability assay with calcein and propidium iodide (PI) on day 10. Confocal microscopy using Leica Thunder. Spheroids with different number of cells to which Matrigel was added on day 0 and on day 1, at different concentrations. *Scale bar 100μm.*

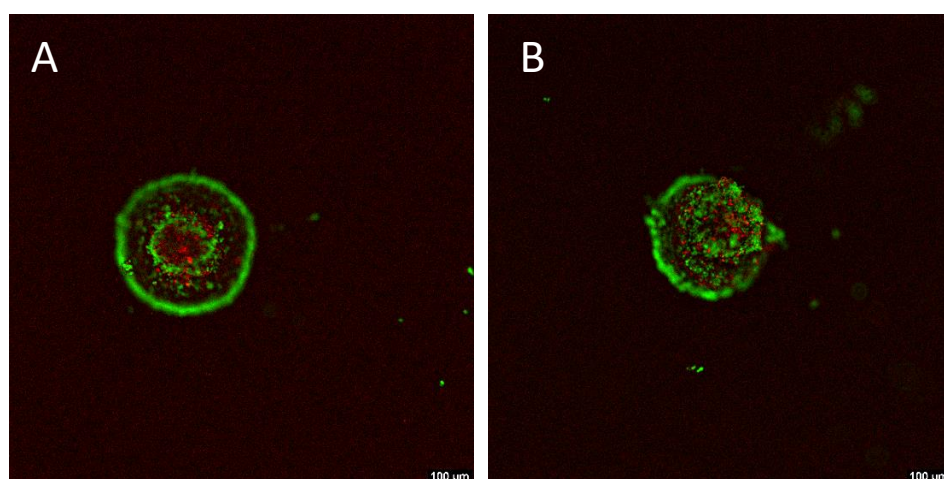
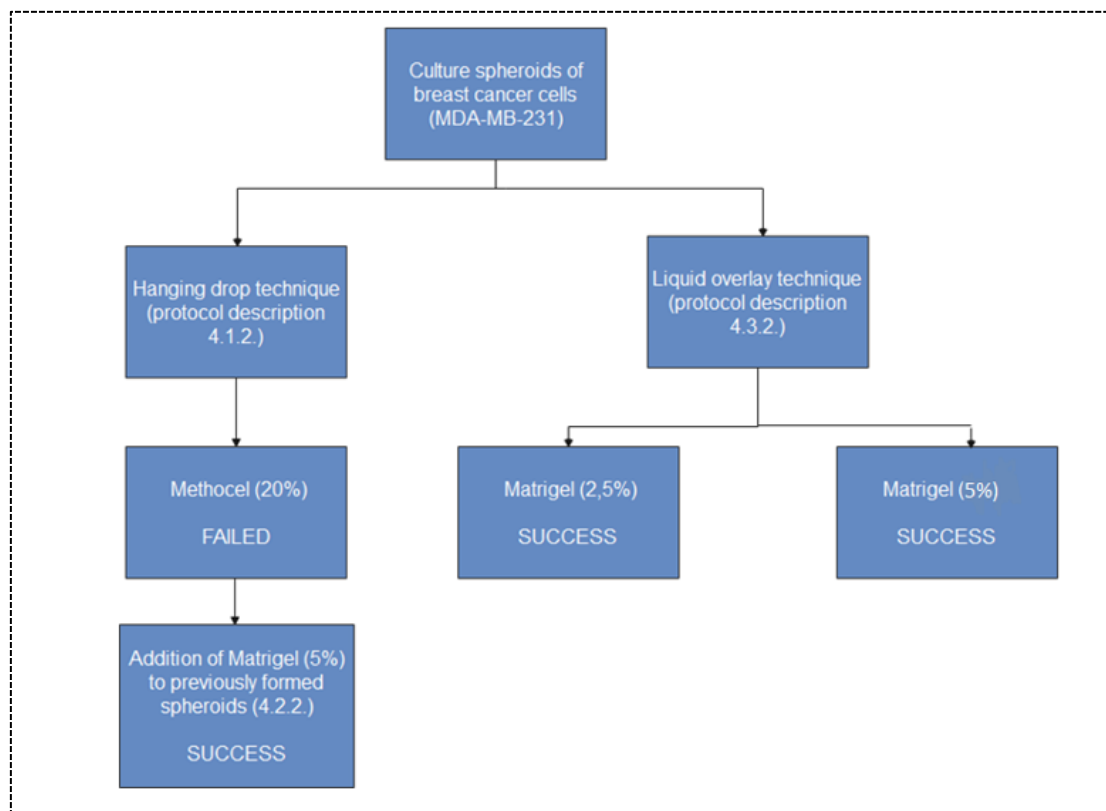


Figure 13. Viability assay with calcein and propidium iodide (PI) on day 10. Confocal microscopy using Leica Thunder. Spheroids of 10000 cells and Matrigel at 2,5% (added on day 0) **(A)** and 5% (added on day 1) **(B)**. Cells appear to grow around an initial central structure, where a ring of calcein-positive cells can be distinguished. *Scale bar 100μm.*

As previously described, spheroids formed in hanging drops with the addition of Methocel are closer to compact aggregates than to spheroids with a 3D structure. By adding Matrigel to the spheroids already formed by hanging drops, it was observed that they went from being flat aggregates to adopting a three-dimensional structure, where the areas generally described in the spheroid could be distinguished, with proliferating cells in the periphery and a necrotic core.

According to literature, liquid overlay technique using an extracellular matrix seems to be effective to obtain spheroids with MDA-MB-231 cell line. Therefore, this protocol was tested by providing Matrigel as extracellular matrix to make cells arrange themselves forming a 3D structure, due to the interactions established with this matrix and between cells. At four days, we had already formed compact spheroids, of comparable size and structure, especially if Matrigel was added on day 1 after centrifugation. The difference in added Matrigel concentrations or the initial number of cultured cells (5000 cells a 10000 cells), did not appear to have a significant effect on spheroids structure or the size reached at 10 days.

Graphic representation summarizing all related experiments carried out



5. Conclusions

- Hanging drop technique using Methocel as additive is not valid to form MDA-MB-231 spheroids with a 3D structure.
- Addition of Matrigel to flat spheroids previously formed by hanging drop helps them to organize and form a more compact and tridimensional structure.
- Overlay technique forms tight and compact MDA-MB-231 spheroids in 4 days.
- Number of cells, from 5000 to 10000, does not influence the spheroids formation.
- Matrigel concentration, from 2.5 to 5%, does not affect differently the way spheroids grow and the observed structure.
- Two more replicates of the assay are required to increase the sample size and obtain statistically significant results.

6. References

1. Pinto B, Henriques AC, Silva PMA, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1–38.
2. Huang Z, Yu P, Tang J. Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. *Onco Targets Ther*. 2020;13:5395–405.
3. Nagelkerke A, Bussink J, Sweep FCGJ, Span PN. Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: How to go three-dimensional. *Anal Biochem* [Internet]. 2013;437(1):17–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.02.004>.
4. Froehlich K, Haeger JD, Heger J, Pastuschek J, Photini SM, Yan Y, et al. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* [Internet]. 2016;21(3–4):89–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>.
5. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen*. 2006;11(8):922–32.
6. 3D Cell Culture Protocols: MDA-MB-231 Cell Line Spheroid Generation and Characterization for HT Assays. ThermoFisher 3D Scientific. Available from:

<https://www.thermofisher.com>

7. Clémence D, Robin D, Pierre D, Corinne A, Claire S, Christelle B, et al. Development and cytotoxic response of two proliferative MDAMB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 2017;8(56):95316–31.